



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Departamento de Industrias
ITAPROQ – Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos

**Optimización microbiológica y sensorial del uso de aceites esenciales en
la formulación de un jugo de yacón**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Química Industrial

Lic. Malena González

Directora de tesis: Dra. María Fernanda Gliemmo

Consejera de Estudios: Dra. Sandra Guerrero

Lugar de trabajo: Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales, Universidad de Buenos Aires. ITAPROQ – Instituto de Tecnología de
Alimentos y Procesos Químicos

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, marzo de 2021

Optimización microbiológica y sensorial del uso de aceites esenciales en la formulación de un jugo de yacón

Resumen

La acción antimicrobiana de los aceites esenciales (AEs) y su combinación con otros factores de estrés microbiano permiten su uso en la formulación de jugos con el fin de extender su vida útil y de responder a la demanda actual de alimentos seguros y naturales. La principal causa de deterioro de jugos ácidos es la inestabilidad microbiológica debido a la acción de levaduras resistentes, como *Zygosaccharomyces bailii*. En este trabajo se seleccionaron varios AEs por su acción inhibitoria frente a *Z. bailii*, se optimizó la elaboración de nanoemulsiones de los aceites seleccionados, se estudió su estabilidad, se adicionaron a la formulación de un jugo de yacón y se estudió su interacción con otros aditivos como ácido cítrico y xilitol. Se comenzó con el estudio del efecto de ácidos orgánicos y del xilitol sobre el desarrollo de la levadura y se observó que el ácido cítrico fue el más efectivo y que el descenso del pH a 4,00 redujo el crecimiento independientemente de la presencia de xilitol. El AE de corteza de canela (CC) mostró mayor actividad inhibitoria seguido por los AE de hojas de canela (CH), lemongrass (LG) y menta (M). Se obtuvo una nanoemulsión estable de CH con un homogeneizador de alta velocidad, mientras que nanoemulsiones estables de CC, LG y M fueron obtenidas por ultrasonido. El tamaño de gota de las nanoemulsiones disminuyó con el incremento del nivel de Tween®80. Todas las nanoemulsiones mostraron acción antimicrobiana frente a *Z. bailii* a pH 4,00, obteniéndose mínimas concentraciones inhibitorias (MCI) entre 156,3 y 1250,0 ppm, dependiendo del AE. El aumento del tiempo de ultrasonificación no afectó el tamaño de la gota, la estabilidad física y la MCI de las nanoemulsiones, pero el crecimiento de la levadura se incrementó ligeramente debido a la ultrasonificación. El uso conjunto de las nanoemulsiones de LG y CC mostró una interacción aditiva frente al crecimiento de *Z. bailii*. Se optimizó la obtención de jugo de yacón, seleccionando un tratamiento de 60 seg-90°C para minimizar el desarrollo de pardeamiento y reducir la flora nativa. En el jugo, la nanoemulsión de LG presentó mayor acción inhibitoria frente a *Z. bailii*, fue más estable al tratamiento térmico y sensorialmente más aceptable que la de CC. En base a ello, se formuló un jugo de yacón de pH 4,00, conteniendo 20,0% xilitol y 937,5 ppm de nanoemulsión de LG, el cual fue microbiológicamente estable a 5°C por 28 días. Una dilución 1/4 de este jugo permitió obtener una bebida aceptable por consumidores. La optimización microbiológica y sensorial del uso de AEs en la formulación de jugo de yacón aporta compuestos naturales con acción antimicrobiana y mejora la calidad de estos alimentos. **Palabras clave:** aceites esenciales, nanoemulsiones, *Zygosaccharomyces bailii*, yacón.

Microbiological and sensory optimization of the use of essential oils in the formulation of a yacon juice

Abstract

The antimicrobial action of essential oils (EOs) and their combination with other microbial stress factors allow their use in the formulation of juices in order to extend their shelf life and respond to the current demand for safe and natural foods. The main cause of deterioration of acidic juices is the microbiological instability due to the action of resistant yeasts, such as *Zygosaccharomyces bailii*. In this work, several EOs were selected for their inhibitory action against *Z. bailii*, the production of nanoemulsions of the selected oils was optimized, their stability was studied, they were added to the formulation of a yacon juice and their interaction with others additives was studied like citric acid and xylitol. It started with the study of the effect of organic acids and xylitol on yeast development and it was observed that citric acid was the most effective and that lowering the pH to 4,00 reduced growth independently of the presence of xylitol. The cinnamon bark EO (CB) showed greater inhibitory activity followed by the EO of cinnamon leaves (CL), lemongrass (LG) and mint (M). Stable CC nanoemulsion was obtained with a high speed homogenizer, while stable CL, LG and M nanoemulsions were obtained by ultrasound. Nanoemulsions droplet size decreased with increasing Tween®80 level. All nanoemulsions showed antimicrobial action against *Z. bailii* at pH 4,00, obtaining minimal inhibitory concentrations (MIC) between 156,3 and 1250,0 ppm, depending on the EO. Increasing ultrasonication time did not affect the droplet size, physical stability, and MIC of the nanoemulsions, but yeast growth was slightly increased due to ultrasonication. The combined use of the LG and CB nanoemulsions showed an additive interaction against the growth of *Z. bailii*. Obtaining yacon juice was optimized, selecting a treatment of 60 sec-90°C to minimize the development of browning and reduce the native flora. In the juice, the LG nanoemulsion showed a greater inhibitory action against *Z. bailii*, it was more stable to heat treatment and sensorially more acceptable than that of CB. Based on this, a yacon juice of pH 4,00 was formulated, containing 20,0% xylitol and 937,5 ppm of LG nanoemulsion, which was microbiologically stable at 5°C for 28 days. A 1/4 dilution of this juice allowed obtaining a drink acceptable to consumers. The microbiological and sensorial optimization of the use of EOs in the formulation of yacon juice provides natural compounds with antimicrobial action and improves the quality of these foods.

Keywords: essential oils, nanoemulsions, *Zygosaccharomyces bailii*, yacón.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado las becas que me permitieron realizar este trabajo. A la Universidad de Buenos Aires, por la formación que me brindó. A ambas instituciones, por el apoyo financiero otorgado para la realización de esta tesis.

A la Dra. María Fernanda Gliemmo, quien dirigió este trabajo, por la dedicación y la ayuda constante y sobre todo, por su esfuerzo en la corrección de esta tesis. A la Dra. Carmen Adriana Campos, por brindarme su apoyo y estímulo en todo momento. A ambas, por haber estado presentes y acompañarme en estos años de crecimiento.

A la Dra. Sandra Guerrero, quien fue mi consejera de estudios, por su colaboración.

A la Dra. Lía Noemí Gerschenson, directora del grupo de investigación, por su apoyo e interés constante.

A la Dra. Ana Pilosof, directora del Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos, por sus consejos y por su orientación en mi paso por la Planta Piloto de Alimentos.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por permitirme realizar el trabajo de investigación de mi doctorado en sus laboratorios. A todos sus integrantes, por compartir conmigo estos años de trabajo y a aquellos que colaboraron como jueces en los ensayos sensoriales realizados en esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio, por los momentos de trabajo compartidos, y también por los festejos, las salidas y las infinitas charlas.

A mis padres, Gabriela y Bubi, por su eterno amor, apoyo y presencia, por todo lo que me enseñaron y me enseñan, y por el gran orgullo que siento de ser su hija. A mi mamá en particular por transmitirme desde niña su amor por la química. A mi hermano Felipe, por su sabiduría y por alentarme en cada momento.

A toda mi familia, por los encuentros.

A mis amigxs por su paciencia y aliento todos estos años en este largo trayecto de tesis y a mis compañerxs de carrera por compartir tantos años de exámenes y largas cursadas.

A mis amigas, por su apoyo constante, por alentarme, acompañarme, por su sororidad, por luchar por un mundo más equitativo.

A mi hija Julia por darme el trabajo más difícil y más hermoso: maternar. A mi hijo Luis en camino.

A mi compañero de vida Agustín, por ser incondicional, por su amor, por alentarme, contenerme y apoyarme en mis decisiones.

De corazón, muchas gracias a todxs.

Lic. Malena González

“Los científicos dicen que estamos hechos de átomos, pero a mí un pajarito me ha dicho que estamos hechos de historias.” Eduardo Galeano.

A mis viejos

Índice

Introducción	- 1 -
1. Alimentos naturales	- 3 -
2. Emulsiones alimentarias	- 6 -
2.1 Elaboración de emulsiones	- 7 -
2.1.1 Homogeneización primaria y secundaria de emulsiones aceite en agua.....	- 8 -
2.1.2 Procesos críticos durante la formación de emulsiones	- 9 -
2.1.3 Equipos utilizados para la elaboración de emulsiones.....	- 11 -
2.1.4 Agentes estabilizantes de emulsiones.....	- 18 -
2.2 Mecanismos fisicoquímicos de desestabilización de emulsiones	- 21 -
2.3 Nanoemulsiones.....	- 23 -
2.4 Caracterización del tamaño de gota. Dispersión dinámica de luz.....	- 26 -
3 Jugos naturales.....	- 28 -
3.1 Estabilidad microbiológica de jugos	- 29 -
3.1.1 <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	- 31 -
3.1.2 Curva de crecimiento microbiano.....	- 32 -
3.1.3 Determinación del crecimiento microbiano	- 33 -
3.1.4 Modelos matemáticos del crecimiento microbiano	- 38 -
3.2 Métodos de preservación de jugos naturales	- 39 -
3.2.1 Tratamiento Térmico	- 39 -
3.2.2 Depresión de la actividad de agua.....	- 41 -
3.2.3 Disminución de pH por adición de ácidos orgánicos débiles.....	- 42 -
3.2.4 Antimicrobianos.....	- 45 -
3.2.5 Tecnologías combinadas de preservación	- 47 -
3.3 Estabilidad fisicoquímica de jugos	- 48 -
4. Aceites esenciales.....	- 49 -
4.1 Nanoemulsiones de aceites esenciales.....	- 50 -
4.2 Impacto sensorial de los aceites esenciales.....	- 55 -
5. Yacón, origen, composición, propiedades, aplicaciones y beneficios de su consumo-	56 -
5.1 Propiedades nutricionales del yacón	- 59 -
5.2 Alimentos a base de yacón	- 60 -
5.3 Jugo de yacón	- 60 -
5.3.1 Bagazo de yacón como crioprotector de células microbianas	- 61 -
5.3.2 Compuestos antioxidantes	- 61 -
5.3.3 Desarrollo de pardeamiento enzimático del yacón.....	- 61 -
5.3.4 Evaluación sensorial	- 65 -

Objetivos	- 68 -
Materiales y métodos	- 71 -
Reactivos y medios de cultivo	- 72 -
1 Cepa utilizada y preparación del inóculo	- 73 -
2 Testeo de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente al desarrollo de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	- 73 -
3 Elaboración de nanoemulsiones y estudio de su estabilidad	- 74 -
3.1 Ensayos preliminares	- 74 -
3.2 Caracterización física y estudio de la estabilidad de las nanoemulsiones	- 75 -
3.3 Estudio del efecto de la goma arábica, del Tween®80 y del tiempo de ultrasonificación sobre la estabilidad de las nanoemulsiones de lemongrass	- 76 -
3.4 Nanoemulsiones de aceites esenciales de corteza de canela, hojas de canela, lemongrass y menta. Formulación y estudio de su estabilidad.	- 77 -
3.5 Evaluación del efecto de la metodología de emulsificación sobre la estabilidad de las nanoemulsiones	- 78 -
4 Estudio del efecto de ácidos orgánicos, xilitol y nanoemulsiones de aceites esenciales sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i>	- 78 -
4.1 Elaboración de los sistemas conteniendo ácido cítrico y ácido málico	- 78 -
4.2 Determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias de los ácidos orgánicos-	78
-	
4.3 Determinación de las mínimas concentraciones fungicidas de los ácidos orgánicos-	80
4.4 Efecto del xilitol y del pH, ajustado con los ácidos cítrico y málico, sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i>	- 80 -
4.5 Efecto de las nanoemulsiones de aceites esenciales frente al crecimiento de <i>Z. bailii</i> -	81
-	
4.5.1 Evaluación del efecto de la metodología de emulsificación sobre la acción de las nanoemulsiones de los aceites esenciales frente al crecimiento de <i>Z. bailii</i>	- 81 -
4.5.2 Estudio de la interacción entre las nanoemulsiones de lemongrass y de corteza de canela frente al desarrollo de <i>Z. bailii</i>	- 83 -
4.5.3 Determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias, de los parámetros de crecimiento y de la interacción entre las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i> en presencia de xilitol-	85
-	
4.5.4 Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular	- 86 -
5 Determinación de la composición química de los aceites esenciales	- 86 -
6 Jugo de Yacón	- 87 -
6.1 Procesamiento de las raíces, obtención de la pulpa y elaboración del jugo.....	- 87 -
6.2 Determinación del color.....	- 88 -

6.3 Efecto del tratamiento térmico sobre la flora nativa y las propiedades fisicoquímicas del jugo de yacón	- 90 -
6.4 Efecto del ácido ascórbico sobre el desarrollo de pardeamiento en jugo de yacón .	- 90 -
6.5 Efecto del tratamiento térmico sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones de aceites esenciales	- 91 -
6.6 Estudio del efecto de la nanoemulsiones de aceites esenciales de lemongrass y corteza de canela y del xilitol sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i> en jugo de yacón	- 91 -
6.6.1 Determinación de mínimas concentraciones inhibitorias de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y corteza de canela en jugo de yacón en ausencia o presencia de xilitol	- 91 -
6.6.2 Estudio de la interacción entre las nanoemulsiones de lemongrass y de corteza de canela frente al desarrollo de <i>Z. bailii</i> en jugo de yacón en ausencia o presencia de xilitol-	93 -
6.7 Efecto de la temperatura de almacenamiento y de la presencia de la nanoemulsión de lemongrass sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i> en jugo de yacón.....	- 95 -
6.8 Aprovechamiento del residuo de la elaboración del jugo de yacón como crioprotector de cepas de interés industrial.....	- 97 -
6.9 Determinación de la composición nutricional, polifenoles totales y capacidad antioxidante del jugo de yacón	- 98 -
6.9.1 Propiedades nutricionales	- 98 -
6.9.2 Determinación de polifenoles totales	- 100 -
6.9.3 Determinación de capacidad antioxidante	- 101 -
7 Evaluaciones sensoriales	- 102 -
7.1 Jugo de manzana	- 102 -
7.2 Jugo de yacón	- 103 -
8 Análisis estadístico de los datos	- 105 -
Capítulo I: Selección de los aceites esenciales, elaboración de nanoemulsiones y estudio de la estabilidad.....	- 106 -
I.Resultados y discusión	- 107 -
I.1. Testeo de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales	- 107 -
I.2. Ensayos preliminares para la elaboración de nanoemulsiones	- 109 -
I.3. Estudio del efecto de la goma arábica, del Tween®80 y del tiempo de ultrasonicación sobre la estabilidad de la nanoemulsión de lemongrass	- 110 -
I.4. Evaluación del efecto de la metodología de emulsificación sobre la estabilidad de las nanoemulsiones	- 118 -
I. Conclusiones.....	- 128 -
Capítulo II: Efecto de ácidos orgánicos, xilitol y nanoemulsiones de aceites esenciales sobre el crecimiento de <i>Z. bailii</i>.....	130

II. Resultados y discusión.....	131
II.1 Efecto de los ácidos cítrico y málico sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i>	131
II.2. Efecto del xilitol y del pH, ajustado con ácido cítrico o málico, sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i>	135
II.3. Efecto de las nanoemulsiones de aceites esenciales sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i> en caldo Sabouraud	138
II.3.1. Evaluación del efecto de la metodología de emulsificación sobre la acción de las nanoemulsiones de los aceites esenciales frente al crecimiento de <i>Z. bailii</i>	13842
II.3.2. Evaluación de la interacción entre las nanoemulsiones de lemongrass y de corteza de canela sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i>	- 145 -
II.3.3 Determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias, de los parámetros de crecimiento y de la interacción entre las nanoemulsiones de lemongrass y de canela corteza sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i> en presencia de xilitol	- 149 -
II.4. Efectividad de las nanoemulsiones relacionada con la composición química y la hidrofobicidad de la superficie celular	- 154 -
II.5. Evaluación sensorial de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de corteza de canela y de lemongrass en jugo de manzana	- 159 -
II Conclusiones.....	- 161 -
Capítulo III: Jugo de yacón	- 163 -
III. Resultados y discusión	- 164 -
III.1. Efecto del tratamiento térmico sobre la flora nativa y las propiedades fisicoquímicas del jugo de yacón	- 165 -
III.2. Efecto del ácido ascórbico sobre el desarrollo de pardeamiento del jugo de yacón-	167
-	
III.3. Efecto del tratamiento térmico del jugo de yacón sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y corteza de canela frente a <i>Z. bailii</i> y sobre el desarrollo de pardeamiento	- 168 -
III.4. Estudio del efecto de las nanoemulsiones de aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela y del xilitol sobre el desarrollo de <i>Z. bailii</i> en jugo de yacón	- 172 -
III.4.1. Mínimas concentraciones inhibitorias de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela en jugo de yacón en ausencia o presencia de xilitol.....	- 172 -
III.4.2. Estudio de la interacción entre las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela en jugo de yacón en ausencia o presencia de xilitol-	174
-	
III.5. Evaluación sensorial de diferentes diluciones de jugo de yacón conteniendo la nanoemulsión de aceite esencial de lemongrass	- 184 -

III.6. Efecto de la temperatura de almacenamiento y de la presencia de la nanoemulsión de lemongrass sobre el desarrollo de <i>Z. baillii</i> en jugo de yacón.....	- 187 -
III.7. Aprovechamiento del residuo de la elaboración del jugo de yacón como crioprotector de cepas de interés industrial.....	- 190 -
III.8. Determinación de la composición nutricional, polifenoles totales y capacidad antioxidante del jugo de yacón.....	- 192 -
III.8.1. Propiedades nutricionales.....	- 192 -
III.8.2. Polifenoles totales y capacidad antioxidante.....	- 194 -
III. Conclusiones.....	- 195 -
Conclusiones generales	197
Referencias	201

Introducción

Abreviaturas

A Máximo valor de crecimiento

AA Ácido ascórbico

AC Ácido cítrico

AM Ácido málico

AE aceite esencial

a_w Actividad de agua

CAA Código Alimentario Argentino

CFI Concentración fraccionaria inhibitoria

CC Aceite esencial de corteza de canela

CH Aceite esencial de hojas de canela

IPD Índice de polidispersidad

FOS fructooligosacáridos

LG Aceite esencial de lemongrass

λ fase de latencia,

M Aceite esencial de menta

MCI Mínima concentración inhibitoria

MCF Mínima concentración fungicida

UT Emulsiones gruesas elaboradas con Utraturrax®

US – 5 Emulsiones elaboradas con 5 minutos de ultrasonificación

US – 25 Emulsiones elaboradas con 5 minutos de ultrasonificación

Z. bailii *Zygosaccharomyces bailii*

1. Alimentos naturales

La Organización Panamericana de la Salud (OPS,2020) clasifica a los alimentos en tres grupos:

- Grupo 1: alimentos naturales y mínimamente procesados;
- Grupo 2: ingredientes culinarios; y
- Grupo 3: productos comestibles listos para el consumo: procesados y altamente procesados o más conocidos como ultraprocesados.

El consumo de los distintos grupos de alimentos tiene una gran influencia en las implicaciones en la salud de las personas.

Dentro de los *alimentos naturales* (no procesados) encontramos los de origen vegetal (verduras, leguminosas, tubérculos, frutas, nueces, semillas) o de origen animal (pescados, mariscos, carnes de bovino, aves de corral, animales autóctonos, así como huevos, leche, entre otros). Una condición necesaria para ser considerados como no procesados es que estos alimentos no contengan otras sustancias añadidas como son: azúcar, sal, grasas, edulcorantes o aditivos. Los *alimentos mínimamente procesados* son alimentos naturales que han sido alterados sin que se les agregue o introduzca ninguna sustancia externa. Usualmente se sustraen partes mínimas del alimento, pero sin cambiar significativamente su naturaleza o su uso. Estos procesos "mínimos" (limpiar, lavar, pasteurizar, descascarar, pelar, deshuesar, rebanar, descremar, esterilizar, entre otros) pueden aumentar la duración de los alimentos, permitir su almacenamiento, ayudar a su preparación culinaria, mejorar su calidad nutricional, y hacerlos más agradables al paladar y fáciles de digerir. En combinaciones adecuadas, todos los alimentos de este grupo forman la base para una alimentación saludable.

Los *ingredientes culinarios* son sustancias extraídas de componentes de los alimentos, tales como las grasas, aceites, harinas, almidones y azúcar; o bien obtenidas de la naturaleza, como la sal. La importancia nutricional de estos ingredientes culinarios no debe ser evaluada de forma aislada, sino en combinación con los alimentos.

Los *productos comestibles procesados* son aquellos productos alterados por la adición o introducción de sustancias (sal, azúcar, aceite, preservadores y/o aditivos) que cambian la naturaleza de los alimentos originales, con el fin de prolongar su vida útil, hacerlos más agradables o atractivos. Por ejemplo: verduras o leguminosas enlatadas o embotelladas y conservadas en salmuera, frutas en almíbar, pescado conservado en aceite, y algunos tipos de carne y pescado procesados, tales como jamón, tocino,

pescado ahumado; queso, al que se le añade sal. Los productos procesados generalmente conservan la identidad básica y la mayoría de los componentes del alimento original, pero los métodos de procesamiento usados hacen que sean desbalanceados nutricionalmente, debido a la adición de aceite, azúcar o sal.

Los *alimentos ultraprocesados* se formulan en su mayor parte a partir de ingredientes industriales, y contienen poco o ningún alimento natural. El objetivo del ultraprocesamiento es elaborar productos durables, altamente apetecibles, y lucrativos. La mayoría están diseñados para ser consumidos como "snacks" y bebidas, por sí solos o en combinaciones con otros productos ultraprocesados. La mayoría de los ingredientes de los productos ultraprocesados son aditivos, que incluyen entre otros, conservantes, estabilizantes, emulsificantes, disolventes, aglutinantes, aumentadores de volumen, edulcorantes, resaltadores sensoriales, sabores y colores. El aumentador de volumen puede ser aire o agua. Se pueden añadir micronutrientes sintéticos para fortificar los productos. Actualmente, la mayoría de los productos ultraprocesados son resultado de una tecnología sofisticada. Estas tecnologías industriales incluyen procesos de hidrogenación, hidrólisis, extrusión, moldeado y remodelado, que son diseñadas para hacer que los ingredientes parezcan alimentos, pero son generalmente muy diferentes a los productos que promueven, porque incluyen agentes y procesos muy diversos. Ejemplos de estos alimentos son los encontrados en las góndolas de grandes mercados: sopas enlatadas o deshidratadas, sopas y fideos empaquetados instantáneos, margarinas, cereales de desayuno, mezclas para bizcochuelo, papas fritas, bebidas gaseosas, jugos, galletas, caramelos, mermeladas, salsas, helados, chocolates, fórmulas infantiles, leches para niños pequeños y productos para bebés, barras de "energía", muchos tipos de panes, tortas, postres, pasteles, productos "listos para calentar", y muchos otros tipos de productos de bebidas y "snacks". Algunos simulan platos caseros, pero se diferencian debido a la naturaleza de la mayoría de sus constituyentes, y a las combinaciones de conservantes y otros aditivos utilizados en su elaboración. Varias características nutricionales, metabólicas, sociales, económicas y ambientales de los productos ultraprocesados afectan la salud.

Los alimentos ultraprocesados son fáciles de consumir por lo que pueden fácilmente desplazar comidas y platos preparados a partir de alimentos que son nutritivos. Se promueven y se ofrecen por mecanismos que son engañosos, pretendiendo imitar a los alimentos naturales o platos tradicionales, usando aditivos que reproducen aromas, sabores y colores. Crean una falsa impresión de ser saludables, mediante la adición de vitaminas sintéticas, minerales y otros compuestos, lo que

permite a los fabricantes hacer alegaciones de salud, que pueden ser falsas y sin aprobación de la autoridad sanitaria competente.

En este contexto, aparece la Ley de Etiquetado Frontal de Alimentos. En Argentina comenzó a discutirse en octubre de 2020 y ya fue aplicada en varios países de la región como Chile, México, Perú y Uruguay. La campaña busca alertar sobre la falta de información clara en el etiquetado de los productos alimenticios, lo que empuja la epidemia de sobrepeso y obesidad infantil que afecta a uno de cada tres niñas y niños en Argentina. La campaña está orientada a sensibilizar sobre la necesidad de contar con una ley nacional que incluya la incorporación de advertencias sanitarias en el frente de los envases de productos, que alerte sobre el exceso de azúcar, sal y grasas, y promueva una alimentación saludable. Este sistema ha demostrado en otros países desalentar el consumo de comidas ultraprocesadas, las cuales tienen cantidades elevadas de sodio, azúcares, grasas, añadidos en la fabricación -como pueden ser snacks y bebidas azucaradas, y bajo valor nutricional.

Un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Food and Agricultural Organization (FAO) recomienda como objetivo poblacional la ingesta de un mínimo de 400 g diarios de frutas y verduras con el fin de prevenir enfermedades crónicas, en particular las cardiopatías, el cáncer, la diabetes tipo 2 y la obesidad (OMS, 2003). En la última década los consumidores a nivel mundial han puesto un interés creciente en el consumo de derivados de frutas por el beneficio nutricional que los mismos representan. Sin embargo, todavía en nuestro país, menos del 10% de la población consume como mínimo las cinco porciones diarias de frutas y verduras recomendadas, siendo el promedio de consumo por habitante inferior a 2 porciones por día. Jugos naturales, licuados, infusiones, smoothies son algunas de las opciones más frecuentes de incorporarlas a la dieta. Además, actualmente consumir alimentos no procesados se está convirtiendo en una tendencia con más adeptos. Si bien los alimentos industrializados tienen algunas ventajas como la prolongación de su estacionalidad, sufren cambios en su composición nutricional, ya que dejan de ser frescos y naturales, además de perder fibra alimentaria o contenido acuoso.

La expansión de bebidas más naturales, fundamentalmente aguas, gaseosas light y jugos refrigerados, en reemplazo de bebidas alcohólicas, y el continuo lanzamiento de nuevos productos, conforman un perfil de mercado dinámico y de gran potencialidad. En los últimos años creció la producción de jugos de frutas ya sea en polvos, listos para beber o concentrados para diluir. Si bien, presentaron una tendencia declinante en el último trienio, los jugos concentrados para diluir lideran el mercado con

el 50% del volumen total, seguidos por los polvos para preparar, que representan el 40% y están creciendo a expensas de los primeros (Alimentos Argentinos, 2012).

La necesidad de conservar y almacenar los alimentos y bebidas para asegurar su vida útil es un precedente en el desarrollo de la tecnología de los alimentos y marca la importancia de la implementación de nuevas metodologías para la producción, procesamiento y preservación de productos alimenticios.

2. Emulsiones alimentarias

Los alimentos son microestructuras complejas compuestas por agua, proteínas, carbohidratos, lípidos y otros componentes en menor proporción. Algunos de los alimentos naturales y procesados consisten parcial o totalmente de emulsiones (McClements, 2004). Las emulsiones son sistemas heterogéneos que están compuestos por dos fases inmiscibles: una fase que está dispersa en forma de gotas finas (fase dispersa o discontinua) en el seno de la otra fase (fase continua o dispersante). Las emulsiones se clasifican de acuerdo a la distribución de las fases acuosa y oleosa. Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina emulsión aceite en agua (O/W), ejemplos de éstas son mayonesa y aderezos, crema, leche, salsas y sopas. Un sistema que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa se denomina emulsión agua en aceite (W/O), entre las cuales encontramos: margarina, manteca y sus derivados). A diferencia de las partículas sólidas en suspensión, las gotas de las emulsiones son esféricas y deformables y la interfase es fluida (Walstra, 2000). Las aplicaciones potenciales de emulsiones fueron desarrolladas en medicina, farmacia, cosmética, y aplicaciones industriales.

Las propiedades de las emulsiones están determinadas por el tipo de emulsión (es decir, aceite en agua O/W o agua en aceite W/O), la distribución del tamaño de gota, la fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ), la composición y grosor de la película superficial en torno a las gotas y la composición de la fase continua, que determina las relaciones entre el solvente y el surfactante (interacciones coloidales). Es crítico que posean estabilidad física durante el tiempo de vida útil y lograr la estabilidad cinética es un desafío a la hora de formular emulsiones. Los requerimientos para que una emulsión sea estable en el tiempo deseado son que no haya cambios ya sea en la distribución del tamaño de gotas o en su estado de agregación (Karlberg, Thuresson y Lindman, 2005). Esto puede obtenerse por un control adecuado de los procesos de desestabilización que se mencionarán más adelante.

2.1 Elaboración de emulsiones

Una emulsión se puede formar homogeneizando agua y aceite, sin embargo las dos fases se separarían rápidamente. Esto sucede porque las gotas tienden a unirse entre sí cuando colisionan, lo que eventualmente trae como consecuencia una completa separación de fases. La fuerza que conduce este proceso se debe a que el contacto entre las moléculas de aceite y agua es energéticamente desfavorable (Israelachvili, 1992), lo cual hace a las emulsiones sistemas *termodinámicamente inestables*. Es posible formar emulsiones que sean cinéticamente estables (metaestables) por un período de tiempo razonable (días, semanas, meses o años) si se adicionan *estabilizantes*, que pueden ser emulsificantes o agentes espesantes, antes de la homogeneización. Los *emulsificantes* son moléculas de superficie activa que se adsorben a la superficie de las gotas recién formadas durante la homogeneización, lo que previene que las gotas se acerquen lo suficiente como para unirse. La mayoría de los emulsificantes utilizados en la industria alimentaria son moléculas anfifílicas como proteínas, surfactantes y fosfolípidos. Los *agentes espesantes* son ingredientes que se emplean para aumentar la viscosidad de la fase continua de las emulsiones, que produce como consecuencia una mayor estabilidad debido a que retardan el movimiento de las gotas. Los agentes espesantes más comúnmente usados en la industria de los alimentos son los polisacáridos. Un *estabilizante* es cualquier ingrediente que se utilice para mejorar la estabilidad de una emulsión y puede ser, entonces, tanto un emulsificante como un agente espesante.

Para obtener una emulsión se necesita aceite, agua, uno o más estabilizantes y energía, generalmente mecánica. Si bien fabricar las gotas es un proceso sencillo, romperlas en otras más pequeñas es más complejo. Debido a que las gotas resisten la deformación y la rotura, se necesita para ello un importante consumo de energía. La energía necesaria se puede disminuir si se reduce la tensión interfacial, añadiendo un emulsificante.

La energía necesaria para formar y romper las gotas se suministra generalmente mediante una agitación intensa. La agitación puede generar fuerzas de cizalla suficientemente fuertes si la fase continua es muy viscosa, como suele suceder al fabricar emulsiones W/O, lo que resulta en gotas con diámetros de hasta unos pocos micrómetros. En cambio, en una emulsión O/W, la viscosidad de la fase continua tiende a ser baja; para romper las gotas se requieren fuerzas de inercia producidas por las

rápidas e intensas fluctuaciones de presión debidas al flujo turbulento (Mc Clements, 2006).

Dentro de los pasos necesarios para formar una emulsión se encuentran el mezclado e incorporación de los ingredientes y luego, la homogeneización de las dos fases inmiscibles. Esta última se lleva a cabo en dos etapas: una homogeneización primaria seguida por una homogeneización secundaria. En la primera etapa se forma una “emulsión gruesa” o pre-emulsión y en la segunda, se reduce el tamaño de las gotas.

2.1.1 Homogeneización primaria y secundaria de emulsiones aceite en agua

La homogeneización es el proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión. La energía necesaria para la formación de las gotas es suministrada por un homogeneizador.

La homogeneización se divide en dos etapas. La creación de una emulsión a partir de dos fases líquidas separadas, que se denomina *homogeneización primaria*, mientras que el proceso de reducir el tamaño de las gotas de una emulsión ya existente (preemulsión o emulsión gruesa) se denomina *homogeneización secundaria* (Figura 1). La creación de un tipo particular de emulsión puede involucrar una homogeneización primaria, secundaria o una combinación de ambas (McClements, 1999).

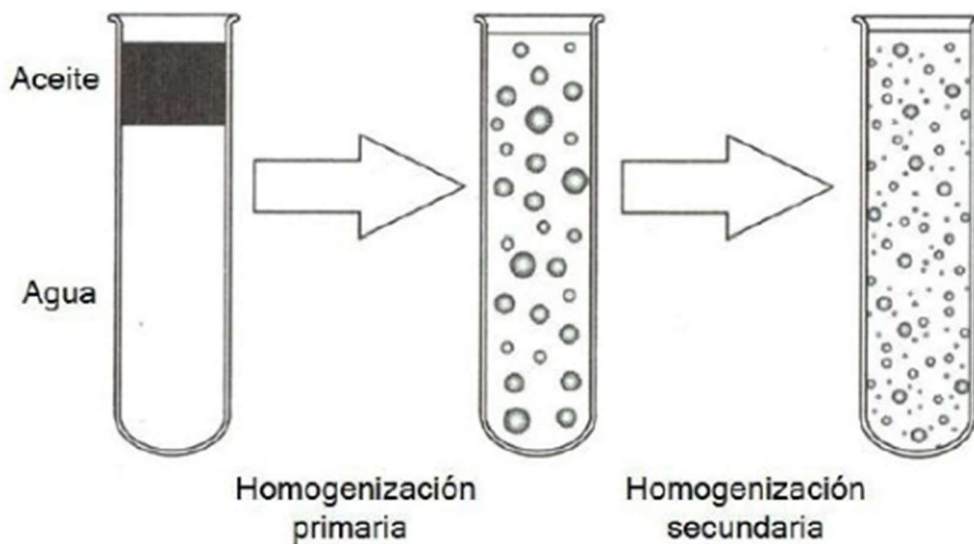


Figura 1. Representación esquemática del proceso de homogeneización para una emulsión aceite en agua (O/W). Extraído y adaptado de Mc Clements (1999).

2.1.2 Procesos críticos durante la formación de emulsiones

La formación de gotas no es el único proceso que tiene lugar durante la preparación de una emulsión. Se pueden distinguir tres procesos críticos: formación y ruptura de las gotas, adsorción del agente emulsificante en la interfase y coalescencia de las gotas (McClements, 1999). La estabilización de las finas gotas requiere la rotura mecánica de las gotas gruesas acompañado por una rápida adsorción eficaz de emulsificante en la nueva interfase aceite-agua. La colisión de gotas con la cobertura insuficiente de emulsificante conduce a la coalescencia y/o floculación, fenómenos de desestabilización de emulsiones que se explicarán más adelante (Dickinson, 2009).

Durante el proceso de homogeneización primaria, la interfase entre las dos fases líquidas inmiscibles se deforma en tal extensión, que comienzan a producirse gotas, en su mayoría, de tamaño muy grande. Estas gotas deben deformarse y romperse para formar gotas de menor tamaño, por fuerzas de ruptura. Durante la formación de las gotas el área interfacial (A) aumenta notablemente, de manera que la energía libre superficial del sistema se incrementa en una cantidad $\gamma \Delta A$, donde γ es la tensión interfacial. Las gotas de un líquido en otro que es inmiscible, tienden a adoptar una forma esférica para minimizar la energía libre interfacial. La fuerza responsable de la forma esférica está dada por la ecuación de Laplace:

Ecuación 1

$$\Delta P_L = \frac{4\gamma}{D}$$

donde ΔP_L es la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota y D es el diámetro de la gota. Las fuerzas interfaciales ejercen una presión hacia el interior, que es mayor cuanto menor es el diámetro de las gotas y mayor la tensión interfacial.

El agente emulsificante, necesario para la formación de la emulsión, debe adsorberse en la interfase, disminuyendo de esta manera la tensión interfacial. Este proceso disminuye la presión de Laplace, lo cual facilita la deformación y, en consecuencia, la ruptura en gotas de menor tamaño. Además, la formación del film interfacial evita la coalescencia de las gotas recién formadas.

El transporte de las moléculas del agente surfactante hacia la interfase durante el proceso de homogeneización no está determinada por difusión sino por convección (Walstra, 1983). Si el biopolímero no se adsorbe adecuadamente rápido en relación a la creación de área interfacial, puede ocurrir la floculación. Este proceso de desestabilización es irreversible en condiciones de dilución y no tiene lugar en emulsiones estabilizadas por agentes surfactantes no proteicos debido a que su estructura no es tan compleja como la de las proteínas (Tornberg y col., 1997). El comportamiento de las moléculas de proteína en la interfase es diferente al de moléculas simples y pequeñas de otros surfactantes. Las sustancias de alto peso molecular con actividad interfacial, como proteínas y polisacáridos, pueden acumularse en la interfase gracias a que presentan en su estructura cantidades significativas de grupos polares y no polares (Dickinson, 1992; Damodaran, 2005). Por lo tanto, es sumamente importante que el agente emulsificante recubra la interfase creada en una escala de tiempo similar a la del proceso de homogeneización. Este proceso determina la eficiencia de la formación de la emulsión (Ford y col., 1997). En caso de que la adsorción sea muy lenta en comparación con la capacidad del homogeneizador de generar área interfacial, se produce el proceso de coalescencia de las gotas recién formadas. Si la adsorción es rápida se logra una emulsión estable (Figura 2).

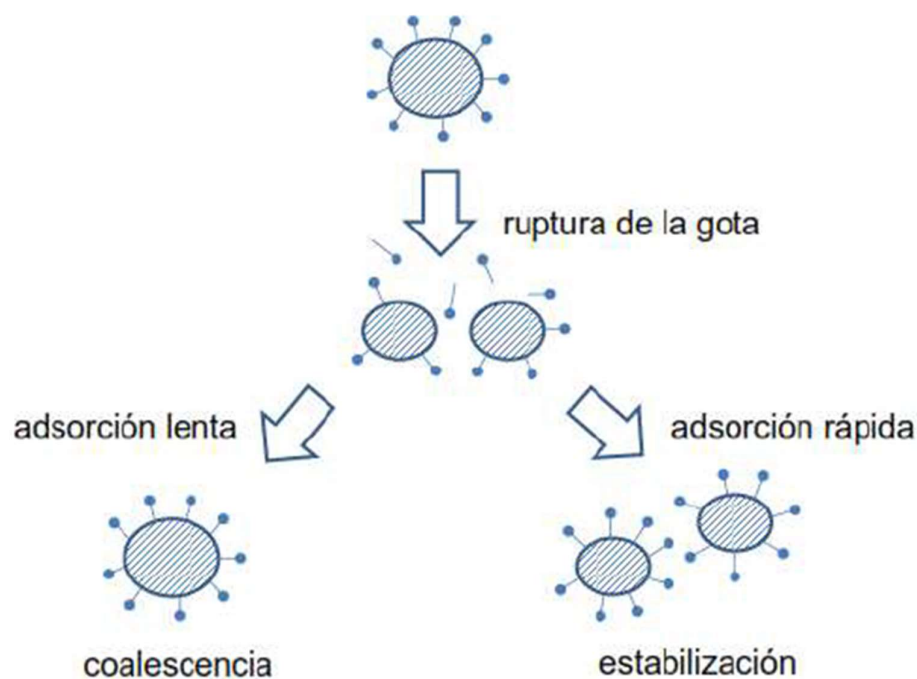


Figura 2. Representación esquemática de la adsorción del emulsificante en el proceso de homogeneización de una emulsión.

2.1.3 Equipos utilizados para la elaboración de emulsiones

Existen muchos tipos de homogeneizadores para la producción de emulsiones alimentarias. A nivel industrial los utilizados con más frecuencia son: molino coloidal, válvula de alta presión, ultrasónicos, microfluidificadores y de membranas. La elección de un homogeneizador en particular dependerá del volumen de emulsión que se desea preparar, de la naturaleza de los materiales a emulsificar, del tamaño de gota deseado y del costo del dispositivo (McClements, 1999). La intensidad de la agitación mecánica se atribuye a la densidad de energía en el líquido (ϵ), que es la cantidad de energía mecánica disipada por unidad de volumen y por unidad de tiempo (o la potencia por unidad de volumen). La cantidad total de energía mecánica suministrada debe ser extremadamente grande, debido a la oposición de la presión de Laplace (Walstra, 1983; Ford y col., 1997). La mayoría de la energía suministrada actúa en un tiempo muy corto y localmente, disipándose como calor. Por ello, la temperatura del sistema debe controlarse, especialmente en los dispositivos de alta ϵ .

Los métodos utilizados para fabricar emulsiones se dividen en métodos de emulsificación de alta y baja energía que involucran procesos mecánicos y químicos. Los métodos de **baja energía** incluyen emulsificación espontánea, temperatura de inversión de fase, composición de inversión de fase e inversión de emulsión. La mayoría de los métodos de baja energía implican un proceso químico que utiliza la energía química interna almacenada en los componentes del sistema para formar pequeñas gotas agitando suavemente. Sin embargo, existen algunas limitaciones para su aplicación porque ciertos componentes no son adecuados para aplicaciones en alimentos. La mayoría de los métodos de baja energía requieren un cierto tipo de tensioactivo de molécula pequeña y aceites de baja viscosidad. Además, la relación de tensioactivo/aceite requerida también es muy alta (McClements y Rao, 2011; Yang y col., 2012). Los equipos de baja energía que se utilizan con más frecuencia para las microemulsiones son:

- Homogeneizadores de baja velocidad (cuchilla); y
- Homogeneizadores de alta velocidad (sistema cuchilla y rotor/estator).

Los métodos de emulsificación de **alta energía** utilizan equipos mecánicos que producen fuerzas mecánicas intensas para romper la fase oleosa en pequeñas gotas:

- Homogeneizadores de válvulas de alta presión;

- Microfluidizadores; y
- Homogeneizadores ultrasónicos.

En la Figura 3, se esquematizan los distintos métodos de fabricación de nanoemulsiones aceite en agua, relacionando sus requisitos en términos de energía y proporción de tensioactivo a aceite con el tamaño medio esperado de gota.

Las emulsiones se pueden clasificar según el tamaño de gota en tres grandes grupos. Las *macroemulsiones*, también llamadas emulsiones convencionales, son emulsiones que contienen un tamaño de gota grande que varía entre 20 nm a 200µm, son termodinámicamente inestables y propensas a la agregación de las gotas. Las *microemulsiones* son las más pequeñas, termodinámicamente estables y transparentes ya que tienen un tamaño de gota entre 5 y 100 nm (Mc Clements., 2011), sin embargo su uso se limita a cierto tipo de aceites y tensioactivos sintéticos en grandes cantidades y por ello su aplicación en alimentos es limitada (Bilia y col., 2014). Las *nanoemulsiones* difieren de las emulsiones de tamaño macro o microscópico (tamaño de gota >1 µm) porque forman sistemas casi transparentes o translúcidos en los que el tamaño de las gotas varía de 20 a 200 nm, son termodinámicamente inestables como las macroemulsiones, pero cinéticamente más estables. También pueden llamarse “miniemulsiones” (McClements y Rao, 2011; Saberi y col., 2014b; Solans y col., 2005), “emulsiones ultrafinas” (Solans y col., 2005; Yang y col., 2012) y “emulsiones submicrónicas” (Solans y col., 2005), según la literatura. Las nanoemulsiones permiten el transporte o solubilización de sustancias hidrófobas dentro de una fase acuosa. Por ello, las nanoemulsiones pueden concebirse como vehículos en aplicaciones cosméticas, farmacológicas y alimentarias (Delmas y col., 2011). El uso de nanoemulsiones en alimentos es de gran interés para su aplicación como conservantes o como administradores de compuestos activos.

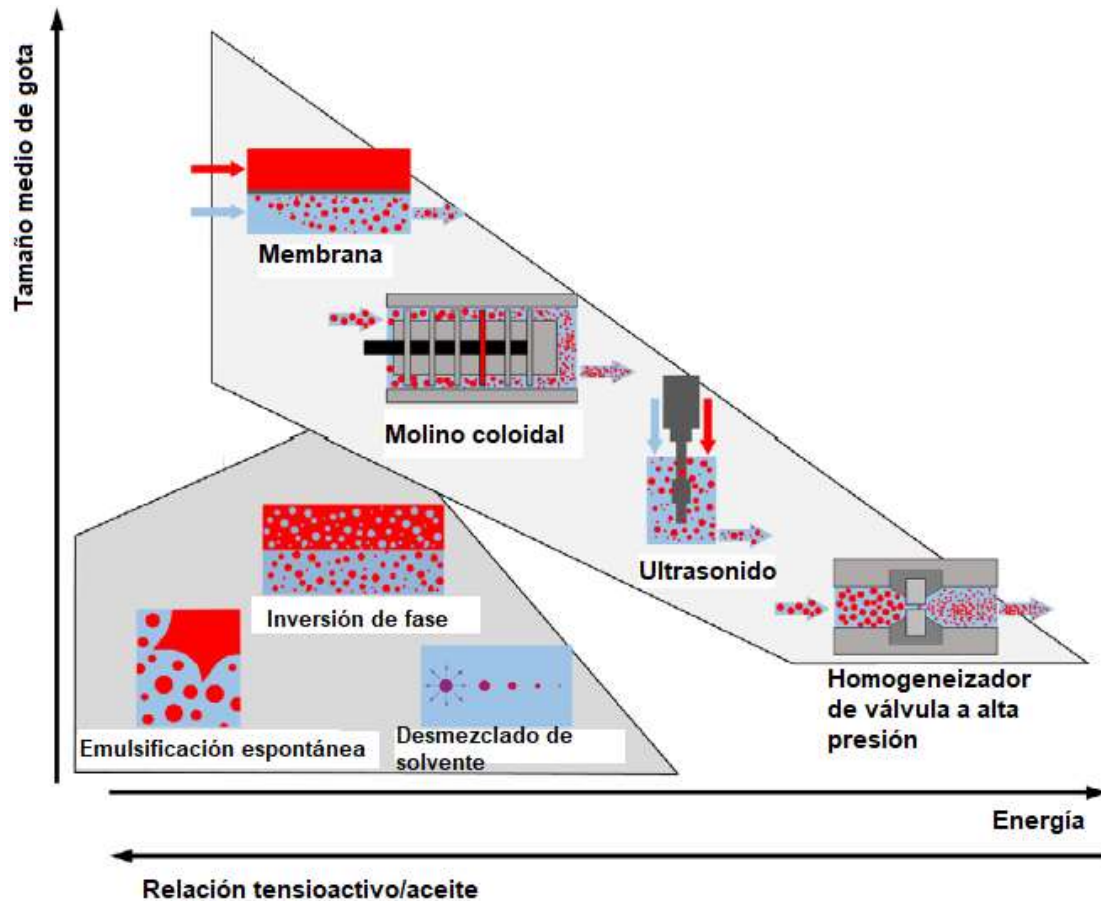


Figura 3. Esquemas de los diferentes métodos de fabricación de nanoemulsiones aceite en agua, relacionando sus requisitos en términos de energía y proporción de tensioactivo a aceite con el tamaño medio esperado de gota. Adaptado de Donsi y Ferrari (2015).

En la Tabla 1 se muestran algunos de los principales tipos de homogeneizadores utilizados a escala industrial y de laboratorio. Como se puede observar, en general, con los homogeneizadores de alta energía se obtienen menores tamaños de gota que con dispositivos de baja energía. Los métodos de baja energía se utilizan más comúnmente para formar microemulsiones.

Tabla 1. Principales dispositivos de homogeneización y características (Palazolo, 2006).

Homogeneizador	Densidad de energía (ϵ) ^(a)	Modo de operación ^(b)	Mecanismo de ruptura ^(c)	Tamaño de gota (μm) ^(d)	Viscosidad de la muestra ^(e)
Homogeneizadores de baja velocidad (sistemas cuchilla)	B	D	L,T	5	B,M
Homogeneizadores de alta velocidad (sistemas cuchilla y rotor/estator)	B	D	L,T	5	B,M
Molino coloidal	A	C	L,T	1	M,A
Homogeneizadores a válvula de alta presión	A	C	T,C	0,1	B,M
Homogeneizador de membrana	A	C	T	0,1	B,M
Homogeneizador ultrasónico	A	D	T,C	0,1	B,M

a) A = alta; M = media; B = baja. b) C = continuo; D = discontinuo o batch. c) L = flujo laminar; T = flujo turbulento; C = cavitación. d) tamaño de gota máximo, en promedio. e) B = baja; M= media; A = alta.

Los *homogeneizadores de baja velocidad* (~ 3000 r.p.m.) y los *homogeneizadores de alta velocidad* (hasta 25000 r.p.m.) son adecuados para producir emulsiones a partir de las fases líquidas separadas. El mecanismo de ruptura es un efecto combinado de fuerzas viscosas bajo un régimen de flujo laminar y turbulento. Al tener baja ϵ producen emulsiones de tamaño de gota relativamente grande. Los homogeneizadores que tienen diseño rotor/estator de alta velocidad (Ultra-Turrax® – Polytron®; Figura 4, Panel A) son más efectivos que los de diseño a cuchilla (Figura 4, Panel C). Debido al número elevado de revoluciones del rotor, las fases líquidas a procesar se aspiran axialmente y se presiona a través de las ranuras del conjunto rotor/estator. El movimiento de alta velocidad a través de las ranuras produce el esfuerzo de corte responsable de la ruptura de las gotas (Figura 4, Panel B).

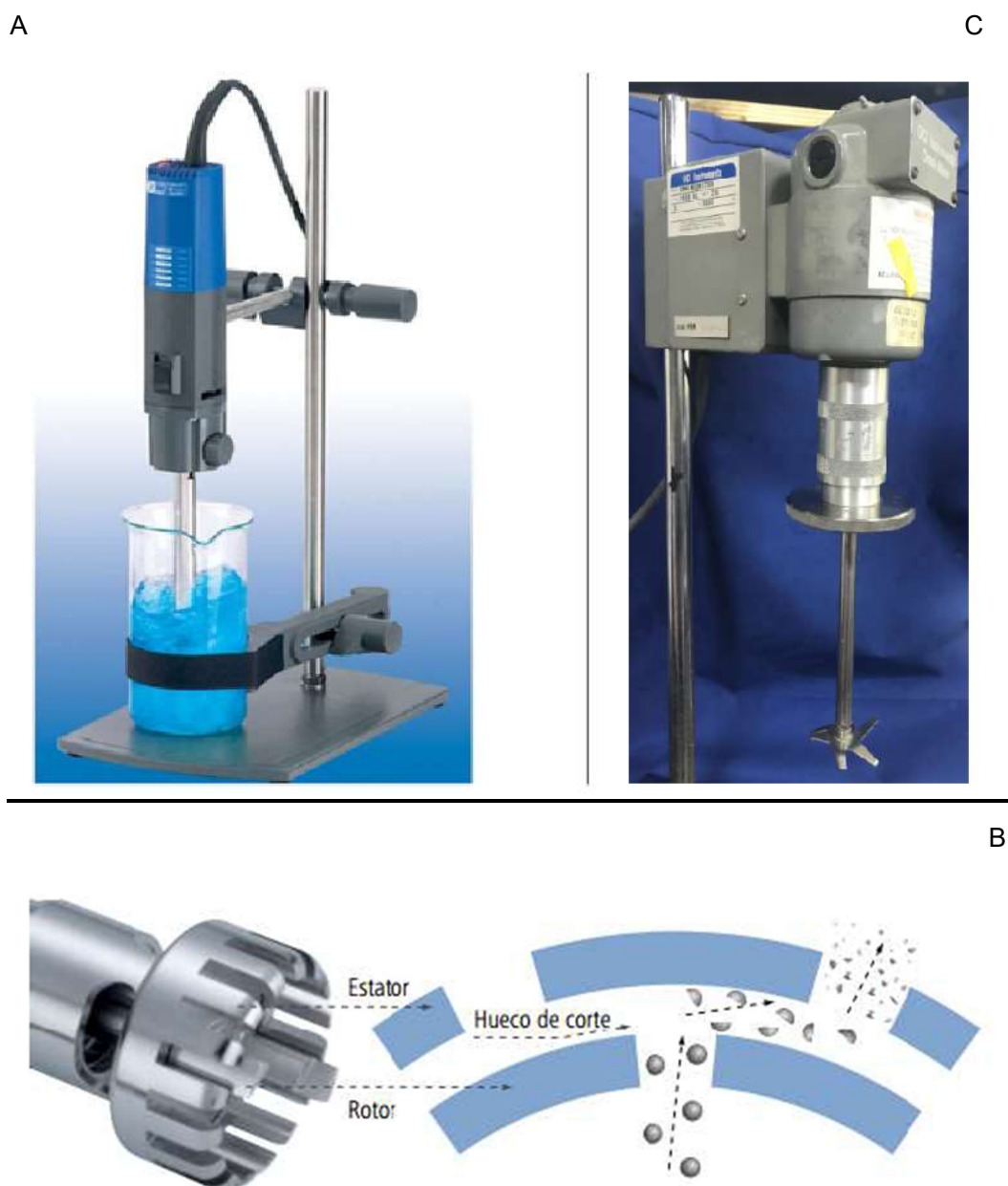


Figura 4. Panel A: Homogeneizador de alta velocidad Ultra-Turrax®T25 (IKA®, Alemania). Panel B: Principio del funcionamiento del Rotor-estator del homogeneizador Ultraturax® (IKA®, Alemania). Panel C: Homogeneizador de alta velocidad de cuchillas (Omni Mixer 17106, OCI Instruments, Omni Corporation, Waterbury, Estados Unidos).

Las nanoemulsiones para aplicaciones alimentarias son sistemas que no están en equilibrio, generalmente son fabricadas por equipos de energía externa utilizando dispositivos mecánicos que se pueden escalar fácilmente para aplicaciones industriales, y su mecanismo de ruptura de gotas es sencillo (Tan y col., 2016). Sin embargo, la gran cantidad de calor generada por métodos de alta energía puede causar degradación de emulsificantes biopoliméricos (por ejemplo, proteínas) y de componentes activos termolábiles.

Los *molinos coloidales* son adecuados para la homogeneización de emulsiones de alta viscosidad y tienen un diseño rotor/estator al igual que los homogeneizadores de alta velocidad. La intensidad del esfuerzo de corte en este dispositivo se puede regular por variación de la distancia entre el rotor y el estator. Aunque se pueden homogeneizar fases separadas, son más eficientes para la reducción del tamaño de gota.

En los *homogeneizadores de membrana*, la fase dispersa se hace pasar a través de una membrana porosa de vidrio o cerámica. El pasaje forzado a través de los pequeños orificios de la membrana produce el esfuerzo de corte necesario mientras el agente emulsificante disperso en la fase acuosa se adsorbe en la superficie de las gotas generadas. El tamaño de gotas producido depende de la rapidez con la que el agente emulsificante se adsorbe en la interfase. La principal característica de la homogeneización con membranas es la formación de emulsiones de distribución de tamaño monomodal.

En la Figura 5 se muestra el principio de funcionamiento de algunos dispositivos mecánicos utilizados para producir nanoemulsiones utilizando métodos de alta energía que se describen a continuación.

En los *homogeneizadores a válvula de alta presión* la emulsión primaria, impulsada por una bomba, es forzada a pasar a través de una válvula a presión elevada (entre 10 y 50 MPa). Las gotas de gran tamaño se rompen por un efecto combinado de flujo turbulento y cavitación. En muchos equipos, la presencia de una segunda válvula regulada a una presión más baja, favorece la obtención de emulsiones con distribución de tamaño de gota monomodal.

Un *microfluidizador* es similar a un homogeneizador de válvula de alta presión, ya que también utiliza alta presión para hacer pasar una emulsión gruesa preformada a través de un orificio estrecho donde experimenta intensas fuerzas disruptivas (McClements y Rao, 2011). Sin embargo, la característica principal de un microfluidizador es que divide la emulsión gruesa en dos corrientes en la cámara de interacción (Figura 5), lo que hace que las dos corrientes fluyan en canales opuestos y

luego chocan entre sí a muy alta velocidad y a muy alta presión, produciendo intensas fuerzas de cizallamiento, impacto y cavitación que forman pequeñas gotas (Jafari y col., 2006, 2007; Maa y Hsu, 1999; McClements y Rao, 2011).

En los *homogeneizadores ultrasónicos*, la fuente convierte el voltaje suministrado (energía eléctrica) en ondas ultrasónicas (hasta 20 kHz) que se transmiten al seno del líquido y producen millones de cavidades microscópicas. Estas cavidades colapsan y se generan ondas de choque que producen la deformación y la ruptura de las gotas (Figura 5). La temperatura dentro de las cavidades es extremadamente alta y la presión, superior a 500 atm. Sin embargo, los tiempos de vida media de las cavidades están en el orden de los microsegundos, con lo cual la energía liberada por cada cavidad es mínima. La alta densidad de energía de este dispositivo de homogeneización se atribuye al efecto acumulativo del gran número de cavidades generadas. Hay distintos diseños para uso de laboratorio (piezoelectricos, puntas sonicadoras) e industrial (generación de campo ultrasónico por aguja vibrante) (McClements, 1999).

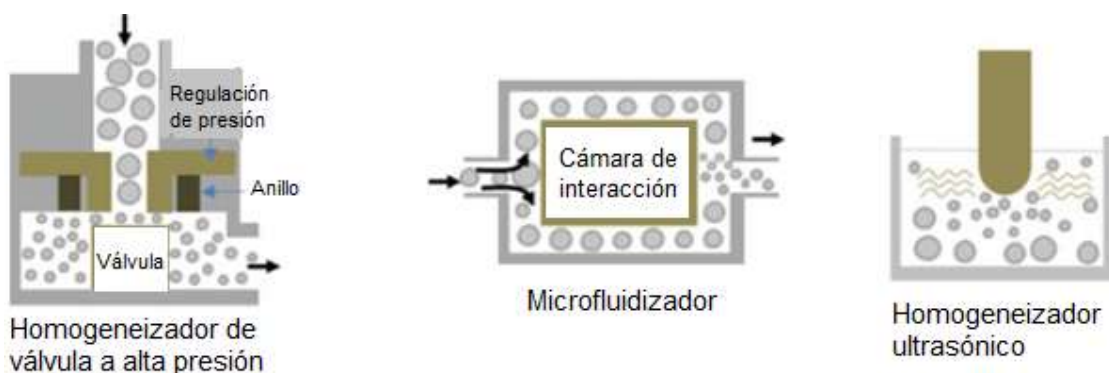


Figura 5. Ilustración esquemática de dispositivos mecánicos utilizados para producir nanoemulsiones utilizando métodos de alta energía. Adaptado de Jee Lee y col. (2018).

Los dispositivos utilizados en este trabajo fueron un homogeneizador rotor/estator de alta velocidad (Ultra-Turrax®, Figura 4, Panel A) y un Ultrasonido de Alta Intensidad (Figura 6). La tecnología de dispersión del Ultra-Turrax® funciona mediante el principio de rotor-estator. Para procesar distintos medios se requiere una gran variedad de configuraciones de rotor-estator y juntas herméticas. Para que el equipo se adapte a las necesidades específicas de cada usuario, a veces es necesario utilizar dos herramientas de dispersión para lograr la reducción del tamaño de las partículas de grueso a fino.



Figura 6. Homogeneizador ultrasónico de alta intensidad.

2.1.4 Agentes estabilizantes de emulsiones

Según el Código Alimentario Argentino (CAA) (2004), los aditivos estabilizantes son sustancias que hacen posible el mantenimiento de una dispersión uniforme de dos o más sustancias inmiscibles en un alimento (Res GMC N° 088/93). Estos aditivos conforman un amplio grupo de sustancias cuyas propiedades físico-químicas y funcionales difieren considerablemente. Dentro de este grupo, se citan a continuación aquellos aditivos comúnmente utilizados en las emulsiones que son objeto de estudio en este trabajo.

Los agentes emulsificantes, conocidos como surfactantes, son ampliamente utilizados en la industria alimentaria con el objetivo de mejorar la formación y estabilidad de las emulsiones (Dickinson, 1992). Éstos se adsorben a la superficie de las gotas de aceite durante la homogeneización y forman una membrana protectora que previene el agregado de las mismas durante una colisión e impide la coalescencia y que se formen nuevas gotas de mayor tamaño (Figura 7) (Dickinson, 2009). La función de un emulsificante es unir las fases acuosa y oleosa de una emulsión para dar una preparación homogénea y estable (Waginaire, 1997). Por definición, un surfactante es una molécula anfifílica que tiene una “cabeza” hidrofílica, con una alta afinidad por el

agua, y una “cola” lipofílica con una alta afinidad por la fase oleosa (Myers, 1988). Las características de un surfactante en particular dependen de la naturaleza de sus extremos hidrofílicos y lipofílicos. La selección del emulsificante se basa en las características finales del producto, la metodología empleada para la preparación de la emulsión, la cantidad de emulsificante añadido, las características físicas y químicas de cada una de las fases y la presencia de otros componentes funcionales en la emulsión. Los emulsificantes cubren un amplio rango de funciones en los alimentos. La más obvia es el de asistir a la estabilización y formación de emulsiones por reducción de la tensión superficial en la interfase aceite-agua. Una función adicional es la de alterar las propiedades funcionales de otros componentes del alimento. Por ejemplo, el uso de emulsificantes en productos de panadería donde actúan como ablandadores de migas y de masas. En golosinas, se usan para modificar la cristalización de las grasas, evitando alteraciones en su aspecto (Mahungu y Artz, 2001).

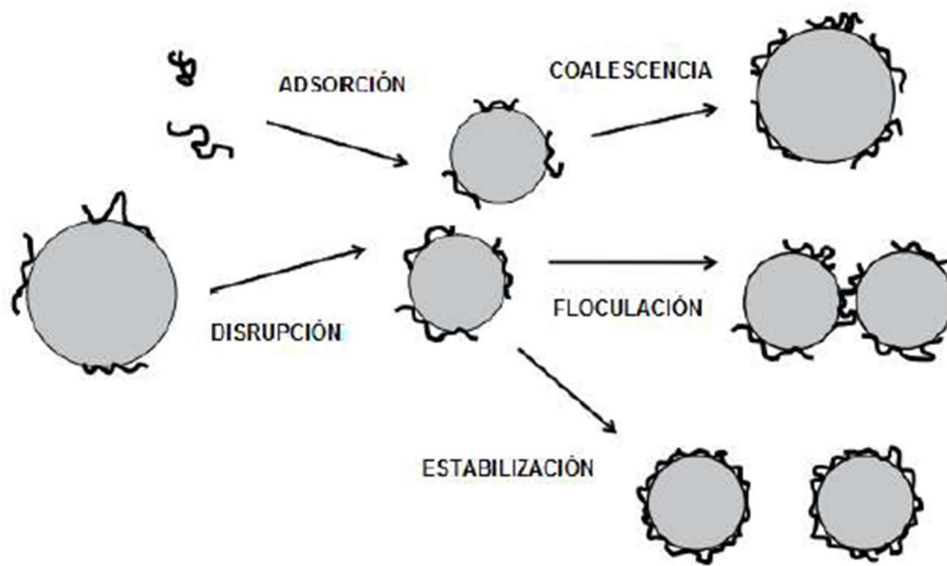


Figura 7. Ilustración de los principales procesos físico-químicos implicados en la fabricación de emulsiones. Adaptado de Dickinson (2009).

Los surfactantes se agregan espontáneamente en solución para formar una serie de estructuras estables conocidas como coloides de asociación. Éstos pueden ser micelas, bicapas, vesículas y micelas invertidas. Estas estructuras se adoptan porque minimizan el área de contacto desfavorable entre las colas no polares de las moléculas de surfactante y el agua (Hiemenz, 1986; Evans y Wennerstrom, 1994). Los coloides de asociación se mantienen juntos por interacciones físicas que son relativamente débiles comparadas con la energía térmica y, por lo tanto, sus estructuras son altamente dinámicas y flexibles (Israelachvili, 1992). Un surfactante forma micelas en solución acuosa cuando su concentración excede un nivel crítico, conocido como concentración micelar crítica o CMC (Myers, 1988). Por debajo de la CMC, las moléculas de surfactante están dispersas, predominantemente como monómeros, pero una vez que se excede la CMC, se forman micelas y la concentración de monómeros permanece bastante constante (Hiemenz, 1986). Cuando un surfactante se añade a una solución por encima de su CMC, el número de micelas tiende a aumentar (McClements, 1999). En general, en las formulaciones de emulsiones, la concentración de los surfactantes no iónicos utilizada excede a la CMC (McClements, 1999).

Algunos de los surfactantes no-iónicos más utilizados en la industria alimentaria son compuestos derivados del sorbitol esterificados con ácidos grasos (Span®) y sus correspondientes ésteres de sorbitanopolioxietileno (Tween®). La familia de los Tween® posee características hidrofílicas debido a la presencia de cadenas de oxietileno, que en general, están compuestas por veinte residuos de este óxido. Pueden estar esterificados por una o tres moléculas de ácido graso. Conocidos mayormente como polisorbatos, se nombran como: polisorbato 20, 60 u 80; estos se encuentran esterificados por una molécula de ácido láurico, esteárico y oleico, respectivamente. El Tween®80 es uno de los emulsificantes empleados habitualmente en la fabricación de nanoemulsiones. Tanto el CAA (2004), como el Codex Alimentarius y la Administración de Alimentos y Drogas (FDA), aprueban su empleo en este tipo de productos alimenticios (Mahungu y Artz, 2001).

Dentro de los espesantes, los polisacáridos juegan un rol muy importante en la estabilización de coloides alimentarios. Las gomas constituyen los agentes espesantes por excelencia en la producción de alimentos. Estas aumentan la viscosidad de la fase continua manteniendo las gotas separadas en las emulsiones y los sólidos en las suspensiones. De este modo, la colisión entre las partículas se produce menos frecuentemente, retardando o inhibiendo el cremado (en las emulsiones), y la sedimentación (en las suspensiones), la floculación o la coalescencia durante el almacenamiento a largo plazo. En muchas ocasiones la eficacia de los hidrocoloides

está relacionada con su capacidad de aumentar la viscosidad. Por ejemplo, este es el mecanismo por el cual los hidrocoloides estabilizan las emulsiones aceite en agua (Lindsay, 1993).

La goma arábica es un polisacárido de origen natural que se obtiene del exudado de ciertas variedades de Acacia. Se utiliza como ingrediente en la formulación de productos alimenticios como golosinas, en vinos para mejorar su estabilidad en botella, en productos de confitería, productos lácteos y panificados. Es muy soluble en agua, característica interesante para su uso en bebidas (Williams y Phillips, 2001). La combinación de goma arábica, goma xántica y aceite esencial de naranja fue estudiada para ser agregada a una bebida de naranja (Mirhosseini y col., 2008).

Para la preparación de nanoemulsiones, el emulsificante más comúnmente utilizado es un tensioactivo, pero también se pueden utilizar proteínas y lípidos para este propósito (Gupta y col. 2016). Algunos ejemplos de los emulsificantes que se utilizan son Tweens®, Spans®, derivados de huevo, soja o lácteos, lecitina, aislado de proteína de suero, caseinatos, goma arábica y almidones modificados (Komaiko y McClements., 2016).

2.2 Mecanismos fisicoquímicos de desestabilización de emulsiones

Desde el inicio de la formación de una emulsión, inmediatamente después de la homogeneización, comienza el proceso de desestabilización, el cual tiende a disminuir el área interfacial y llegar al estado termodinámico más estable, las fases separadas. Existe una variedad de mecanismos fisicoquímicos que pueden ser responsables de las alteraciones en las propiedades de una emulsión. La estabilidad de una emulsión es la habilidad de la misma para resistir cambios en sus propiedades a lo largo del tiempo. Los mecanismos más importantes involucrados en la desestabilización se muestran esquemáticamente en la Figura 8.

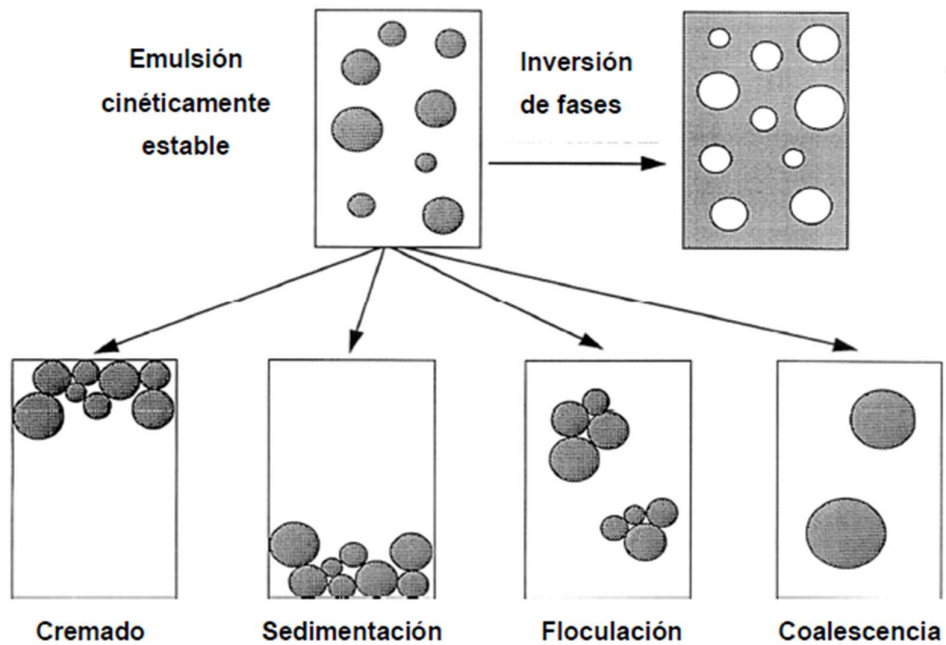


Figura 8. Las emulsiones pueden desestabilizarse a través de una variedad de mecanismos físicos, que incluye: cremado, sedimentación, floculación, coalescencia e inversión de fases. Adaptado de McClements (1999).

El *cremado* y la *sedimentación* son formas de separación gravitacional. El cremado describe un movimiento hacia arriba de las gotas de fase dispersa debido a que éstas presentan una menor densidad que la fase dispersante, mientras que la sedimentación describe un movimiento hacia abajo debido a que las gotas presentan mayor densidad que el líquido circundante. La mayoría de los aceites tienen una densidad menor que la del agua, por lo que la formación de cremado es más frecuente que la sedimentación.

La *floculación* y la *coalescencia* son fenómenos de agregación de gotas. La floculación ocurre cuando dos o más gotas se acercan para formar un agregado en el cual las gotas mantienen su integridad individual, mientras que la coalescencia es un fenómeno en el cual dos o más gotas se juntan para formar una gota de mayor tamaño.

Existe un mecanismo de inestabilidad, denominado *maduración de Ostwald* que ocurre debido al transporte de moléculas de fase dispersa desde las gotas más pequeñas hasta las más grandes a través de la fase continua dominante. Así, las gotas más grandes crecen a expensas de las pequeñas. Este mecanismo, junto con el cremado, floculación y coalescencia, provocan cambios en la distribución espacial y tamaño de las gotas, lo que puede causar alteraciones significativas en la reología de la emulsión (Valdez y col., 2006). La maduración de Ostwald es insignificante en muchos

alimentos debido a que los triglicéridos tienen baja solubilidad en agua. Sin embargo, puede ser significativa en emulsiones que contienen lípidos más solubles en agua, tales como aceites esenciales.

La *inversión de fases* es un proceso en el cual se produce un cambio desde una emulsión aceite en agua (O/W) a una emulsión agua en aceite (W/O) y viceversa. Este mecanismo, de base compleja, es muy importante en la manufactura de algunos productos alimenticios, como la margarina y la manteca (Dickinson y Stainsby, 1982; McClements, 1999).

Además de estos procesos, existen varios procesos químicos, bioquímicos y microbiológicos, como la oxidación lipídica o alteración por crecimiento microbiano, que ocurren en las emulsiones alimentarias que también afectan tanto su vida útil como su calidad (McClements, 1999).

Los mecanismos de desestabilización no ocurren de manera separada o aislada. Una emulsión puede desestabilizarse simultáneamente por distintos mecanismos, dependiendo de la viscosidad de la fase continua, del tipo de agente emulsificante empleado y su concentración inicial en la fase acuosa (u oleosa), de la adición de componentes (sales, azúcares), del pH y de la aplicación de distintos tratamientos, como trabajo mecánico, ciclos de temperatura y congelación. Los cambios químicos en algunos componentes pueden favorecer la desestabilización de una emulsión por mecanismos físicos (McClements, 1999).

En el caso particular de las emulsiones alimentarias, los cambios producidos por la desestabilización deben controlarse para que las características de la emulsión se mantengan dentro de un rango de valores estrechos, fuera del cual ya no sería posible su utilización o comercialización (Wagner, 2000).

2.3 Nanoemulsiones

Como se describió anteriormente, existen diferentes tipos de emulsiones, y se definen en función de su tamaño de gota y otras propiedades físicas y termodinámicas. En términos generales las emulsiones pueden clasificarse en emulsiones clásicas (o macroemulsiones), nanoemulsiones y microemulsiones. Las microemulsiones son termodinámicamente estables y pueden formarse espontáneamente (McClements 2012), pero, los cambios de temperatura y composición pueden afectar su estabilidad (Gupta y col., 2016). Las macroemulsiones y nanoemulsiones son termodinámicamente

inestables; aunque, estas últimas pueden ser cinéticamente estables porque contienen gotas muy pequeñas.

Las nanoemulsiones no se forman espontáneamente, sino que se debe aplicar una cizalla externa para romper las gotas más grandes en pequeñas. Generalmente, la fuerza de cizalla que es necesaria aplicar para formar las nanoemulsiones va más allá del alcance de los dispositivos de mezcla ordinarios de baja energía, y es necesario aplicar más energía para superar los efectos de la tensión superficial y romper las gotas en el rango de nanoescala. Por ello, se pueden producir nanoemulsiones a partir de una pre-emulsión o emulsión “gruesa” elaborada con un dispositivo de baja energía y luego, realizar una ruptura de las gotas más grandes en gotas nanométricas con un equipo de alta energía (Rubio-Ríos y col., 2019). A pesar de su metaestabilidad, las nanoemulsiones tienen una larga vida útil en presencia de un tensioactivo que inhiba la coalescencia de las gotas. Es muy probable que las nanoemulsiones jueguen un papel cada vez más importante a nivel comercial, ya que normalmente pueden formularse utilizando una cantidad significativamente menor de tensioactivo que el necesario para formar una microemulsión (Mason y col., 2006).

Las nanoemulsiones tienen algunas propiedades físicas interesantes que las distinguen de las emulsiones clásicas. Algunas de sus características principales son una gran área interfacial, una apariencia transparente o translúcida, alta capacidad de solubilización, baja viscosidad y alta estabilidad cinética frente a la sedimentación, floculación y coalescencia (Salvia-Trujillo y col., 2017). Las nanoemulsiones pueden permanecer estables desde unas pocas horas hasta días, meses o incluso años, dependiendo de los componentes y del proceso utilizado para su formulación; es por eso que la estabilidad es un aspecto crucial en la tecnología de las nanoemulsiones (Gadhavé, 2014).

La estructura de una gota de una nanoemulsión es sencilla, está compuesta por un núcleo lipofílico y una capa de estabilización. Se pueden desarrollar funcionalidades únicas formulando específicamente la fase lipofílica, mezclando diferentes tipos de aceites, lípidos, moléculas anfífilas y compuestos funcionales, combinando uno o más emulsificantes, con la adición de una o más capas de estabilización formadas por biopolímeros y controlando sus concentraciones (Sessa y Donsi, 2015). Además de la formulación, también las condiciones de procesamiento permiten controlar el tamaño de gotas (Donsi, 2018). La composición de la superficie y la carga también tienen influencias significativas en la interacción de las gotas con el medio externo. Más específicamente, la capa de estabilización, compuesta de emulsificante y capas de polímero adicionales, afecta la estabilidad física a través de la repulsión estérica y

electrostática (Donsi y Ferrari, 2016). La composición de la fase dispersa permite la protección de moléculas sensibles a la luz UV o susceptibles al ataque químico, el control de su liberación y de los fenómenos de inestabilidad impulsados por la maduración de Ostwald (Donsi y Ferrari, 2016; Donsi y col., 2012). El tamaño medio de gota de las nanoemulsiones, junto con su composición y concentración, afecta la estabilidad cinética de las mismas, especialmente en términos de separación gravitacional, y a las propiedades de transporte a través de matrices alimentarias (Donsi y col., 2014). Asimismo, el comportamiento óptico influye en la dispersión y absorción de la luz (McClements, 2002). Además, con el tamaño medio de las gotas, también se ve afectada el área de superficie de las nanoemulsiones y su reactividad con células biológicas y macromoléculas. La digestibilidad de los lípidos y la biodisponibilidad de las moléculas encapsuladas son promovidos por nanoemulsiones (Salvia-Trujillo y col., 2017).

Existen muchas posibilidades interesantes para aplicaciones de las nanoemulsiones, que incluyen productos cosméticos, alimenticios y farmacéuticos. Dependiendo de la aplicación, se pueden convertir en varias formas tales como líquidos, cremas, aerosoles, geles, aerosoles y espumas (Singh y col., 2017).

En los últimos años se ha incrementado el estudio de nanoemulsiones de aceites esenciales para su aplicación en alimentos por sus propiedades antimicrobianas además de su uso como saborizantes. La encapsulación de los aceites esenciales en nanoemulsiones mejoraría su solubilidad facilitando su incorporación en matrices alimentarias (Donsi y Ferrari 2016; Prakash y col., 2018). Las nanoemulsiones de aceites esenciales se han probado *in vitro* frente a diferentes microorganismos que van desde células bacterianas hasta hongos, como se describe más adelante (Sección 4.2).

La formación, las propiedades y la estabilidad de las nanoemulsiones son muy afectadas por el tipo de aceite utilizado y sus características como la viscosidad, polaridad, solubilidad en agua, densidad y tensión interfacial (McClements y Rao, 2011). La formación de nanoemulsiones de aceites esenciales puede lograrse mediante métodos de baja o alta energía debido a la baja viscosidad, baja tensión interfacial y alta polaridad de los mismos.

2.4 Caracterización del tamaño de gota. Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz (DLS, de sus siglas en inglés dynamic light scattering) es también conocida como espectroscopía de correlación de fotones (PCS) y como dispersión de luz casi elástica (QELS). Es una técnica no invasiva, que requiere poco volumen para el análisis de una muestra y se emplea para la medición del tamaño de partícula, principalmente en la escala submicrónica. Las aplicaciones más usuales del DLS son las mediciones de tamaño y distribución de tamaños de las gotas de una emulsión y moléculas dispersas o disueltas en un líquido como proteínas, polímeros, micelas, carbohidratos, nanopartículas y dispersiones coloidales (McClements, 1999).

Como el tamaño de partícula depende fuertemente de la intensidad de dispersión de luz, la asociación de diferentes biopolímeros puede monitorearse fácilmente por medio de instrumentos de dispersión de luz. La intensidad de dispersión de luz de una molécula es proporcional al cuadrado del peso molecular. Por ello, esta técnica es muy sensible a la aparición de formas asociadas o agregadas. La DLS también permite determinar las poblaciones existentes en una muestra con múltiples tamaños de partículas.

En un equipo de DLS, las partículas en la muestra dispersan la luz en diferentes direcciones, la cual incide en ellas desde una fuente de luz láser a una determinada longitud de onda. La luz dispersada es recibida por un detector óptico (Figura 9), fluctúa con el tiempo debido al movimiento browniano de las partículas y es medida y relacionada con el tamaño de la partícula. El movimiento browniano es el desplazamiento aleatorio de las partículas debido al bombardeo de las moléculas del disolvente que las rodean.

La temperatura debe ser conocida con exactitud para conocer la viscosidad, ya que ambas están relacionadas. A mayor temperatura mayor será el movimiento browniano. La temperatura debe ser estable para que no existan corrientes de convección en la muestra que arruinaría la interpretación correcta del tamaño (Malvern Instruments).

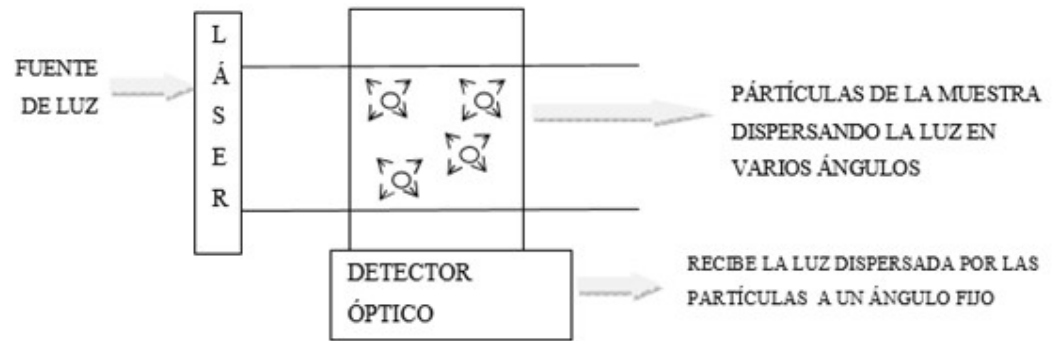


Figura 9. Representación esquemática del equipo de dispersión dinámica de luz (Mattison y col., 2003).

La velocidad del movimiento browniano se define por una propiedad conocida como coeficiente de difusión de translación (D) y se relaciona con el tamaño de la partícula por medio de la ecuación de Stokes-Einstein:

Ecuación 2

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

donde $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico, D el coeficiente de difusión traslacional (m^2s^{-1}), k la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} NmK^{-1}$), T la temperatura absoluta (K) y η la viscosidad (Nsm^{-2}).

La Figura 10 muestra la correlación según el movimiento browniano de las partículas en solución y su tamaño. Cuanto más grande sea la partícula, menor será el movimiento Browniano y viceversa. Si se sigue este movimiento a intervalos de tiempo cortos, puede obtenerse información de cuánto se ha movido y relacionarlo así con su tamaño y distribución.

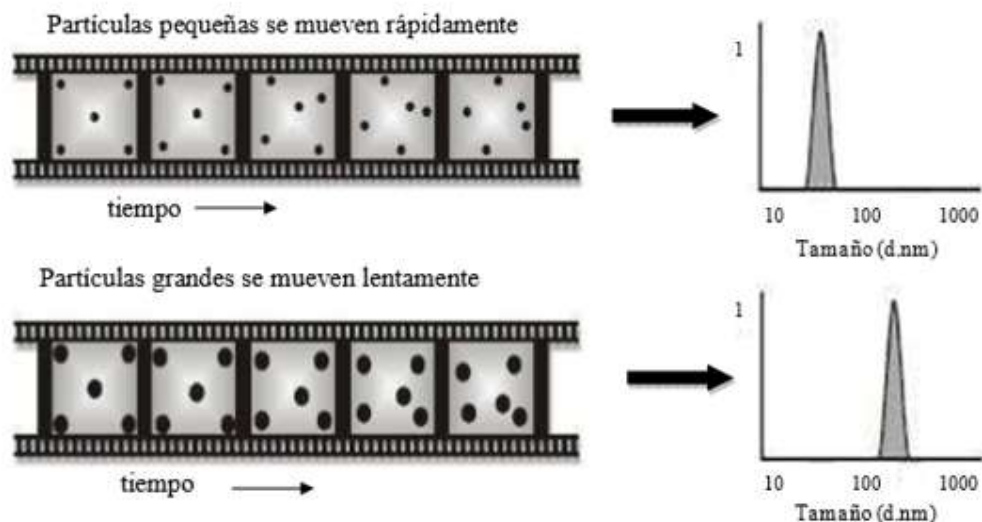


Figura 10. Representación esquemática del movimiento browniano de las partículas en solución y su relación con la curva de distribución. Adaptado de Mattison y col. (2003).

3 Jugos naturales

El capítulo XII del Código Alimentario Argentino encuadra a los jugos dentro de las bebidas analcohólicas: bebidas sin alcohol que pueden ser o no gasificadas, listas para consumir, preparadas en base a jugo, jugo y pulpa, jugo concentrado de frutas u hortalizas, etc., así como también pueden ser adicionados aromatizantes o saborizantes, edulcorantes no nutritivos, acidulantes, colorantes, conservantes, estabilizantes, emulsificantes, espesantes, exaltadores de sabor, humectantes, autorizados por el Código.

El jugo de fruta es el líquido extraído a partir de la fruta madura. Los jugos son sistemas heterogéneos que están formados por una fase dispersa llamada "pulpa" y otra fase líquida. Esta última es una solución acuosa de azúcares, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, vitaminas, pectinas, minerales, compuestos aromáticos, pigmentos y flavonoides, que, en conjunto, constituyen los sólidos solubles. La definición de madurez varía según el tipo de fruta, y en general, los niveles de azúcares y ácidos orgánicos indican el estado de madurez. En la maduración, el contenido de azúcares aumenta y el de ácidos disminuye (Yúfera, 1998). El dulzor del jugo proviene de disacáridos, como la sacarosa, y de monosacáridos, como la fructosa y glucosa. Los ácidos orgánicos otorgan la acidez del jugo. Los más comunes son el cítrico, málico y tartárico, pero el fumárico, succínico y benzoico pueden estar presentes también. Por

ejemplo, según el CODEX Alimentarius (2005), los grados Brix de los jugos de naranja, manzana y melón no pueden ser inferiores a 11,2-11,8; 11,5 y 7,5, respectivamente. El nivel de grados Brix de los jugos será el correspondiente al jugo exprimido de la fruta y el contenido de sólidos solubles del jugo de concentración natural. El pH del jugo juega un rol importante en la severidad de los tratamientos de preservación a aplicar. Valores bajos de pH constituyen un estrés adicional favoreciendo la destrucción de microorganismos, aspecto de particular importancia cuando se quieren obtener derivados mínimamente procesados.

Los jugos y bebidas de frutas, al contener gran cantidad de agua, azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas y oligoelementos, proporcionan un ambiente ideal para que los microorganismos se desarrollen, especialmente las levaduras, los mohos y los organismos acidúricos. Las bacterias patógenas usualmente no son un problema en jugos de frutas y bebidas. Sin embargo, en los últimos años se han producido varios brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos que se atribuyen al consumo de jugos y bebidas de frutas comerciales, no pasteurizados o "frescos" (Vasavada 2003).

Uno de los principales microorganismos responsables del deterioro microbiológico y, en consecuencia, físicoquímico es la levadura *Zygosaccharomyces bailii*, y por ello resulta de interés su estudio. En la sección 3.1.1 se mencionan las principales características de esta levadura.

3.1 Estabilidad microbiológica de jugos

La microbiota de los frutos frescos está constituida por una población primaria o nativa cuya presencia y cantidad difiere con el área geográfica, condiciones climáticas, tratamientos con agroquímicos, cultivar y aún de las distintas partes del fruto (Bracket, 1999). Una microbiota secundaria (hongos, bacterias, parásitos, virus, etc), proveniente de fuentes externas, puede contaminar los frutos durante las etapas de pre y postcosecha, almacenamiento e industrialización. Las posibles fuentes de contaminación precosecha incluyen: suelo, agua de riego, agua utilizada para la aplicación de insecticidas y fungicidas, abonos a partir de desechos de animales, almacenamiento, insectos, pájaros, animales domésticos. La contaminación postcosecha puede provenir de la manipulación, equipamiento, contenedores, transporte, insectos, etc. El proceso de lavado de la fruta sana, que tiene lugar previo a la extracción del jugo, elimina mayoritariamente la microbiota secundaria y en mucha

menor medida la primaria. De este modo, restos de la microbiota pueden introducirse en el jugo.

Los hongos y levaduras son los principales microorganismos que causan el deterioro de jugos de frutas y bebidas. Las levaduras predominan en la microbiota de descomposición de los productos derivados de frutas debido a su alta tolerancia a los ácidos y la capacidad, de muchas de ellas, de crecer anaeróbicamente. Un alto nivel de contaminación por levaduras en jugos de frutas y bebidas puede indicar una mala higiene de las plantas. La mayoría de las levaduras de descomposición son altamente fermentativas del azúcar y forman etanol y dióxido de carbono, lo que provoca hinchazón o rotura de latas y cartones y explosiones en botellas de vidrio o plástico (Vasavada, 2003).

Otro grupo de microorganismos capaces de deteriorar jugos son las bacterias ácido lácticas, que son bacterias Gram+ y catalasa negativas que crecen muy bien en condiciones anaeróbicas. Producen principalmente ácido láctico y ácido acético que impactan negativamente en jugos desde el punto de vista sensorial (Worobo y Splittstoesser, 2005).

Los jugos concentrados y los jarabes de fruta (a_w reducida y alta concentración de azúcar) son alterados por hongos y levaduras osmofílicos tales como *Zygosaccharomyces bailii* y *Z. rouxii*, *Aspergillus Níger*, *Eurotium spp.*, *Penicillium spp.* (Pitt y Hocking, 1997; Gould y Jones, 1989), *Candida spp*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula spp.*, *Brettanomyces intermediis*, *Schizosaccaromyces pombe*, *Totulopsis holmii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens* (Arias y col., 2002, Stratford y col., 2000). La refrigeración (0-5°C) de los frutos retarda el crecimiento microbiano, pero no previene del deterioro de los derivados frutales.

3.1.1 *Zygosaccharomyces bailii*

Entre las levaduras de deterioro se encuentra *Zygosaccharomyces bailii*. Esta levadura es capaz de deteriorar alimentos procesados y envasados. Además es osmofílica, resistente a la pasteurización, a la congelación, a preservadores lipofílicos y a agentes de limpieza. Puede crecer en condiciones anaerobias y de muy elevada acidez, con necesidades nutritivas mínimas. Debido a que es causante de deterioro en alimentos, su crecimiento produce pérdidas económicas significativas (Jenkins y col. 2000; Loureiro 2000; Piper 2011). Estos hechos hacen que el conocimiento del efecto de los aditivos sobre el crecimiento de esta levadura sea de fundamental interés para los productores de alimentos ácidos.

El crecimiento de *Z. bailii* depende de los constituyentes del alimento. Es muy resistente a preservadores tales como los ácidos acético y benzoico (Pitt, 1974). Se ha verificado su crecimiento a pH 3,0 y en presencia de 250 mg/L de ácido sórbico (Praphailong y Fleet, 1997). Schelegueda y col. (2017) observaron que la adición de sorbato de potasio ejerció un efecto inhibitorio sobre *Z. bailii*, mientras que el agregado de esteviósidos promovió su crecimiento, además de protegerla del calor. Esto indica que el edulcorante podría actuar como nutriente e interactuar con la superficie de las células protegiéndola del estrés del entorno. El agregado de natamicina inhibió el crecimiento de *Z. bailii*, mientras que el efecto de la presencia de xilitol y goma gellan dependió del tiempo, mostrando al comienzo una ligera inhibición y a mayores tiempos, la levadura los utilizó como fuente de carbono incrementando su crecimiento (Schelegueda y col., 2020).

Estudios previos reportaron que la presencia de xilitol redujo el crecimiento de *Z. bailii* (Gliemmo y col., 2013) siendo mayor el efecto en combinación con aspartamo. El uso de glucosa aumentó la tasa de crecimiento de la levadura, excepto en presencia de 0,005% m/m de sorbato de potasio, donde no se afectó. Esta tendencia puede ser relacionada con el aumento de la resistencia de las levaduras frente a ácidos producido por la presencia de glucosa (Rodrigues y Pais, 2000; Warth, 1977).

En general, los productos contaminados por *Z. bailii* tienen bajo pH, baja aw, contienen suficientes cantidades de azúcares fermentables y/u otras fuentes de carbono asimilables (por ejemplo, alcohol, glicerol y ácido acético), una fuente de nitrógeno, una fuente de vitaminas esenciales del grupo B y preservadores tales como los ácidos acético, benzoico y sórbico o dióxido de azufre. La naturaleza y extensión del deterioro causado varían con la composición química. Las modificaciones sensoriales incluyen

cambios de color, formación de aerosoles, carbonatación y off-flavor por producción de H_2S , ácido acético y ésteres frutados (Thomas y Davenport, 1985; Deak, 2008).

3.1.2 Curva de crecimiento microbiano

Se suele definir el crecimiento de cualquier sistema biológico como el incremento ordenado de todos los elementos componentes de ese sistema, lo cual implica un aumento de la masa celular que eventualmente conduce a la multiplicación celular. En organismos unicelulares dicha multiplicación se traduce en un aumento de la población (Prescott y col., 1999).

3.1.2.1 Parámetros cinéticos de una curva de crecimiento

La curva de crecimiento de un microorganismo se puede subdividir en cuatro fases distintas: *fase de latencia (lag)*, *fase exponencial (log)*, *fase estacionaria* y *fase de muerte* (Figura 11).

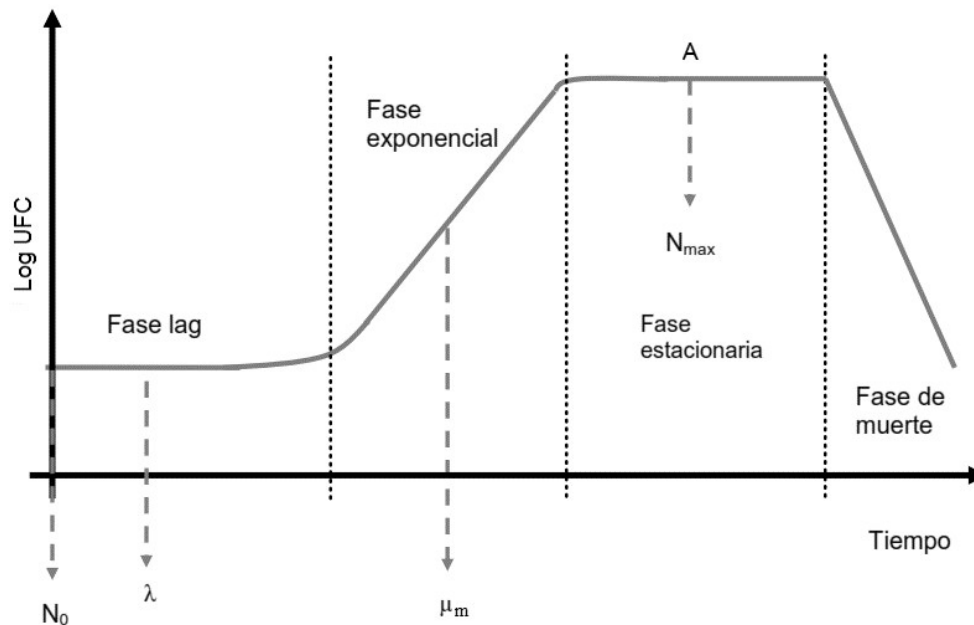


Figura 11. Representación esquemática de las cuatro fases cinéticas de una población microbiana. λ : fase de latencia, μ_m : velocidad máxima de crecimiento, $N_{m\acute{a}x}$ (A): nivel de población máximo N_0 : población microbiana inicial (Ramos, 2014).

Fase de latencia (λ): es el periodo en que las células se adaptan a un medio de cultivo antes de iniciar su crecimiento. La duración se ve afectada por factores como la identidad y el fenotipo de la bacteria (Buchanan y Cygnarowicz, 1990), el tamaño del inóculo (Besse y col., 2006), la historia fisiológica de la población (McMeekin y col., 1993) y por los cambios en el medio físico-químico, tales como la temperatura (Zwietering y col., 1994), el pH, la actividad de agua y la disponibilidad de nutrientes (Buchanan y Cygnarowicz, 1990).

Fase exponencial o logarítmica: es aquella en la que los microorganismos crecen y se dividen hasta un número máximo. En este periodo hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células y el tiempo de incubación, cuya pendiente se denomina *velocidad de crecimiento* (μ_m) y está influenciada por factores ambientales (temperatura, composición del medio, entre otros), así como por algunas características genéticas del microorganismo (Madigan y col., 1997).

Fase estacionaria: es aquella en donde se presenta la disminución de μ_m como resultado de la disminución de los nutrientes disponibles o del efecto de la acumulación de productos tóxicos del metabolismo y se alcanza el *máximo valor de crecimiento* (A).

Fase de muerte: es una consecuencia de diversos factores, el más importante es el agotamiento de las reservas de energía por parte de las células microbianas. Esta fase también tiene una relación lineal entre el logaritmo del número de células y el tiempo de incubación (Gliemmo y col., 2006, 2013).

Como se mencionó, en el proceso de crecimiento existen varios factores para la adaptación del microorganismo, por ello, la variabilidad de las respuestas microbianas influye en la predicción de los parámetros de crecimiento.

3.1.3 Determinación del crecimiento microbiano

La construcción de las curvas de crecimiento puede hacerse a través de determinaciones directas del recuento de células viables o, mediante determinaciones indirectas como la medición de la densidad óptica, entre otras. En muchos productos alimenticios, como emulsiones o jugos, la turbidez de los sistemas impide el uso de densidad óptica para determinar el crecimiento microbiano, por lo tanto, la única manera de cuantificarlo es mediante el recuento de viables, sin embargo, en este caso, la actividad microbiana puede detectarse mediante el uso de colorantes. A continuación se describen diversos métodos de determinación del crecimiento microbiano.

3.1.3.1 Métodos directos

Método de recuento de células viables. El método más utilizado para monitorear el crecimiento de una población microbiana es el recuento de células viables. Se necesitan, como mínimo, 10 determinaciones para estimar los parámetros de una curva de crecimiento. La obtención de la información es laboriosa y costosa. Para facilitar el recuento del crecimiento microbiano se han desarrollado y estandarizando métodos alternativos como citometría de flujo, turbidimetría, impedanciometría, microscopía, entre otros.

Método de microscopía. La microscopía permite el estudio directo de células individuales y con ello es posible hacer seguimiento a la misma célula en el tiempo. La principal ventaja es que permite estudiar sistemas sólidos que se asemejan a los alimentos. También permite estudiar el crecimiento en sistemas líquidos. Su uso se ha extendido con programas de análisis de imagen y el desarrollo de software (Rasch, 2004).

Citometría de flujo. Es una técnica rápida para la medición de células individuales en suspensión. Las células individuales confinadas dentro de un volumen de agua que fluye rápidamente pasan por una ventana de medición, en la que se pueden medir varios parámetros simultáneamente para miles de células por segundo con alta precisión. La dispersión de la luz refleja el tamaño y la estructura celular, mientras que las mediciones de fluorescencia pueden determinar el contenido celular de cualquier componente que pueda marcarse con fluorescencia. De esta manera, el método combina las ventajas de ser una técnica de celda única con el poder de medir una gran cantidad de células en muy poco tiempo, lo que permite estimar la heterogeneidad de la población microbiana y también la posibilidad de detectar subpoblaciones que, por ejemplo, son resistentes a un determinado tratamiento. En general, existe una buena correlación entre número de células determinadas por recuento en placa y por citometría de flujo para bacterias y levaduras (Rasch, 2004).

3.1.3.2 Métodos indirectos

A continuación se describe una breve reseña de los métodos indirectos más utilizados y se profundiza en los que fueron utilizados en este trabajo.

Impedancia. Los dispositivos de impedancia microbiológica miden el metabolismo microbiano en el medio mediante el seguimiento del movimiento de iones entre dos electrodos (conductancia) o el almacenamiento de carga en la interfaz electrodo - medio (capacitancia). Para el crecimiento bacteriano, la conductividad del medio de crecimiento aumenta con el número de bacterias debido a la producción de moléculas orgánicas con carga débil, como la conversión de proteínas en aminoácidos, carbohidratos en lactato y lípidos en acetato.

Método de turbidimetría. Estudia el crecimiento microbiano a través de mediciones de densidad óptica, lo que permite realizar un seguimiento del crecimiento en el tiempo (Dalgaard y col., 1994; Begot y col., 1996; Presser y col., 1998).

La absorbancia se define como el logaritmo decimal del cociente entre la intensidad de la luz incidente sobre la suspensión (I_0) y la luz transmitida por la suspensión (I) (Stainer y col., 1989):

Ecuación 3

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

Esta técnica se basa en el hecho de que las partículas pequeñas difractan la luz, dentro de ciertos límites, en forma proporcional a su concentración. Cuando un haz de luz pasa a través de una suspensión microbiana, la reducción en cantidad de luz transmitida a consecuencia de la difracción es una medida de la masa microbiana presente.

Dentro de las limitaciones de esta técnica cabe mencionar la necesidad de realizar una curva de calibración para relacionar la absorbancia con el número de microorganismos. Además, se debe partir de un inóculo mínimo de 10^6 UFC/ml para que puede realizarse la detección (McMeekin y col., 1997; Swinnen y col., 2004).

En trabajos previos se han realizado comparaciones entre los tiempos de latencia estimados mediante densidad óptica (DO) y los recuentos de células viables y hallaron buena correlación entre ambos. Por turbidimetría, diversos autores determinaron parámetros de crecimiento microbiano mediante la aplicación de varios

modelos matemáticos (Augustin y col., 1999; Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Gliemmo y col., 2006, 2013).

Al comparar con el recuento de viables, la turbidimetría y la impedanciometría son considerados métodos automáticos, los cuales permiten analizar un elevado número de experimentos, mientras que la citometría de flujo y la microscopía permiten obtener información adicional, como puede ser el estado fisiológico de las células (Rasch, 2004).

Métodos colorimétricos. Dentro de los métodos colorimétricos para medir el crecimiento de microorganismos, se encuentran los métodos basados en el uso de indicadores redox. Los indicadores redox captan electrones de un sistema biológico activo provocando un cambio de color y permiten evaluar la carga microbiana en forma rápida y a bajo costo. En particular, en la industria láctea, se han utilizado ensayos basados en el viraje del azul de metileno y de la resazurina para conocer la calidad microbiológica de la leche (Adams y Moss, 1997).

Las sales de trifeniltetrazolio y sus derivados inicialmente son incoloros y después de su reducción a formazanes adquieren un color intenso y generalmente se vuelven insolubles. El cloruro de trifeniltetrazolio se utiliza como componente de los medios de cultivo, en los que algunas colonias bacterianas adquieren un color desde rojo oscuro a marrón a medida que el formazán precipita en el interior de la colonia. Los cristales de formazán producidos a partir de cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT) son de un color tan intenso que se ven fácilmente dentro de cada una de las células microbianas con ayuda del microscopio, por lo que su presencia se puede utilizar para determinar la viabilidad de las células (Adams y Moss, 1997). Estas sales se conocen desde el año 1894, e inicialmente se emplearon como colorantes para teñir a las bacterias. Actualmente, su utilización se extiende a pruebas de viabilidad de semillas, presencia y enumeración de bacterias, pruebas de motilidad microbiana en agar semisólido y detección en sistemas enzimáticos de deshidrogenasas (Berridge y col., 2005).

Las propiedades químicas y biológicas únicas de las sales de tetrazolio dependen del núcleo de anillo de tetrazol cuaternario cargado positivamente que contiene cuatro átomos de nitrógeno. Esta estructura central está rodeada por tres grupos aromáticos que habitualmente implican restos fenilo. Después de una reducción moderada, las estructuras de tetrazolio se transforman, de sales incoloras o débilmente coloreadas, en productos de formazán de colores brillantes por interrupción del anillo de tetrazol. El compuesto prototipo, cloruro de trifenil tetrazolio (TTC), sintetizado hace más

de un siglo (Pechmann y Runge, 1894), ha sido modificado de muchas maneras a través de los años mediante la adición de grupos nitro, yodo y metoxi a los anillos fenilo. Estas modificaciones han dado lugar a compuestos con una gama de propiedades diferentes que se han aplicado tanto cualitativa como cuantitativamente en una gran variedad de sistemas de medición biológicos (Berridge y col., 2005).

En términos generales, el potencial redox de las sales de tetrazolio al reducirse al estado de formazanes es de alrededor de -0,08 voltios. Así, las sales de tetrazolio TTC e INT, son utilizadas frecuentemente para medir actividad respiratoria asociada a cadenas de transporte de electrones, debido a la rápida reducción que experimentan por acción de la mayoría de los sistemas de deshidrogenasas. Estas sales, al reducirse, precipitan formando un complejo insoluble en agua de color rojo intenso. La concentración de formazán extraída puede ser determinada por espectrofotometría.

La selección de un indicador redox para cuantificar el crecimiento microbiano o su inhibición depende de las características del ensayo. Si se busca una evaluación instantánea del número de microorganismos en una solución, se necesita un indicador de reacción rápida. En cambio, si se estudian los efectos de un agente antimicrobiano sobre los microorganismos, resulta más apropiado un indicador de reacción más lenta para permitir que los microorganismos tengan tiempo de interactuar con dicho agente.

La elección del indicador también depende del tipo de microorganismo, ya que no todos los indicadores pueden atravesar la membrana celular y por lo tanto, no son sensibles al crecimiento (Gabrielson y col., 2002). La reducción de las sales tetrazolio es afectada por el pH. A pH bajos (< 5,00) se inhibe la reducción del TTC o del INT a la correspondiente sal formazán. Por consiguiente, es importante considerar el pH del sistema, cuando utilizamos la reducción de sales tetrazolio como un indicador de la actividad respiratoria de un cultivo microbiano.

Recientemente, se han desarrollado técnicas para aumentar la sensibilidad de los colorantes en la detección del crecimiento, en las cuales, se utilizan las sales de tetrazolio en conjunto con aceptores intermedios de electrones, también denominados mediadores de electrones (MDE), que facilitan las reacciones de reducción.

En los últimos años se ha propuesto el uso de diversos mediadores de electrones (Berridge y col., 2005, Tsukatani y col., 2008, 2009, 2012 y 2014). El mediador de electrones es muy importante para la reducción de las sales de tetrazolio por microorganismos a formazán ya que aumenta la permeabilidad de las células y facilitan la reducción del colorante (Berridge y col., 2005). En este trabajo se utilizó el 2-metoxi-1-4 naftoquinona. Este es reducido por los microorganismos para dar naftohidroquinona,

la cual, actúa como un donador de electrones reduciendo la sal de tetrazolio para producir su formazán (Tsukatani y col., 2014).

3.1.4 Modelos matemáticos del crecimiento microbiano

Los modelos matemáticos del crecimiento microbiano se dividen en modelos cinéticos y modelos de probabilidad. En los primeros se calcula la vida microbiológica de los productos alimenticios, es decir, el tiempo durante el cual el número de microorganismos en el alimento es menor que un determinado valor. Los segundos determinan si el microorganismo puede crecer, e identifican las condiciones de almacenamiento con baja probabilidad de crecimiento (Tienungoon y col., 2000). Los dos tipos de modelos generalmente están relacionados, ya que la probabilidad de detección de crecimiento durante un tiempo específico depende de los parámetros cinéticos.

El concepto de modelo primario para el crecimiento microbiano tiene como objetivo describir la cinética del proceso de crecimiento de un microorganismo con la menor cantidad de parámetros posibles, definiendo con precisión las distintas etapas de crecimiento (McKellar y Lu, 2004). Estos modelos describen los cambios de la población microbiana en función del tiempo, incluyendo la fase de almacenamiento, procesamiento y/o tratamiento térmico, y estiman los parámetros cinéticos como la fase de latencia (λ), velocidad de crecimiento (μ_m), nivel de población máxima (A) y velocidad de inactivación. Para la cuantificación de los microorganismos se pueden incluir UFC, biomasa, medidas de absorbancia, o niveles de los metabolitos producidos (Geeraerd y col., 2004). En general, los modelos primarios más desarrollados hasta el momento, son modelos que determinan la cantidad de población microbiana.

Los modelos primarios con curvas de crecimiento sigmoideas clásicas son el modelo logístico y el modelo de Gompertz modificado (Ecuación 4).

Ecuación 4

$$\ln\left(\frac{ABS_t}{ABS_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[1 + \mu \frac{e}{A}(\lambda - t)\right]\right\}$$

donde ABS_0 es la absorbancia a tiempo inicial; ABS_t es la absorbancia a tiempo t ; μ es la velocidad específica de crecimiento; λ es el tiempo de fase estacionaria y A es el valor asintótico, es decir, la absorbancia alcanzada en la fase estacionaria.

En los últimos años, se ha desarrollado una nueva generación de modelos de curvas de crecimiento bacteriano que tienen una base mecanicista: por ejemplo, el modelo de Baranyi, el modelo Hills, el modelo Buchanan y el modelo heterogéneo de población.

3.2 Métodos de preservación de jugos naturales

Dentro de los métodos de preservación de los jugos frutales se encuentran los métodos tradicionales como el tratamiento térmico, la concentración, la deshidratación por congelación, la refrigeración, los tratamientos químicos y la filtración por membranas. Los métodos emergentes incluyen la aplicación de altas presiones hidrostáticas, de campos eléctricos pulsados, de luz UV-C (Root y Barrett, 2005) y la adición de conservantes naturales. A continuación se describirán algunos factores de estrés microbiano utilizados en la preservación de jugos.

3.2.1 Tratamiento Térmico

La aplicación de calor es el proceso más utilizado a nivel mundial, por su capacidad de inactivar microorganismos y enzimas (Rawson y col., 2011). El tratamiento térmico de un alimento depende de la termorresistencia de los microorganismos y enzimas, de la carga microbiana inicial, del pH y del estado físico del alimento. En el caso de los jugos, existen diferentes tratamientos, los cuales difieren en la temperatura y el tiempo de proceso. Los mismos se utilizan de acuerdo con los requerimientos de las autoridades sanitarias de regulación, la industria y el consumidor. La pasteurización es un tratamiento térmico que se utiliza desde comienzos del siglo XX, la cual se convirtió en una medida de seguridad imprescindible para eliminar los posibles microorganismos patógenos presentes en los jugos así como prolongar su vida útil reduciendo la carga de microorganismos deteriorativos. La pasteurización de los jugos está calculada para la reducción de 5 ciclos logarítmicos de los oocistos de *Cryptosporidium parvum*, el microorganismo más termorresistente de los patógenos bacterianos.

La pasteurización HTST, de sus siglas en inglés “High Temperature Short Time”, consiste en someter al jugo a una temperatura de entre 95 y 98 °C por 15 a 30 segundos,

generalmente en intercambiadores de calor donde la transferencia de calor para el tratamiento térmico y para el enfriamiento es muy eficiente. Mediante este tratamiento se pueden procesar en forma continua grandes volúmenes de producto, y por ser un sistema cerrado, la probabilidad de contaminación del producto es baja cuando se aplican buenas prácticas de procesamiento (Miller y Silva, 2012). La ultrapasteurización o pasteurización UHT es un tratamiento a mayor temperatura, en donde el producto se somete durante por lo menos 2 segundos a una temperatura de 138 °C, mediante un proceso térmico de flujo continuo, y luego es enfriado a menos de 5 °C y envasado en forma no aséptica en envases estériles y herméticamente cerrados. Con este tratamiento térmico se destruyen prácticamente todos los microorganismos, las toxinas y las enzimas más termorresistentes. Si bien no es una completa esterilización (que es la ausencia total de microorganismos y de sus formas de resistencia), se consigue la denominada “esterilización comercial”. Las enzimas que deben ser inactivadas en los jugos frutales no están completamente establecidas. Sin embargo, la pectinmetilesterasa (PME), la polifenoloxidasa y la peroxidasa generalmente están presentes y son capaces de ocasionar cambios indeseables. La PME es la más predominante y la más resistente al tratamiento térmico (Miller y Silva, 2012). La inhibición de las enzimas estabiliza la pulpa en suspensión, manteniendo la turbidez de los jugos, factor de calidad importante para la aceptación por parte del consumidor. Sin embargo, las altas temperaturas necesarias para la inactivación de enzimas, donde la práctica comercial recomendada considera un tratamiento a 90°C durante 60 segundos, pueden tener un impacto negativo en las características sensoriales y nutricionales, respecto del jugo fresco (Famworth y col., 2000).

Numerosos estudios sobre las características de los jugos frutales tratados térmicamente, han permitido demostrar que si bien el tratamiento logra aumentar el periodo de vida útil de los jugos, su calidad desde el punto de vista sensorial y nutricional se ve afectada en mayor o menor medida. El aroma original de los jugos frescos se ve particularmente afectado por el tratamiento térmico, el cual afecta el contenido de muchos componentes volátiles del jugo. Por eso, hay una tendencia en buscar nuevos tratamientos no térmicos y/o disminuir la severidad de los tratamientos térmicos tradicionales, a modo de mejorar las propiedades organolépticas y nutricionales de los jugos, debido a la demanda de jugos frescos y sin pasteurizar.

3.2.2 Depresión de la actividad de agua

Los microorganismos requieren la presencia de agua, en forma disponible, para que puedan crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas. Un pequeño descenso de la a_w es, a menudo, suficiente para evitar la alteración del alimento, siempre que esta reducción vaya acompañada por otros factores antimicrobianos. La mayoría de las bacterias y hongos crece perfectamente a valores de a_w entre 0,980 y 0,995; a valores más bajos, la velocidad de crecimiento y la masa celular disminuyen a la vez que la duración de la fase de latencia se prolonga hasta un valor infinito (cesa el crecimiento). Aunque la mayoría de las levaduras crece fácilmente en presencia de un 20% m/m de glucosa, solamente un limitado número de especies, las levaduras osmotolerantes o xerotolerantes, son capaces de crecer a baja a_w causada por la presencia de altas concentraciones de azúcares o de cloruro de sodio (Tilbury, 1980 a y b).

Los solutos más usados para deprimir la a_w de un alimento son cloruro de sodio, glucosa y sacarosa pero también se emplean cloruro de potasio y polioles, tales como sorbitol, manitol y xilitol (Pszczola, 2001; Gliemmo y col., 2010).

El xilitol es un poliol, aprobado por la FDA como aditivo alimentario directo para usar en alimentos. Tiene el mismo dulzor y cuerpo que la sacarosa, pero aporta un tercio menos de calorías. Además de actuar como humectante, deprimiendo la a_w , mejora la textura y la sensación en la boca (O'Brien Nabors, 2002). El xilitol es un producto intermedio del metabolismo de los carbohidratos, obtenido a partir de materiales vegetales que contienen xilano (Sandrou y Arvanitoyannis, 2000).

En trabajos previos se demostró que el tipo de soluto utilizado para reducir la a_w del medio de crecimiento influye tanto en la velocidad de crecimiento como en la de inactivación de la levadura (Lenovich y col., 1988; Almagro y col., 2000; Gliemmo y col., 2013). Una depresión de la a_w de 1,000 a 0,988 o 0,971 disminuyó la velocidad de crecimiento y aumentó la fase de latencia de *Z. bailii* cuando se usaron como humectantes xilitol, manitol, sorbitol o glucosa. La longitud de la fase de latencia fue independiente del poliol utilizado para reducir la actividad del agua a 0,988. Sin embargo, esta tendencia se modificó cuando la a_w alcanzó un nivel de 0,971 mediante la adición de glucosa. En este nivel de a_w , el uso combinado de glucosa y sorbitol o manitol promovió el mayor aumento en la fase de latencia. En general, la presencia de polioles disminuyó tanto la velocidad de crecimiento como el nivel de población máximo alcanzado en la fase estacionaria y prolongó la fase de latencia, siendo el xilitol el que mostró mayor efecto (Gliemmo y col. 2006, 2013). Además, se observó una sinergia

entre humectantes (glucosa y polioles) y el sorbato de potasio en relación con la inhibición del crecimiento. Este comportamiento permitiría disminuir la cantidad de preservador sintético utilizado conservando la estabilidad microbiana del producto utilizando xilitol como aditivo.

Según Lenovich y col. (1988) la respuesta de las células a la depresión de a_w por diferentes solutos incluye variaciones en la permeabilidad celular y la acumulación de polioles intracelulares que cambian la síntesis o actividad de las enzimas. Sin embargo, los polioles son solutos compatibles para las levaduras y su inhibición de la actividad enzimática disminuye con la longitud de la cadena del poliol (Gould, 1985).

La reducción de la a_w para limitar el crecimiento bacteriano es de suma importancia en la industria alimentaria. La utilización de almíbares, salmueras y salazones reduce la a_w del alimento para evitar su deterioro bacteriano. En cuanto a otras técnicas de conservación, la cantidad que se puede añadir será limitado debido a las razones sensoriales (Jones, 2000).

3.2.3 Disminución de pH por adición de ácidos orgánicos débiles

Durante muchos años, se ha sabido que ciertos extractos de plantas tienen propiedades antimicrobianas. Los compuestos con acciones antimicrobianas son intrínsecos a muchas especias (por ejemplo, eugenol en el clavo de olor, alicina en el ajo, cinamaldehído y eugenol en la canela, isotiocianato de alilo en la mostaza, eugenol y timol en la salvia y carvacrol y timol en el orégano). Muchos de estos compuestos son terpenos, con sabores y olores potentes. Como tales, generalmente son indiscutibles y a menudo deseables en los alimentos. Por lo tanto, es bastante obvio por qué otros compuestos naturales, inodoros e insípidos, han sido los antimicrobianos elegidos para su uso en la conservación de alimentos a gran escala. En este contexto, determinados ácidos débiles, en particular los ácidos sórbico y benzoico, son muy eficaces, especialmente a pH bajo. El sorbato y el benzoato se encuentran naturalmente en un alto nivel en muchas frutas. Algunas, como las moras, contienen tanto ácido benzoico que pueden almacenarse durante largos períodos sin que se deterioren por bacterias u hongos. Otros ácidos orgánicos débiles, como los ácidos acético y láctico, están muy extendidos en la naturaleza como productos de fermentación microbiana, aunque su presencia no se puede enmascarar tan fácilmente en productos alimenticios (Piper, 2018).

Los antimicrobianos derivados de ácidos orgánicos débiles son ampliamente utilizados para inhibir el crecimiento de microorganismos en alimentos y bebidas. Entre ellos, los más utilizados son las sales de los ácidos benzoico y sórbico. Éstas inhiben el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias; el ácido sórbico también es capaz de inhibir la germinación y el desarrollo de esporas bacterianas (Sofos y Busta, 1981; Blocher y Busta, 1985).

Las levaduras pueden utilizar una amplia gama de nutrientes como fuentes de carbono y energía, aunque la glucosa y la fructosa son las que utilizan preferentemente. En entornos naturales y en muchas aplicaciones industriales, la disponibilidad de sustratos preferidos suele ser escasa. Aprovechando las vías metabólicas alternativas que utilizan fuentes de carbono como el etanol, el glicerol, los aminoácidos o los ácidos carboxílicos, las células pueden superar estas limitaciones. Según su capacidad para utilizar ácidos carboxílicos del ciclo de Krebs como única fuente de carbono y energía, las levaduras pueden dividirse en especies Krebs-positivas o Krebs-negativas. *Saccharomyces cerevisiae* es un ejemplo de Krebs-negativa, ya que es capaz de crecer en medios que contienen ácidos monocarboxílicos como única fuente de biomasa y energía metabólica, pero no en intermedios de di- tricarboxilato del ciclo de Krebs. Otros ejemplos son *Schizosaccharomyces pombe* y *Zygosaccharomyces bailii*, que son capaces de metabolizar el ácido málico, pero sólo en presencia de una fuente de carbono fermentable. Por el contrario, especies como *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *Hansenula anomala*, *Candida sphaerica* y *Candida utilis* son especies positivas para Krebs, ya que pueden utilizar intermediarios del ciclo de Krebs como única fuente de energía de carbono (Soares-Silva y col., 2008).

La efectividad de diferentes ácidos orgánicos ha sido estudiada y comparada a diferentes valores de pH y concentración y en función de la longitud de la cadena y del tipo y grado de ramificación (Doores, 2005). La fracción no disociada de estos ácidos es la principal responsable de su actividad antimicrobiana (Eklund, 1989). Se postula que el mecanismo de acción de los ácidos débiles involucra la difusión a través de la membrana plasmática hasta el citoplasma (Stratford y Rose, 1986). Allí, las moléculas de ácido (HA) encuentran un pH cercano a la neutralidad y se ven forzadas a disociarse en iones cargados (A^-). Estos iones no pueden atravesar la membrana citoplasmática y por lo tanto se concentran dentro de la célula. La disociación de cada molécula de ácido débil dará un protón y el citoplasma se tornará progresivamente más ácido. La acidificación del citoplasma puede prevenir el crecimiento por inhibición de la glicólisis (Krebs y col., 1983), por prevención del transporte activo (Freese y col., 1973) o por interferencia con las señales de transducción (Thevelein, 1994). En las levaduras,

también se ha propuesto que la acción inhibitoria de los ácidos débiles podría ser debida a la inducción de una respuesta al estrés, energéticamente costosa, que atendería a restaurar la homeostasis y resultaría en la reducción de la energía disponible para el crecimiento y otras funciones metabólicas esenciales (Holyoak y col., 1996; Bracey y col., 1998). Por otra parte, además de considerar los efectos antimicrobianos de los ácidos orgánicos, debe tenerse en cuenta su influencia en el sabor y la acidez de un producto determinado. Al provenir de fuentes naturales podrían reemplazar a los sintéticos.

Los ácidos orgánicos están presentes naturalmente en las frutas o verduras y son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como aditivos, en particular, los ácidos cítrico, málico y tartárico por ser considerados GRAS (Generally Recognized As Safe) (Doores, 2005).

El ácido cítrico es un ácido tricarboxílico que tiene un sabor amargo agradable. Es altamente soluble en agua y realza el sabor de los alimentos a base de cítricos. Está aprobado para su uso en sorbetes y helados, bebidas, aderezos para ensaladas, conservas de frutas y mermeladas y jaleas, y se usa como acidulante en verduras enlatadas y productos lácteos. Es un precursor del diacetilo y, por lo tanto, mejora indirectamente el sabor y el aroma de una variedad de productos lácteos fermentados. El ácido cítrico también actúa sinérgicamente con los antioxidantes para prevenir la rancidez ya que puede quelar los iones metálicos (Gardner, 1972). La capacidad inhibitoria del ácido clorhídrico, cítrico, acético, láctico, propiónico y fosfórico se comparó en agar TSB para *Y. enterocolitica* basándose en la concentración de ácido, el pH y el grado de disociación. Una comparación de iguales concentraciones identificó al ácido cítrico como el de mayor acción antimicrobiana, seguido por clorhídrico, láctico, fosfórico, propiónico y acético (Brackett, 1987). Se logró la inhibición de *L. monocytogenes* en caldo de extracto de levadura de soja tripticasa (TSBYE) ajustado a pH 4,0 con ácido cítrico. El ácido cítrico a una concentración de 0,5% (pH 4,5) fue más efectivo que el ácido láctico (pH 3,4) para inhibir *Arcobacter butzleri* en un sistema acuoso (Phillips, 1999). El ácido cítrico fue particularmente inhibidor de los microorganismos ácidos aislados del jugo de tomate (Murdock, 1950).

La sumersión de frutas y hortalizas en baño de ácido cítrico durante su procesamiento no sólo retarda parte del deterioro, sino que también actúa como un quelante de los iones metálicos responsables de las reacciones enzimáticas de pardeamiento. Por ejemplo, muestras de repollo y zanahorias se pretrataron con un baño de ácido cítrico al 0,2% o al 1,0% durante 5 o 30 minutos respectivamente. Los productos se envasaron y se almacenaron a 4°C durante 10 a 21 días. Las muestras

pretratadas con ácido cítrico al 1% mostraron números totales de coliformes y recuentos de bacterias lácticas significativamente más bajos que las muestras sumergidas con la concentración más baja (Doores, 2005).

El ácido málico es inhibidor de hongos y bacterias, probablemente como efecto directo de la disminución del pH. El ácido málico es un ácido dicarboxílico no higroscópico muy soluble en agua. Tiene un sabor ácido fuerte, pero no tiene la misma acumulación de sabor ácido que otros ácidos. Se utiliza en helados, conservas de frutas, mermeladas, jaleas y bebidas, principalmente por sus características aromatizantes y acidificantes. También se encontró que el ácido málico fue capaz de inhibir a *Staphylococcus aureus* a pH 3,98 (Doores, 2005).

La acidificación de los alimentos antes del envasado a menudo se utiliza para reducir el tiempo de proceso térmico de los alimentos que son particularmente sensibles a los cambios en las cualidades sensoriales, como la textura o la apariencia. Los tomates enlatados acidificados con ácidos cítrico, fumárico o málico no cambiaron en sus atributos físicos o químicos durante el procesamiento en comparación con los tomates no acidificados (Schoenemann y López, 1973; Schoenemann y col. ,1974).

3.2.4 Antimicrobianos

Los aditivos alimentarios son aquellas sustancias naturales o artificiales que se agregan a los alimentos con el fin de preservar o mejorar sus cualidades, ya sea al conservarlos de la acción de los microorganismos, o mejorando su sabor, color o textura. Los conservantes son sustancias utilizadas en los alimentos para prevenir la acción de los microorganismos, a fin de evitar su deterioro y aumentar la vida útil. Podrían ser artificiales o naturales. Debido a la tendencia en los últimos años de los consumidores hacia productos más naturales, el estudio de los conservantes naturales se ha incrementado notablemente. Disminuir la ingesta de aditivos de origen sintético incentiva la búsqueda de compuestos naturales que los reemplacen total o parcialmente en la formulación de alimentos.

Dos ácidos orgánicos ampliamente utilizados en la industria alimentaria son el ácido sórbico y el ácido benzoico. El ácido sórbico (2,4-hexadienoico) y su sal de potasio son denominados, usualmente, sorbatos. Constituyen los preservadores de mayor importancia comercial y se los emplea en numerosas áreas, entre las que se encuentran la alimentación humana y animal, las áreas farmacéutica y cosmética. Su utilidad como

antimicrobianos depende de sus propiedades químicas, su reactividad, su solubilidad en agua y su estabilidad. Si bien el ácido sórbico es un compuesto presente en la naturaleza, como aditivo alimentario se emplea el obtenido por síntesis por cuestiones relacionadas a los costos de obtención y comercialización. En cuanto a la acción antimicrobiana de los sorbatos, los factores más importantes que afectan su efectividad son la aw, la presencia de humectantes, el pH del medio, las condiciones de almacenamiento y la presencia de otros componentes del alimento (Campos y col., 2011).

El ácido benzoico se encuentra también de forma natural en la canela, en las ciruelas y especialmente en los camemoros, un tipo de grosella muy popular en los países nórdicos. El ácido benzoico es un conservante activo en medio ácido, generalmente por debajo de pH 5,00, y en algunas especies solamente por debajo de pH 4,00. Es útil frente a bacterias, mohos y levaduras, especialmente frente a levaduras. Llega a inhibir el crecimiento de algunas especies con concentraciones de solamente 0,01%. Actúa inhibiendo el metabolismo del acetato y la fosforilación oxidativa. Es un conservante económico y por ello es muy utilizado a nivel industrial. Su principal inconveniente es que presenta una cierta toxicidad, por lo que se utiliza cada vez menos (Sullivan y col., 2020).

Entre los ejemplos típicos de antimicrobianos naturales pueden citarse los ácidos orgánicos, los aceites esenciales, las bacteriocinas y el quitosano. La mayoría de ellos son generalmente reconocidos como seguros (GRAS). Entre los antimicrobianos de origen natural que han sido aprobados y que se utilizan para ciertas aplicaciones pueden citarse la lisozima de la clara de huevo, el quitosano, la natamicina y la bacteriocina nisina (Devlieghere y col., 2004).

El quitosano es un biopolímero resultante de la deacetilación de la quitina (No y col., 2007), la cual es uno de los biopolímeros más abundantes de la Tierra y es el componente mayoritario de los caparazones de crustáceos, tales como cangrejos, langostas y langostinos. Además, representa una parte importante de los exoesqueletos de invertebrados y también puede ser encontrada en la pared celular de ciertos hongos. La actividad inhibitoria del quitosano frente a bacterias, hongos y levaduras depende de numerosos factores, entre ellos, el grado de deacetilación, el peso molecular, la temperatura, el pH del medio y la presencia de otros componentes (Devlieghere y col., 2004).

La nisina es un péptido con acción antimicrobiana producido por *Lactococcus lactis*. Esta bacteriocina es la única producida y comercializada a gran escala (Calo-

Mata y col., 2008). Su mecanismo de acción se caracteriza por la formación de poros en la membrana. Esta bacteriocina usualmente se compara con un detergente catiónico de superficie activa ya que la adsorción a la superficie celular es el primer paso para la posterior ruptura de la membrana.

Los aceites esenciales, compuestos aromáticos de origen natural, fueron utilizados en este trabajo como antimicrobianos naturales y se describen detalladamente en la Sección 4.

La mayor parte de los antimicrobianos, a las dosis permitidas por la legislación, actúan solamente inhibiendo el crecimiento microbiano y son usados como un factor más de conservación en combinación con otros factores de estrés para los microorganismos (Blanchard, 2000).

3.2.5 Tecnologías combinadas de preservación

La tecnología de obstáculos consiste en seleccionar y combinar factores de preservación o barreras de modo de garantizar la estabilidad y seguridad microbiológica, reteniendo las características nutritivas y la aceptación sensorial (Leistner, 1992). Este método usa varias barreras que separadamente pueden no dar una adecuada preservación, pero que cuando se las combina pueden brindar la protección necesaria. Las barreras pueden incluir la disminución de la temperatura, pH o actividad de agua (por adición por ejemplo de NaCl, azúcares o polioles), el calentamiento mínimo o la adición de antimicrobianos (Zalazar y col., 2019; Alzamora y col., 2015). Para que este concepto sea aplicado exitosamente, es necesario cuantificar la influencia de los distintos factores sobre el crecimiento microbiano.

El diseño inteligente de combinaciones de tecnologías puede utilizarse para demostrar las interacciones intrínsecas entre los factores de preservación. Las interacciones antagónicas pueden ocurrir cuando dos o más factores de preservación interactúan a modo de disminuir los efectos combinados esperados de las observaciones de la efectividad individual de dichos factores. Las interacciones sinérgicas ocurren cuando la combinación de factores de preservación produce una mayor acción inhibitoria que lo esperado por la acción individual de los factores. Los efectos aditivos están comprendidos entre las tendencias antagónicas y sinérgicas y se refieren a la inactivación obtenida cuando la combinación de las barreras resulta en la adición de las barreras aplicadas de manera separada. La selección racional de barreras

a aplicar en cuanto al tipo e intensidad, debiera resultar en una interacción sinérgica más que aditiva (Guerrero y col., 2015). Esto implica que se obtiene un método de preservación más efectivo a partir de la aplicación de factores de estrés de pequeña intensidad dirigidos a distintos sitios blanco, en vez de la aplicación de factores de estrés de baja intensidad dirigidos al mismo sitio blanco. La selección de los factores de estrés a combinar no es sencilla.

El concepto del uso de factores de stress combinados no sólo se aplica a la estabilidad microbiológica, sino que se hace extensivo a la calidad total.

3.3 Estabilidad fisicoquímica de jugos

Una vez que la fruta es cosechada para procesar, comienza una operación de extracción de jugo, que debe realizarse lo más rápido posible para minimizar el efecto de oxidación debido a las enzimas presentes naturalmente en las frutas. El método de extracción del jugo influye en las características fisicoquímicas y sensoriales del jugo resultante. Existen diferentes procedimientos según el tipo de fruta (FAO, 2001). En el procedimiento de extracción inevitablemente se ponen en contacto numerosos componentes y sistemas enzimáticos, originariamente alojados en diferentes compartimentos, que pueden determinar reacciones y variaciones negativas en el color, sabor y aroma.

Existen distintos tipos de prensado que afectan la calidad y el rendimiento del jugo obtenido (FAO, 2001). El prensado en frío involucra la utilización de una prensa hidráulica que lentamente extrae elevados niveles de nutrientes del producto gracias a la aplicación de una corriente de aire de muy baja temperatura. El mayor beneficio de esta metodología es que genera un jugo completamente libre de pulpa, lo cual lo hace muy fácil de digerir y absorber (Helms, 2014). Este tipo de prensado genera menor rendimiento y color más claro que el prensado en caliente. Éste último involucra la aplicación de calor durante un tiempo determinado y se obtiene un jugo con un color fuerte y homogéneo.

La juguera centrífuga es un tipo de extractor muy utilizado hoy en día a nivel doméstico. Se compone de un disco en el fondo de una cesta giratoria. Las paredes de la cesta están finamente perforadas por un tamiz para permitir el paso del jugo extraído por la rápida rotación de la cesta. Su sistema prensador permite retardar la oxidación de las frutas. Este dispositivo eléctrico gira rápidamente, entre 3000 y 10000 rpm, lo que

facilita la extracción de jugo, por un lado, que pasa a través del tamiz y de los residuos que permanecen en el interior, por otra salida. Este es el principio de la centrifugación (Mc Kellan y Padilla-Zakour, 2005; Manual Peabody).

Las operaciones post-extracción abarcan la clarificación enzimática, centrifugación, filtración, homogenización, desaireación, concentración, recuperación de aromas, pasteurización, almacenamiento y envasado. El tipo de operación a aplicar depende del tipo de jugo que se desee obtener.

4. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son compuestos aromáticos naturales, con actividades biológicas de amplio espectro (Asbahani y col., 2015). Se han utilizado como saborizantes, medicamentos o cosméticos, insecticidas, antioxidantes, antiinflamatorios y agentes anticancerígenos, entre otros (Seow y col., 2014; Dima y Dima, 2015). Se ha informado que muchos AE tienen una fuerte actividad antibacteriana y antifúngica, estimulando su aplicación también como antimicrobianos naturales en los alimentos (Burt, 2004). Esta aplicación ha ganado considerable atención en los últimos años, principalmente debido a la percepción negativa de los consumidores sobre los conservantes sintéticos (Seow y col., 2014). Sin embargo, la alta reactividad y la hidrofobicidad de los mismos representan un gran desafío para su incorporación directa en los alimentos.

La acción antimicrobiana de los AE involucra múltiples procesos dentro de la célula, en lugar de depender de un mecanismo específico, y está bien establecido que su acción se basa en su hidrofobicidad molecular. Los AE, principalmente a través de sus compuestos fenólicos, interactúan fuertemente con los lípidos de la membrana celular, aumentando la permeabilidad de la membrana, alterando las estructuras celulares originales, rompiendo la homeostasis y provocando la fuga de iones y contenido del citoplasma (Seow y col., 2014).

La actividad antimicrobiana observada para muchas nanoemulsiones de AE es más amplia que para los AE libres. La formulación de la nanoemulsión, el tamaño medio de las gotas y la carga superficial, influyen en el transporte del AE a la membrana celular, y en la interacción con los múltiples sitios moleculares de la membrana celular microbiana. Sin embargo, también se ha informado que las nanoemulsiones en algunos

casos pueden inhibir la actividad antimicrobiana de los AE (Donsi y Ferrari, 2015). En la siguiente sección se describe el modo de acción de los AE nanoemulsionados.

4.1 Nanoemulsiones de aceites esenciales

Con el fin de preservar su estabilidad, actividad biológica, mejorar su solubilidad y difusión, y, al mismo tiempo, minimizar el impacto sobre las propiedades sensoriales de los alimentos a los que se incorporan, los AE necesitan ser encapsulados, por ejemplo en emulsiones, para que sean compatibles con la matriz alimentaria (Buranasuksombat y col., 2011; Donsi y col., 2012, 2011).

La encapsulación de AE en nanoemulsiones, no sólo mejora la dispersabilidad en las matrices alimentarias y la estabilidad fisicoquímica del AE, sino también tiene un efecto significativo sobre su interacción con las células microbianas y su actividad biológica.

Las nanoemulsiones de AE han sido probadas *in vitro* frente a diferentes microorganismos, desde células bacterianas hasta hongos, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2, que resume algunas de las principales investigaciones reportadas hasta la fecha, clasificadas en términos de especies de microorganismos, componentes activos y formulaciones utilizadas.

La interacción con la membrana celular puede darse a través de cuatro rutas principales:

1. Una mayor área superficial y el transporte pasivo a través de la membrana celular exterior mejoran la interacción con las membranas citoplasmáticas (Donsi y col., 2012). Las pequeñas gotas de una nanoemulsión con superficies hidrófilas pueden atravesar la membrana celular a través de las proteínas porinas que sirven como canales transmembrana hidrófilos para las bacterias Gram- (Nazzaro y col., 2013). En el caso de bacterias Gram+ y células de levaduras, las gotas de la nanoemulsión contribuyen a colocar las moléculas de AE en contacto con sus sitios de acción (Majeed y col., 2016) y son capaces de llevar los AE a la superficie de la membrana celular, mejorando la accesibilidad a las células microbianas y permitiendo la alteración de la membrana celular, posiblemente alterando la integridad de la bicapa de fosfolípidos o interfiriendo con las proteínas de transporte activas alojadas en la bicapa de fosfolípidos (Moghimi y col., 2016). Por este motivo, la

comparación de la actividad antimicrobiana de nanoemulsiones específicas de AE frente a bacterias Gram+ y Gram- no presenta diferencias significativas. Por ejemplo, mientras que el aceite de tomillo libre requirió tiempos de incubación más cortos para inactivar *Listeria monocytogenes* (Gram+) que *Salmonella Enteritidis* y *Escherichia coli* (ambas Gram-), no se observaron diferencias significativas cuando se encapsuló el mismo AE usando un polisacárido de soja (Wu y col., 2014). De manera similar, no se observaron diferencias significativas en la cinética de inactivación del eugenol encapsulado contra *L. monocytogenes* y *E. coli* (Shah y col., 2013). Por el contrario, *Lactobacillus delbrueckii* (Gram+) exhibió una mayor resistencia que *E. coli* a diferentes AE encapsulados, como el aceite de árbol de té (Donsi y col., 2011), o el carvacrol, cinamaldehído y d-limoneno (Donsi y col., 2012), lo que podría sugerir que las nanoemulsiones también afectan a otras rutas de inactivación bacteriana.

2. La fusión de las gotas de emulsionante con la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular probablemente promueva la liberación dirigida de los AE en los sitios deseados. La evidencia de esta ruta proviene de la observación de que el uso de diferentes tensioactivos da como resultado una actividad antimicrobiana diferenciada a pesar del tamaño de gota similar, como en el caso del eugenol emulsionado por Tween 80 o SDS frente a *E. coli* (Li y col., 2015), o de aceite de tomillo emulsionado con almidón modificado o Tween 80 frente a *S. aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes* (Majeed y col., 2016). Además, algunos autores también han informado que las interacciones específicas entre el emulsionante y las membranas celulares aumentan la actividad antimicrobiana del AE (Salvia-Trujillo y col., 2014).
3. La liberación en el tiempo de los AE desde las gotas de nanoemulsiones prolonga la actividad de los mismos. Las gotas de nanoemulsión actúan como pequeños tanques, con moléculas de AE en equilibrio dinámico entre la fase oleosa dispersa y la fase acuosa. Además, el emulsionante también juega un papel importante al afectar, a través de mecanismos de formación de micelas, la solubilidad de los AE (Donsi y col., 2012).
4. La interacción electrostática de las gotas de nanoemulsiones cargadas positivamente con las paredes celulares microbianas cargadas negativamente aumenta la concentración de AE en el sitio de acción (Chang y col., 2015). Sin embargo, esta hipótesis sigue siendo controvertida, ya que en los casos en que se observó una mayor actividad antimicrobiana, el tensioactivo catiónico

utilizado también fue un potente antimicrobiano, como el arginato láurico (Chang y col., 2015; Xue y col., 2015). Además, también se informó que la carga de las gotas, en el caso del emulsionante aniónico, no afectó la actividad antimicrobiana del aceite de clavo (Majeed y col., 2016).

Probablemente, las diferentes rutas descritas coexistan. Por ello, se requieren más estudios para mejorar la comprensión de los mecanismos de acción de las nanoemulsiones de AE, para llegar a una formulación según el tipo de aceite esencial y de los microorganismos a inhibir (Donsi y Ferrari, 2016).

En general, la eficacia antimicrobiana de las nanoemulsiones de AE depende en gran medida de los componentes del mismo, la cepa microbiana probada y la formulación y el tamaño de gota de la nanoemulsión. Varios estudios también han abordado el efecto de las nanoemulsiones de AE en células de levadura, entre las que *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces cerevisiae* son las más investigadas. *Saccharomyces cerevisiae* requirió mayores tiempos de incubación que *Escherichia coli* (Tabla 2) cuando se expusieron a nanoemulsiones de carvacrol, cinamaldehído y d-limoneno (Donsy y col., 2012), y exhibieron una concentración inhibitoria mínima más baja para el d-limoneno encapsulado (Zhang y col., 2014).

El aceite esencial de menta tiene como componente principal al mentol, 45 – 70% de su composición química, y es el componente que le da su aroma característico y que además le confiere sus propiedades farmacológicas. Hay estudios que reconocen su efecto como astringente, antiséptico, estimulante, espasmolítico, antiviral, antifúngico, antibacteriano y antiinflamatorio, ampliamente usado en la industria farmacéutica de la higiene bucal y de la cosmética (De la Paz, 2006; Tonguino, 2011). El aceite esencial de menta fue efectivo en la disminución del crecimiento de dos patógenos transmitidos por alimentos, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* (Tassou y col., 1995).

El aceite esencial de lemongrass (LG) tiene un amplio espectro y una alta potencia antifúngica, tiene un sabor agradable y podría ser utilizado en alimentos como jugos de frutas (Mishra y Dubey, 1994; Tyagi y col., 2014; Lu y col., 2018). Recientemente, otros autores han reportado propiedades funcionales mejoradas de nanoemulsiones con aceite esencial de LG para aplicaciones cosméticas, como repelente de mosquitos (Nuchuchua y col., 2009) o para el tratamiento del acné (Faiyazuddina y col., 2009). Sin embargo, hay pocos datos reportados sobre la aplicación de nanoemulsiones de LG en alimentos.

Los aceites esenciales de corteza de canela (CC) y de hojas de canela (CH) se extraen de diferentes partes del árbol y tienen distintas propiedades. Ambos contienen trans-cinamaldehído y eugenol como sus componentes principales, CH tiene niveles más altos de eugenol y CC tiene niveles más altos de trans-cinamaldehído. La mayor actividad antifúngica del aceite esencial de CC con respecto al de CH está relacionada con el contenido de trans-cinamaldehído (Manso y col., 2013; Ribes y col., 2017).

El CC es el más estudiado aplicado a alimentos en una nanoemulsión. La incorporación de nanoemulsiones utilizando goma xántica como emulsionante con un nivel de 0,08 mg/g de aceite de CC a una mermelada de frutilla permitió su conservación frente a *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Zygosaccharomyces bailii* durante 28 días. Dicha incorporación no modificó la textura o el color del producto, pero afectó negativamente el aroma, el sabor y la aceptación general de la mermelada (Ribes y col., 2017). Una nanoemulsión de trans cinamaldehído y Tween 20 mostró inhibición de *Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus aureus* en un jugo de sandía (Jo y col., 2015).

La aplicación de nanoemulsiones de AE en la conservación de productos alimenticios es limitada principalmente por su sabor fuerte, ya que la concentración máxima aceptada por el consumidor, con bajo impacto sensorial, generalmente tiene escasa actividad antimicrobiana. Es por esto que es necesario combinar su eficacia con otro factor antimicrobiano.

Tabla 2. Formulaciones de nanoemulsiones de aceites esenciales ensayadas frente a diferentes microorganismos. Adaptado de Rubio-Ríos y col. (2019).

Aceite Esencial	Microorganismo	Formulación de nanoemulsión	Referencias
Carvacrol	<i>Escherichia coli</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aceite de girasol, éster de azúcar / Tween 20, monooleína, lecitina, proteínas de guisante	Donsi y col. (2012)
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Triglicéridos de cadena media / Tween 20	Terjun y col. (2012)
Cinamaldehído	<i>E. coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Tween 20	Jo y col. (2015)
Eugenol	<i>Staphylococcus aureus</i>	Aceite de sésamo – Tween 20/80	Ghosh y col. (2014)
	<i>E. coli</i>	Proteínas de suero, maltodextrina	Shah y col. (2013)
α -limoneno	<i>E. coli</i>	Tween 80	Zhang y col. (2014)
	<i>S. cerevisiae</i>	Aceite de girasol, éster de azúcar/ Tween 20, monooleína, lecitina y pr	Donsi y col. (2012)
Clavo de olor	<i>Salmonella enteritidis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Proteínas de suero, goma arábica, lecitina, proteínas de guisante	Luo y col. (2014)
Lemongrass	<i>E. coli</i>	Tween 80, alginato de sodio	Salvia-Trujillo y col. (2015)
Menta	<i>S. aureus</i> <i>L. monocytogenes</i>	Triglicéridos de cadena media, almidón modificado	Liang y col. (2012)
Hojas de canela	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Tween 80	Ghosh y col. (2013)
Corteza de canela	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium expansum</i>	Goma xántica	Ribes y col. (2017)
Tomillo	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Aceite de maíz, Tween 80, arginato láurico	Chang y col. (2012, 2015)

4.2 Impacto sensorial de los aceites esenciales

La aplicación de nanoemulsiones de AE en productos alimenticios aún es un desafío. La gran cantidad de microorganismos patógenos y deteriorativos que contaminan los alimentos exige un amplio espectro de actividad de los sistemas antimicrobianos. A veces algunas nanoemulsiones de AE desarrolladas pueden apuntar a un tipo de microorganismo más que a otro. Además, las moléculas altamente reactivas que constituyen los AE pueden degradarse por la interacción con otros ingredientes alimentarios (proteínas, lípidos y minerales), o pueden adsorberse en las múltiples interfaces presentes en los alimentos, lo que resulta en una distribución desigual, perdiendo la eficacia antimicrobiana (Gyawali e Ibrahim, 2014). Generalmente, se requiere una mayor concentración de AE para obtener la misma eficacia en los alimentos que en los medios sintéticos (Seow y col., 2014).

A pesar de la actividad antimicrobiana de los aceites, en general se ha encontrado que en un alimento el medio es más favorable para el crecimiento de microorganismos, y, por lo tanto, se necesita una mayor concentración de aceite esencial para lograr el mismo efecto inhibitorio en el alimento (Shelef, 1983; Smid y Gorris, 1999). Esto puede deberse a que al haber mayor disponibilidad de nutrientes en los alimentos en comparación con los medios de laboratorio las bacterias pueden reparar los daños celulares más rápidamente (Gill y col., 2002). Existen estudios que han registrado el efecto de los alimentos sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y se cree que las propiedades intrínsecas del alimento como el contenido de agua, proteínas, grasas, antioxidantes, acidez y otros aditivos, así como factores extrínsecos como la temperatura de almacenamiento, las condiciones del envasado del producto y características propias de los microorganismos pueden influir en este aspecto (Burt, 2004). Tserennadmid y col. (2011) encontraron una menor MCI para los aceites esenciales de enebro, salvia, limón y mejorana en un medio acuoso de extracto de malta que en jugo de manzana y en leche descremada. La misma tendencia de una menor MCI de cinamaldehído en caldo Sabouraud que en jugo de manzana frente a dos cepas de *Z. baillii* fue observada por Loeffler y col. (2014), probablemente debido a una interacción entre los grupos funcionales de los AE y los ingredientes del jugo.

Adicionalmente, la alta volatilidad, reactividad, olor y sabor de los AE también pueden causar un gran impacto negativo en las propiedades sensoriales del producto, dando como resultado características no deseadas (Gyawali e Ibrahim, 2014; Kim y col., 2013). Por ello, el uso de AE en la conservación de productos alimenticios es limitado principalmente por su sabor fuerte. Un nivel de clavo de olor agregado a una mermelada

de tomate, adecuado desde el punto de vista sensorial, no fue suficiente para inactivar el desarrollo de *Z. bailii*, por lo tanto la adición de AE podría ser útil como factor de estrés adicional a otras barreras frente a una contaminación post proceso (Gliemmo y col., 2015).

Un estudio mostró que el impacto de los AE en el producto depende significativamente de su compatibilidad con los alimentos y, en particular, de la correspondencia de los componentes de los AE con las características fisicoquímicas del producto alimenticio (Espina y col., 2014). Por ejemplo, pruebas sensoriales mostraron que el AE de limón era aceptable en concentraciones más altas que otros AE (menta, tomillo y romero) en jugo de tomate, sopa de verduras o hamburguesas de aves de corral, debido a la mayor apreciación del sabor agrio parecido a cítrico (Espina y col., 2014).

5. Yacón, origen, composición, propiedades, aplicaciones y beneficios de su consumo

El yacón (*Smallanthus sonchifolius*) es un cultivo tuberoso poco utilizado en la actualidad (Figura 12). Pertenece a la familia de plantas Asteraceae y, aunque se originó en la región andina, principalmente en Perú, los pueblos originarios extendieron su cultivo desde Ecuador y Colombia, hasta el noroeste argentino convencidos de su potencial para aliviar dolencias. Se ha cultivado en otras regiones como Argentina, Brasil, Alemania y Japón. Con flores amarillas, similares a las margaritas o girasol, el yacón es una planta que crece desde hace siglos en la Cordillera de los Andes. De hecho, durante el período prehispánico el consumo de sus raíces fue muy popular. Tradicionalmente es cultivado a 2000-3000 msnm y la altura de la planta puede alcanzar de 1,0 a 2,5 m. Es una planta resistente que puede crecer en climas adversos, en condiciones de calor y frío. Sus raíces, de aspecto similar a la batata, son comestibles y su pulpa, de color amarillo anaranjada, se presenta de sabor dulce, suave y rica en agua. Puede consumirse como fruta, mermeladas, caramelos y té. Posee gran valor nutricional, asociado, principalmente, a la presencia de fructooligosacáridos.

En Jujuy, los productores de la comunidad de Chorrillos-Bárcena, al sur de la Quebrada de Humahuaca, han desarrollado una agroindustria en base a la recuperación y revalorización del Yacón. Para recuperar el cultivo, los agricultores de esta región rescataron las tecnologías agrícolas tradicionales que eran económicamente

sustentables y amigables con el ambiente. Durante mucho tiempo el cultivo y venta en fresco del yacón había sido una fuente de prosperidad para los pobladores de Chorrillos-Bárcena. La estación Bárcena del ferrocarril Belgrano era uno de sus mercados principales. Con el cierre del tren en la década del 90, la tradicional actividad se desmoronó y la comunidad sufrió las consecuencias de la desocupación y empobreciendo de la zona.

A comienzos del año 2000, se descubrió que en Bárcena existían 5 productores que aún conservaban un pequeño número de plantas. Con este pequeño pero gran aporte fue posible iniciar un proceso de recuperación del cultivo, y a través de él, una revalorización de la identidad local. Para la recuperación, la comunidad Chorrillos-Bárcena puso en marcha un proyecto que contó con el apoyo de la Fundación para la Conservación de las Especies (FUCEMA), que se dedica a la conservación de la biodiversidad de los cultivos andinos. Esta iniciativa recibió financiamiento del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, a través del Consejo Federal de Ciencia y Tecnología (COFECyT), para que la actividad recuperara la productividad perdida. El proceso de recuperación se basó en dos ejes principales. Por un lado, se creó un Centro de Desarrollo de Tecnologías Productivas en la comunidad para potenciar la recuperación productiva desarrollando opciones de agregado de valor a los productos y para afrontar los desafíos que impone el mercado. Por otro lado, se fundó un Centro de Formación en Prácticas de Transformación que se propuso actuar como diseminador de prácticas y conocimientos entre los agricultores locales (MINCYT,2013).

Con esta organización fue posible que la comunidad de Chorrillos-Bárcena generara innovaciones tecnológicas y desarrollara productos derivados del yacón mediante procesos participativos. Además, desarrollaron tecnologías y prácticas sencillas que fueron fácilmente apropiables por la comunidad.

De esta manera, la iniciativa destacó las capacidades de organización, distribución de roles y gestión participativa y acompañó los logros obtenidos con un espacio de capacitación, reflexión y motivación entre los productores. Además, la iniciativa fue diseñada para fomentar la transferencia de conocimientos a la comunidad Chorrillos-Bárcena y, a la vez, para que sea una experiencia que pueda ser replicada en otras comunidades.

A raíz de una solicitud en el año 2011 del Ministerio de Producción del Gobierno de Jujuy, en la cual se solicitó a la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) incorporar la raíz de Yacón en el Código Alimentario Argentino a la lista de especies contenidas en el Capítulo XI Alimentos Vegetales y debido a la necesidad de incorporar el Yacón al

CAA para que dicha especie pueda ingresar al mercado formal dada la demanda potencial a nivel nacional e internacional de los productos que sólo se elaboraban a nivel regional, en 2013 se incorporó el cultivo al CAA en el artículo 830 bis. Aún está pendiente la incorporación de productos elaborados a base de yacón como jugos y mermeladas (CONAL, 2011).

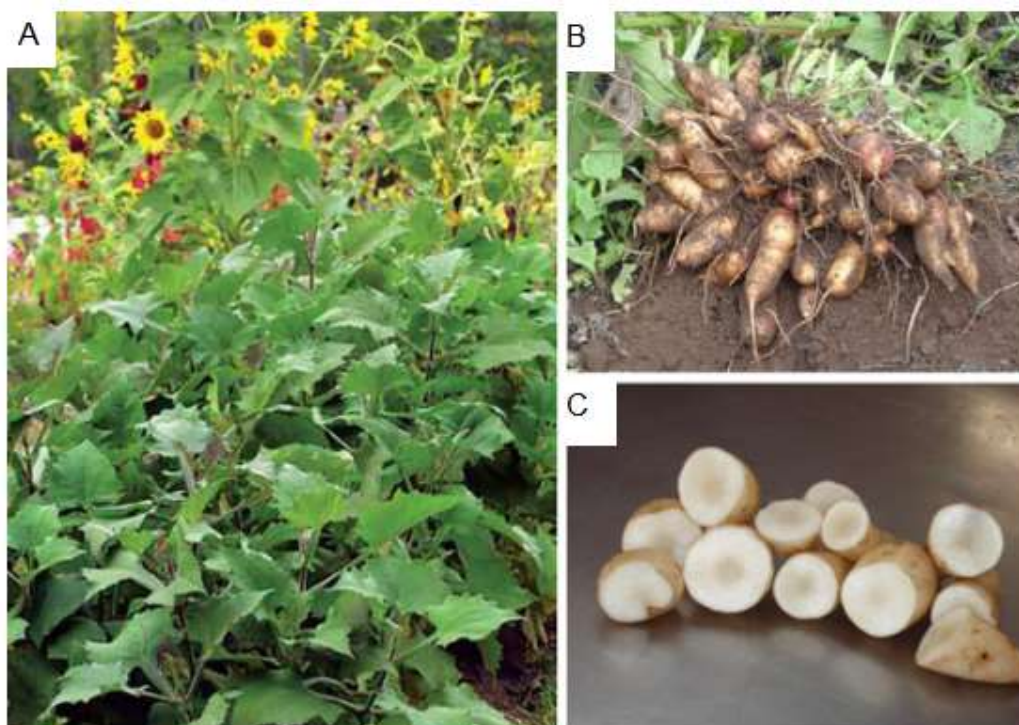


Figura 12. Planta de yacón. Panel A: órganos vegetativos y reproductivos. Panel B: raíces de yacón. Panel C: raíces de yacón cortadas en rodajas. Adaptado de Choque Delgado y col. (2013).

Su producción e investigación se han incrementado últimamente en distintos lugares del mundo, por su potencial alimentario y comercial en diversos mercados: frutas y verduras, productos naturales, medicinales, regionales y/o exóticos. Sus tecnologías de producción no son complejas; se puede cultivar en pequeña escala, sin agroquímicos, asociado a otros cultivos y componentes forestales, y es posible aprovechar tanto sus raíces, hojas e incluso el tallo.

5.1 Propiedades nutricionales del yacón

Las propiedades nutricionales del yacón están relacionadas con la zona de cultivo. Al crecer en diferentes altitudes que van desde el nivel del mar hasta 3500 msnm., y para obtener una buena producción de raíces se necesitan suelos ricos de materia orgánica, fertilizados, bien drenados, pudiéndosele cultivar con otras hortalizas. Por lo tanto, las características agronómicas, el tipo de suelo, las condiciones climáticas, ecológicas, el uso o no de fertilizantes y las técnicas aplicadas de cultivo influyen en la producción y en el contenido de nutrientes presentes en la raíz del yacón, y puede resultar en diferencias en la cantidad de nutrientes que puedan presentar las muestras procedentes de distintas zonas (Muñoz y col., 2006).

El yacón tiene un alto contenido de inulina, fructoligosacáridos (FOS) fibra dietaria con propiedades prebióticas (Castro y col., 2017) y compuestos fenólicos que regulan el azúcar. El consumo de FOS mejora el crecimiento de microorganismos beneficiosos en el colon (principalmente *Bifidus* y *Lactobacillus*), mejora la absorción de minerales y el metabolismo gastrointestinal y desempeña un papel en la regulación del colesterol y la glucemia. Además, facilita la asimilación del calcio, lo que contribuye en la prevención de la osteoporosis, mejora el funcionamiento del sistema inmunológico, regula la presión arterial y previene la arteriosclerosis.

Además, algunos investigadores también han confirmado la presencia de compuestos fenólicos tanto en las hojas de yacón como en las raíces tuberosas. En comparación con otras raíces y tubérculos, las raíces de yacón tienen mayor cantidad de compuestos fenólicos, aproximadamente 200 mg / 100 g de materia fresca comestible (Simonovska y col., 2003; Valentova y Ulrichova, 2003; Takenaka, 2003). Algunos de los compuestos identificados son el ácido cafeico y sus derivados, el ácido clorogénico y el L-triptófano.

Se han reportado valores de contenido de *proteína* en el rango de 2,0 a 5,0 %, contenido de *fibra* variable entre 0,4 y 3,3%. En general, no aporta cantidades significativas de *grasa*, que van del rango de 0,05 a 0,87%. Tiene un alto contenido de *carbohidratos*, entre 92,0 y 95,5 % y un contenido de *humedad* de 83,5 a 88,8% (Manrique, 2005).

5.2 Alimentos a base de yacón

En el mercado local no hay oferta de alimentos a base de yacón y en el noroeste de Argentina se pueden encontrar sólo algunos productos como harina de yacón, láminas de yacón disecadas, té de hojas de yacón y mermelada. Por ello, resulta interesante, por un lado, ampliar la oferta de alimentos a base de yacón, con alta vida útil, aumentando la disponibilidad del mismo en todo momento del año, y por otro, aportar alimentos potencialmente funcionales para la población. De esta manera se agregaría valor al cultivo de yacón. Las características sensoriales como su sabor dulce y textura crujiente, similar a peras o manzanas, facilita la incorporación en productos alimenticios especialmente bebidas.

5.3 Jugo de yacón

En los últimos años, ha habido una tendencia del mercado hacia el desarrollo de productos innovadores para la industria alimentaria. Entre ellos, se destacan los alimentos y bebidas “funcionales” (Salvia-Trujillo y col., 2011). Las nuevas bebidas funcionales a base de frutas tropicales son cada vez más populares debido a sus efectos beneficiosos para la salud y son ampliamente aceptadas por los consumidores. Para la comercialización exitosa de estos productos es importante la tecnología utilizada para su conservación, los ingredientes y la formulación (Granato y col., 2010).

Además de los compuestos antioxidantes de las frutas, otra clase de compuestos que se ha destacado en el área de los “alimentos funcionales” son los fructooligosacáridos (FOS). Por sus características, la incorporación de yacón en bebidas de frutas se convierte en una estrategia viable, siendo sumamente interesante en la diversificación de alimentos considerados “funcionales”.

Las raíces de yacón tienen propiedades potencialmente promotoras de la salud, incluidos efectos prebióticos, antidiabéticos, antioxidantes y antimicrobianos (Ojansivu y col., 2011). La mayoría de los efectos beneficiosos del consumo de yacón se han atribuido a su contenido de compuestos fenólicos, antioxidantes y prebióticos (FOS). El desarrollo de un jugo de yacón permitirá diversificar los productos prebióticos en el mercado, además de ser una fuente importante de compuestos antioxidantes.

5.3.1 Bagazo de yacón como crioprotector de células microbianas

El bagazo de yacón es un subproducto de la extracción del jugo que posee altos niveles de FOS y de fibra incluso después de la deshidratación. Estos compuestos resultan de interés en procedimientos de secado spray y liofilización de células microbianas en los que se utilizan como sustancias protectoras. Los FOS se consideran prebióticos y se ha demostrado, *in vitro*, los efectos prebióticos de los FOS del yacón, ya que fueron fermentados selectivamente por bifidobacterias y lactobacilos (Pedreschi y col., 2003; Ojansivu, 2011; Campos y col., 2012).

5.3.2 Compuestos antioxidantes

El gran aumento de enfermedades crónicas y degenerativas en países desarrollados ha producido un gran interés en la prevención de estas enfermedades. De acuerdo a estudios epidemiológicos, se ha comprobado que las dietas ricas en frutas y verduras y, principalmente, la dieta que siguen los países mediterráneos europeos (Dieta Mediterránea), pueden prevenir el desarrollo de estas enfermedades, debido a la presencia de diversos compuestos bioactivos como la fibra dietaria y los compuestos antioxidantes (Vicent-Baudry y Deffort, 2005).

Los compuestos polifenólicos son un amplio grupo de metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas. Estos compuestos son capaces de prevenir procesos degenerativos asociados a un exceso de radicales libres del organismo por su actividad antioxidante (Namiki, 1990). Se puede decir que los compuestos antioxidantes son “aquellas sustancias que, en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando grandemente la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas” (Chipault, 1962).

5.3.3 Desarrollo de pardeamiento enzimático del yacón

Debido a su alto contenido de enzimas polifenolasas, después de pelar y cortar, la pulpa del yacón se oscurece rápida e intensamente, haciendo que el producto final sea sensorialmente inaceptable para el consumidor. La utilización de métodos de inactivación enzimática de bajo costo que permitan la obtención de jugo de yacón con buenas características sensoriales y el mantenimiento de sus componentes funcionales

(FOS) es fundamental para el desarrollo de una bebida sensorial y nutricionalmente aceptable. Hay varios métodos de inactivación enzimática como la adición de sulfitos o ácidos orgánicos, como ácido cítrico, y tratamiento térmico. Sin embargo, la solubilidad de FOS aumenta notablemente con las altas temperaturas, perdiéndose en el agua del baño. El sulfito, a su vez, ha sido objeto de muchas críticas, por lo que su uso se ha vuelto cada vez más limitado, además de ser alérgeno (Dionisio y col., 2013). De esta manera, el tratamiento con ácido se presenta como un paso esencial en el procesamiento de la raíz de yacón, y el tiempo de tratamiento y la concentración del ácido son factores críticos, ya que, altas concentraciones de ácido y tiempos prolongados, pueden causar grandes pérdidas en los niveles de FOS debido a la hidrólisis ácida de este carbohidrato (Ojansivu y col., 2011).

Vasconcelos y col. (2015) estudiaron diferentes agentes anti-pardeamiento (L-cisteína, metabisulfito de sodio, ácido ascórbico, ácido cítrico y EDTA) y otros aditivos que no se utilizan comúnmente como agentes anti-pardeamiento (ácidos málico, succínico, láctico y tartárico) para controlar el pardeamiento enzimático en yacón mínimamente procesado, almacenado a 5°C, en envases de aire o atmósfera modificada con nitrógeno gaseoso. Lograron observar una estabilidad del color de 17 días para yacón procesado tratado con los ácidos ascórbico, cítrico y tartárico, para ambos tipos de envasado. Por lo tanto, el uso de estos ácidos son opciones prometedoras para controlar el pardeamiento enzimático del yacón mínimamente procesado.

5.3.3.1 Índice de pardeamiento

El color de un alimento es un factor determinante de la apariencia, además un importante atributo sensorial, cuya percepción es el primer paso en la evaluación de los alimentos por parte del consumidor y el mismo condiciona su elección. Esto se debe a que el consumidor no puede evaluar la calidad microbiológica y nutricional de forma inmediata. El color marrón es el predominante en procesos de pardeamiento y es el indicador cromático de la degradación de productos alimenticios. Por lo tanto, el color es indicativo de la calidad ya que pone en evidencia numerosas reacciones de deterioro, las cuales, de ocurrir, generan pigmentos marrones, dando un aspecto desagradable al producto y alterando su calidad nutricional. En estas reacciones de deterioro participan enzimas, azúcares, compuestos nitrogenados y vitaminas, entre otros. Estos compuestos reaccionan generando nuevas sustancias sin valor nutricional. El deterioro

debido a cambios de color de los jugos se debe principalmente a reacciones de degradación del ácido ascórbico y a las reacciones de pardeamiento enzimático.

El color puede ser definido con tres atributos: claridad, tono o matiz y saturación. La claridad es el atributo que hace corresponder a cada color una equivalencia con respecto a una escala de grises. A la cualidad psicológica claridad le corresponde la magnitud psicofísica luminosidad. El tono o matiz es el atributo que adjudica al color una cualidad que se define como rojo, naranja, amarillo, verde, azul, púrpura o cualquier combinación de ellos. A la cualidad psicológica tono le corresponde la magnitud psicofísica longitud de onda dominante. La saturación es el atributo que, fijado el tono, describe al color por su similitud con un color espectral puro, cuanto más parecido a este, tanto más saturado. A la cualidad psicológica saturación le corresponde la magnitud psicofísica pureza. Una descripción cuantitativa de un color puede ser dada en los términos de los estos tres atributos del color.

De los sistemas propuestos para la especificación del color el más difundido universalmente es el de la CIE (Comisión Internationale de l'Eclairage), en el cual el color es indicado por tres variables X, Y, Z, conocidas como los valores triestímulo y que representan a tres colores primarios imaginarios (relacionados con el verde, el rojo y el azul). Una manera habitual de representar el color es calcular las coordenadas cromáticas x, y a partir de los valores triestímulo, mediante las siguientes ecuaciones:

Ecuación 5

$$x = \frac{X}{X+Y+Z}$$

Ecuación 6

$$y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

El color definido por (x,y) se representa en el diagrama cromático CIE (Figura 13) donde sólo tiene lugar la cromaticidad del color en cuestión. Para que la especificación del color sea completa, eventualmente se utiliza la luminosidad Y como tercera coordenada, en un plano perpendicular que representa la propiedad de reflejar más o menos luz (Kelly, 1943).

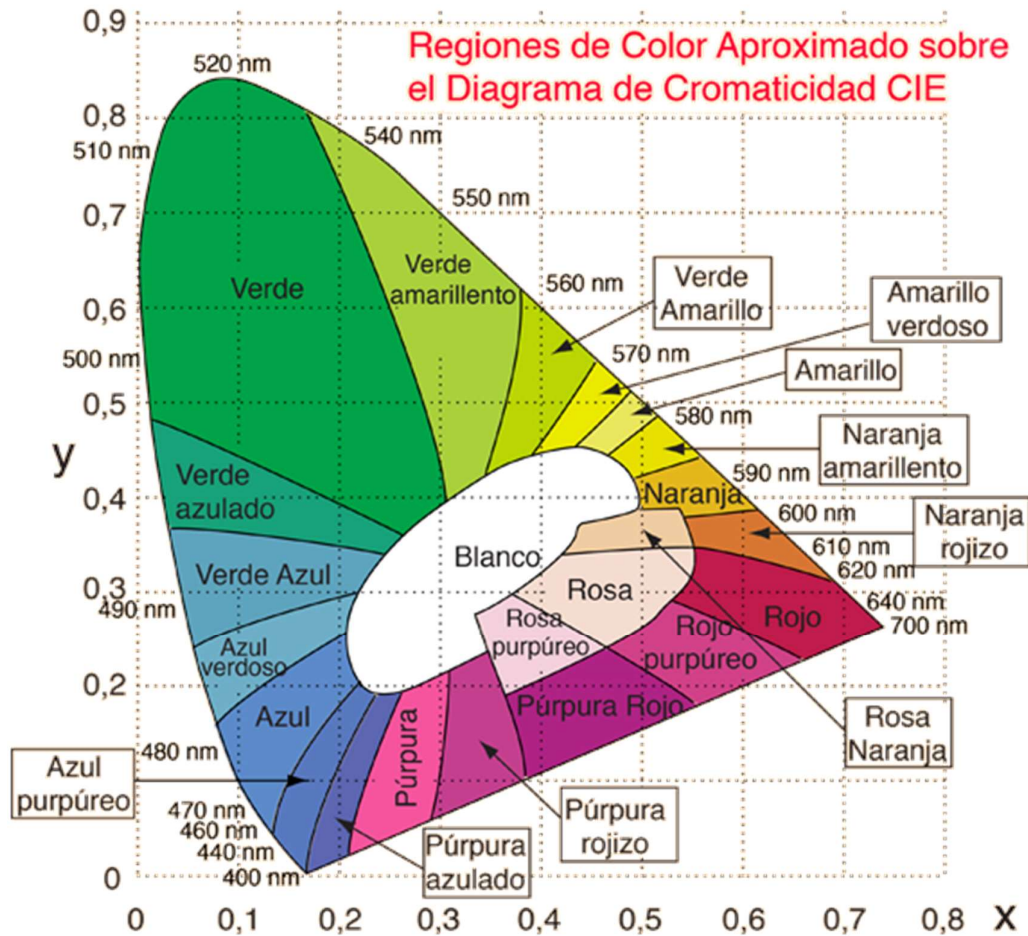


Figura 13. Diagrama cromático CIE.

El desarrollo de pardeamiento de una muestra puede seguirse mediante la evaluación del índice de pureza y, por consiguiente, de la saturación. Del índice de pureza surge la función Índice de Pardeamiento (IP) (Buera y col., 1986), la cual presenta una relación lineal respecto al grado de pardeamiento. Dicha función está basada en la determinación de la pureza del color marrón y presenta la siguiente expresión:

Ecuación 7

$$IP = \frac{100 \cdot (x - 0,31)}{0,172}$$

donde x es la coordenada cromática definida por la Ecuación 5; 0,31 es la coordenada cromática del iluminante C y, 0,172 es la diferencia entre la coordenada cromática del color puro espectral y la coordenada cromática del iluminante C.

5.3.4 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial de un alimento está compuesta por un conjunto de técnicas de medición de las respuestas humanas hacia los alimentos, reduciendo al mínimo los efectos potenciales de sesgo debido a la identidad de marcas u otra información que pueda influir sobre la percepción del consumidor. Tiene como objetivo, tratar de aislar las propiedades sensoriales de los alimentos en sí mismos y proporcionar información importante y útil a desarrolladores de producto, científicos y gestores sobre las características sensoriales de sus productos.

Si bien los instrumentos son efectivos en muchos casos, no pueden medir ni reemplazar la percepción sensorial. En el momento en que un alimento se contempla, se huele y se introduce en la boca se desencadenan una serie de efectos que están relacionados entre sí y que dependen de la intensidad y calidad del estímulo que los provoca, de las características de los receptores sensoriales y de la atención y conocimientos básicos del individuo. El éxito depende de la proximidad lograda entre el estímulo y la respuesta dada por el individuo a la sensación percibida (Espinosa Manfugás, 2007).

Cuando se utiliza a las personas como instrumento de medida, es necesario controlar todas las condiciones de las pruebas a realizar para evitar los errores causados por factores fisiológicos, psicológicos y culturales por parte del sujeto; factores ambientales que puedan alterar el juicio por parte del sujeto y factores inherentes al alimento (por ejemplo: intensidad del estímulo inferior a la sensibilidad del individuo). Cuando se habla de error no precisamente se habla de un juicio equivocado sino que se incluye a todos los factores antes mencionados.

Cuando en la evaluación sensorial se utiliza un panel de consumidores, los mismos no tienen ningún tipo de entrenamiento, se eligen al azar teniendo en cuenta que sean consumidores del producto que van a evaluar. Son ideales para evaluar la aceptabilidad de un producto pudiendo también evaluar la intensidad de atributos en escalas simples siguiendo determinadas consignas en la elaboración del formulario que deben completar.

Los métodos de medición sensorial comprenden una amplia gama de pruebas de evaluación. La elección de los mismos se basa en los objetivos del proyecto y en la disponibilidad de personas y material a utilizar. Stone y Sidel (1993) han clasificado los métodos más frecuentes que se utilizan en tres grandes categorías:

- Pruebas discriminativas: determinan si dos muestras son perceptiblemente diferentes.

- Pruebas descriptivas: describen detallada y objetivamente al producto en términos de sus atributos y/o defectos sensoriales. Permiten obtener una descripción completa del producto, ayuda a identificar ingredientes y variables de proceso, y/o determinar que atributos sensoriales son importantes para su aceptación. La intensidad con que se manifiesta cada atributo se expresa por un valor asignado a una escala de medida.

- Pruebas afectivas: el objetivo primario en este tipo de pruebas es evaluar la aceptabilidad global o preferencia de un producto. Las pruebas afectivas siguen, en general a estudios discriminativos y /o descriptivos y son previas a un estudio de mercado. Emplean consumidores del producto que se ha de evaluar.

Dentro de las pruebas afectivas, se encuentran el test de aceptabilidad y el test de preferencia. Ambos están basados en una escala hedónica. La misma consiste en la evaluación del producto en una escala de categorías de agrado y desagrado por un determinado producto, la cual podrá ser balanceada entre dichas categorías o, desbalanceada hacia la zona de gusto o de disgusto. Se presenta una o varias muestras a los consumidores, en la que deberán evaluar la impresión global sobre una escala y volcar su juicio en una planilla. Estos ensayos son útiles para diagnosticar problemas imperceptibles en el laboratorio antes de investigaciones de mercado más costosas y debido, a que los tests se realizan con consumidores “blanco”, es decir, hacia quienes está dirigido el producto, la información que surge es sustentable y valorable en defensa de sus competidores. La escala hedónica de 9 puntos es muy utilizada dado que presenta una categoría central neutral y una escala marcada con adverbios desde por ejemplo, “me gusta extremadamente” hasta “me disgusta extremadamente” donde cada escalón representa cambios en un tono hedónico, lo cual lo hace muy adecuado para el análisis estadístico (Lawless y Heymann, 2010).

Debido al impacto sensorial negativo que pueden tener los AE en los alimentos, no sólo se debe buscar un AE compatible con la matriz alimentaria, sino también un nivel sensorialmente aceptable que a la vez sea efectivo como antimicrobiano. Una manera de encontrar este equilibrio es realizar, en primer lugar, un análisis sensorial

para descartar concentraciones altas de AE que no sean aceptadas por consumidores. Sánchez-Rubio y col, (2016) seleccionaron la concentración máxima de AE de hojas de canela aceptada por consumidores en jugo de naranja y jugo de granada. Para ello, evaluaron sensorialmente muestras de los jugos con diferentes concentraciones de AE de hojas de canela y se les pidió que describieran las diferencias entre las muestras utilizando una escala hedónica de 10 puntos, donde 1 significa que no les agrada mucho y 10 que les gusta mucho, eligiendo puntuación de 5 como el umbral mínimo para la aceptabilidad de las muestras. Todos los panelistas rechazaron todas las muestras de concentraciones mayores a 0,04 mg/ml del AE. Estas observaciones se relacionaron con cambios significativamente negativos en el aroma y el sabor de ambos jugos. La concentración máxima aceptada por los panelistas (0,02 mg / ml) se utilizó para estudiar la inactivación de *S. cerevisiae* en ambos jugos.

Objetivos

Objetivos generales

- Aportar conocimientos acerca del efecto de las interacciones entre aditivos e ingredientes sobre el crecimiento microbiano y sobre la efectividad de los aceites esenciales.
- Dar valor agregado al yacón, fuente de fructo-oligosacáridos y con gran capacidad antioxidante.

Objetivos específicos

- Evaluar la acción antimicrobiana de aceites esenciales frente al desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii*, una levadura causante de deterioro en jugos ácidos.
- Elaborar nanoemulsiones estables de aceites esenciales con actividad antimicrobiana, con tamaño de gota nanométrico y evaluar el efecto de distintos emulsificantes.
- Evaluar el efecto de la metodología de emulsificación de los aceites sobre su acción inhibitoria.
- Analizar el efecto del acidulante, del pH y de la actividad de agua sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones a fin de detectar efectos sinérgicos que permitan minimizar su concentración.
- Evaluar la existencia de interacciones entre las nanoemulsiones que sinergicen la acción antimicrobiana de las mismas.
- Evaluar el efecto de los aceites sobre la pared celular de la levadura.
- Optimizar la elaboración de un jugo de yacón mediante el estudio de factores que aseguren su calidad microbiológica y sensorial.
- Evaluar el efecto de la presencia del jugo de yacón sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones de aceites esenciales.
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones en el jugo.
- Estudiar la existencia de interacciones entre las nanoemulsiones sobre su acción antimicrobiana en el jugo a fin de hallar combinaciones sinérgicas.
- Evaluar el efecto de la presencia de xilitol sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones en el jugo de yacón.
- Evaluar el efecto de la nanoemulsion de lemongrass sobre la aceptabilidad sensorial del jugo de yacón.

- Estudiar el efecto de la temperatura de almacenamiento y de la presencia de la nanoemulsión de lemongrass sobre la estabilidad microbiológica del jugo de yacón.
- Estudiar las propiedades crioprotectoras del residuo de yacón resultante de la elaboración del jugo frente a bacterias de interés industrial.
- Determinar la composición química, el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de la formulación final del jugo de yacón.

Materiales y métodos

Reactivos y medios de cultivo

Los reactivos y medios de cultivo que se utilizaron se detallan a continuación. Los aceites esenciales (Euma S.A., Buenos Aires, Argentina) que se utilizaron se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Listado de aceites esenciales utilizados.

Aceite esencial	Nombre científico
Albahaca	<i>Osimum basilicum</i>
Bergamota	<i>Citrus aurantiuml. subsp. bergamia</i>
Corteza de canela	<i>Cinnamomum verum</i>
Hojas de canela	<i>Cinnamomum verum</i>
Estragón	<i>Artemisia dracunlus</i>
Eucalipto	<i>Eucalyptus citriodora</i>
Jengibre	<i>Zingiber officinal</i>
Laurel	<i>Laurus nobilis</i>
Lavanda	<i>Lavandula latifolia</i>
Lemongrass	<i>Cymbopogon citratus</i>
Menta	<i>Mentha piperita</i>
Naranja	<i>Citrus sinensis dulcis</i>
Pomelo	<i>Citrus paradisi (var. rouge la toma)</i>
Salvia	<i>Salvia officinalis</i>

- Ácidos ascórbico, cítrico anhidro y málico (Anedra S.A., Buenos Aires, Argentina)
- Ácido gálico (Merck, Alemania)
- Agar para recuento en placa (PCA), Bilis Rojo Violeta con Lactosa (VRBL) y Sabouraud, agua peptona, caldos Sabouraud y de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (BiokarDiagnostics, Beauvais, Francia)
- Etanol (Anedra, Argentina)
- Goma arábica (Cargill, Argentina)
- Glicerol (Sintorgan S.A., Buenos Aires, Argentina)
- Indicador (INT): Cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (Sigma Aldrich, Estados Unidos)
- Mediador de electrones (MDE): 2-metoxi-1-4 naftoquinona (Sigma Aldrich, Estados Unidos)
- Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich, Estados Unidos)

- Reactivo de fosfomolibdato/ fosfotungstato (Folin-Ciocolteu, Sigma Aldrich, Alemania)
- NaOH, H₂SO₄, HCl (Sigma Aldrich, Estados Unidos)
- Solución etanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (0,16 mM, Merck, Alemania). Solución de Na₂CO₃ (20%) (Anedra, Argentina)
- Yacón (Comunidad Aborigen Los Chorrillos, Dpto de Tumbaya, Jujuy, Argentina)
- Tween® 80 y Tween® 20 (Anedra S.A., Buenos Aires, Argentina)
- Xilitol (Cargill, Argentina)

Todos los reactivos usados fueron de calidad analítica excepto las gomas arábica y xántica y los aceites esenciales que fueron de calidad alimentaria.

1 Cepa utilizada y preparación del inóculo

Se utilizó *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256, la cual se almacenó a $-80,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Ultrafreezer® Righi®, Argentina) en caldo Sabouraud conteniendo 10,0% m/m de glicerol hasta su uso.

Antes de su uso, *Z. bailii* se inoculó en caldo Sabouraud y se almacenó a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 hs bajo una leve agitación (40 rpm), proporcionada por un agitador orbital (Vicking, Argentina). Luego, se realizó un pasaje del inóculo a caldo Sabouraud fresco y se repitió el procedimiento de incubación. De esta manera se obtuvieron cultivos con más de 10^8 UFC/ml de caldo.

El inóculo obtenido se diluyó en agua de peptona hasta alcanzar una turbidez de 0,5 de la escala McFarland, que corresponde a una población de aproximadamente 10^6 UFC/ml. La turbidez fue medida con un turbidímetro (Densichek Biomerieux, Francia).

2 Testeo de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente al desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii*

Se testeó la actividad antimicrobiana de varios aceites esenciales (Tabla 3) frente a *Z. bailii* a través del ensayo de difusión en agar (Lv y col., 2011). Para ello, se inoculó agar Sabouraud al 1,2% con 10^6 UFC/ml de la levadura a estudiar y se prepararon placas de Petri, dispensando 20 ml del agar inoculado en cada una. Una vez solidificado, se formaron pocillos de 6 mm de diámetro sobre el agar, utilizando un

sacabocados y se colocaron 10 µl de cada aceite esencial en cada pocillo. Las placas se incubaron a 4°C durante 2 horas para facilitar la difusión del aceite esencial en el agar y luego, a 25°C ± 1°C durante 24 horas. Luego de la incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición utilizando un calibre. El ensayo se realizó por triplicado y se utilizó un aceite esencial por placa.

3 Elaboración de nanoemulsiones y estudio de su estabilidad

3.1 Ensayos preliminares

Se realizaron ensayos preliminares para la optimización de la metodología de elaboración de las nanoemulsiones. Para ello, se trabajó con aceite esencial de lemongrass (LG) para luego extender los resultados a los demás aceites, se formularon las emulsiones en caldo Sabouraud o en agua destilada y se ensayaron diferentes niveles de Tween®20 o Tween®80 como emulsificantes y goma arábica, como estabilizante.

Para la elaboración de estas emulsiones, se esterilizó una mezcla de agua destilada y Tween® a 100°C durante 30 minutos. Luego, en condiciones estériles, se le adicionó el aceite esencial y se elaboró una emulsión gruesa con un homogeneizador de alta velocidad (Ultraturrax, IKA, Alemania) durante 1 minuto a 13500 rpm y luego 3 minutos a 24000 rpm. Para reducir el tamaño de gota, la emulsión gruesa se ultrasonicó con un procesador ultrasónico (modelo VCX 750, Vibra CellSonics, Estados Unidos) a distintos tiempos, en condiciones constantes de frecuencia de 20 kHz y variando la amplitud entre 20 y 40% (amplitud máxima 40%, 228 µm). Se utilizó una sonda de aleación de titanio de 13 mm roscada a una micropunta cónica de 3 mm para someter a ultrasonido 10 ml de solución. Las muestras contenidas en tubos de ensayo de vidrio fueron inmersas en un baño de enfriamiento con una camisa por la que circulaba glicerina a temperatura constante de 0,5°C (Polystat, Cole-Parmer, Estados Unidos) para disipar la mayor parte del calor producido durante la ultrasonicación.

3.2 Caracterización física y estudio de la estabilidad de las nanoemulsiones

Para caracterizar las emulsiones y estudiar su estabilidad a lo largo del almacenamiento a 25°C (0, 7, 14, 21, 28, 56 y 65 días), se determinó el tamaño de gota por dispersión dinámica de luz. Para ello, se colocaron 1,2 ml de muestra en una cubeta de poliestireno descartable y se utilizó un equipo Zetasizer Nano-Zs provisto de un láser de He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) y un correlador digital Modelo ZEN3600, en un ángulo de dispersión fijo de 173°. La técnica de dispersión dinámica de luz mide la difusión de gotas debido al movimiento browniano y esto se relaciona con el tamaño de gotas a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

Ecuación 8

$$dh = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

donde dh es el diámetro hidrodinámico; D , el coeficiente de difusión traslacional; k , la constante de Boltzmann; T , la temperatura absoluta y η , la viscosidad. La distribución de tamaños obtenida se basa en la intensidad de luz dispersada y se puede convertir en distribuciones en intensidad, en volumen o en número. En este trabajo se mostrarán las dos primeras.

Por otra parte, para comparar el tamaño de gotas de los sistemas, se utilizó el parámetro Z-average que es el diámetro promedio del conjunto de gotas. Es pertinente señalar que este parámetro es útil para hacer comparaciones, pero no da una descripción completa de la distribución en sistemas polidispersos. El índice de polidispersidad (IPD) también se registró para evaluar la homogeneidad de la distribución de tamaños de gota. Los sistemas se formularon por duplicado, de cada uno de los cuales se realizaron determinaciones por quintuplicado durante todo el almacenamiento y se informó el valor promedio.

3.3 Estudio del efecto de la goma arábica, del Tween®80 y del tiempo de ultrasonificación sobre la estabilidad de las nanoemulsiones de lemongrass

Se evaluó el efecto del nivel de goma arábica, del nivel de Tween®80 y del tiempo de ultrasonificación sobre la estabilidad de las nanoemulsiones conteniendo 3,0% m/m de aceite esencial de LG, a través de la medición del tamaño de gota a los 14 días de almacenamiento de las mismas. Para ello, se realizó un diseño de Box-Behnken en dos bloques con 3 factores, a 3 niveles con 3 réplicas del punto central, dando como resultado 15 experimentos. Los factores, sus niveles y el diseño experimental se muestran en la Tabla 4, como así también dos sistemas adicionales que se elaboraron para la validación del modelo.

Los datos experimentales del diseño de Box-Behnken se sometieron a un análisis de regresión múltiple para el ajuste de la siguiente ecuación polinómica de primer orden:

Ecuación 9

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{1-2} X_1 X_2 + \alpha_{1-3} X_1 X_3 + \alpha_{2-3} X_2 X_3$$

donde Y es el diámetro promedio del tamaño de gota (Z-average); α_0 es el término independiente; α_1 , α_2 y α_3 los coeficientes lineales; α_{1-2} , α_{1-3} y α_{2-3} los coeficientes de interacción y los valores de x corresponden a las variables ensayadas X_1 : nivel de goma arábica, X_2 : tiempo de ultrasonificación y X_3 : nivel de Tween®80.

Por otra parte, se realizó una validación externa de los modelos de regresión a través de la formulación y el análisis de dos emulsiones, las cuales corresponden a los ensayos 16 y 17 de la Tabla 4. Los valores experimentales de los diámetros promedio obtenidos se compararon con los valores predichos por los modelos y su adecuación se estimó mediante la desviación promedio absoluta (AAD) (Bas y Boyaci, 2007).

Tabla 4. Diseño de Box-Behnken utilizado para evaluar el efecto del nivel de goma arábica, de Tween®80 y del tiempo de ultrasonificación sobre el tamaño de gota de las nanoemulsiones conteniendo 3% m/m de lemongrass

Ensayo	Nivel de Tween®80 (%m/m)	Nivel de goma arábica (%m/m)	Tiempo de sonicación (minutos)
1	9,00	0,15	5,0
2	3,00	0,00	15,0
3	6,00	0,30	5,0
4	3,00	0,15	5,0
5	3,00	0,30	15,0
6	6,00	0,30	25,0
7	9,00	0,30	15,0
8	9,00	0,15	25,0
9	9,00	0,00	15,0
10	6,00	0,00	5,0
11	6,00	0,00	25,0
12	3,00	0,15	25,0
13	6,00	0,15	15,0
14	6,00	0,15	15,0
15	6,00	0,15	15,0
16*	9,00	0,30	25,0
17*	9,00	0,00	10,0

* corresponden a los sistemas que se utilizaron para la validación.

3.4 Nanoemulsiones de aceites esenciales de corteza de canela, hojas de canela, lemongrass y menta. Formulación y estudio de su estabilidad.

Se formularon nanoemulsiones en las mismas condiciones que se realizaron los ensayos preliminares (Sección 3.1), utilizando aceites esenciales de corteza de canela (CC), hojas de canela (CH), lemongrass (LG) y menta (M). Se utilizó Tween®80 como emulsificante y agua destilada. La concentración de CC y CH se fijó en 15000 ppm, la de LG y M en 30000 ppm y la de Tween®80 en 90000 ppm, para todas las nanoemulsiones preparadas.

3.5 Evaluación del efecto de la metodología de emulsificación sobre la estabilidad de las nanoemulsiones

Las emulsiones de CC, CH, LG y M elaboradas con el homogeneizador de alta velocidad se dividieron en tres alícuotas, dos de ellas se sometieron a ultrasonificación por 5,0 y 25,0 min (US-5 y US-25, respectivamente) y la tercera no fue ultrasonificada (UT). Las emulsiones se almacenaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en una cámara de temperatura controlada y, a determinados tiempos de almacenamiento (0, 7, 14, 21, 28, 56 y 65 días), se les midió el tamaño de gota por dispersión dinámica de luz y se determinaron los parámetros Z-average y el IPD, según se describe en la Sección 3.2.

4 Estudio del efecto de ácidos orgánicos, xilitol y nanoemulsiones de aceites esenciales sobre el desarrollo de *Z. bailii*

4.1 Elaboración de los sistemas conteniendo ácido cítrico y ácido málico

Se formularon sistemas modelo acuosos en caldo Sabouraud con diferentes concentraciones de los ácidos orgánicos. Los ácidos utilizados fueron ácido cítrico (AC) y ácido málico (AM) en los niveles 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0% m/m. El pH fue ajustado a 4,00 con alícuotas de NaOH (0,5 M) o HCl (0,1 M) según el caso. El pH seleccionado está dentro del rango de acidez utilizada en la elaboración de jugos. Se elaboraron sistemas control en caldo Sabouraud, libres de ácidos orgánicos, unos sin el pH ajustado, y otros con el pH ajustado a 4,00 mediante el agregado de HCl, de AC o de AM. El pH se midió con un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro Fisher (Estados Unidos), previamente calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00. El error en la determinación del pH fue de 0,02 unidades.

4.2 Determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias de los ácidos orgánicos

Se determinaron las mínimas concentraciones inhibitorias (MCI) del AC y del AM mediante el método de dilución en caldo (Schelegueda y col., 2012). Para ello, se dispensaron 180 μl de cada sistema en microplacas estériles de 96 pocillos de fondo

redondeado (KartellSpa, Italia). Luego, se agregaron 20 μ L de inóculo de *Z. bailii* a cada pocillo, logrando una población final de 10^6 UFC/ml. Se utilizó caldo Sabouraud inoculado como control positivo y los sistemas ensayados no inoculados como controles negativos. La microplaca se incubó a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Durante el almacenamiento, se midió el crecimiento a través del registro de las lecturas de absorbancia a 600 nm cada 2 horas luego de agitar 30 segundos antes de cada lectura. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas y se recolectaron con el software Gen 5 (BioTek Instruments, Elx808, Estados Unidos). Se definió la MCI como la mayor dilución a la cual se observó inhibición del crecimiento microbiano después de 48 horas de incubación a 30°C (Espinell-Ingroff, 1998). La misma se determinó comparando visualmente la turbidez de cada pocillo con los controles y, a través del registro de las lecturas de absorbancia, corroborándose la MCI como la menor concentración a la cual se observó una variación de absorbancia menor a 0,1. Este ensayo se realizó al menos por cuadruplicado.

Con los datos de absorbancia obtenidos de concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos se construyeron curvas de crecimiento las cuales se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada expresada en términos de absorbancia (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001):

Ecuación 10

$$\ln\left(\frac{ABSt}{ABS_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[1 + \mu\frac{e}{A}(\lambda - t)\right]\right\}$$

donde ABS_0 es la absorbancia a tiempo inicial; $ABSt$ es la absorbancia a tiempo t ; μ es la velocidad específica de crecimiento; λ es el tiempo de fase de latencia y A es el valor asintótico, es decir, la absorbancia alcanzada en la fase estacionaria. Cabe destacar que la velocidad específica de crecimiento no corresponde a la máxima velocidad de crecimiento ya que el método de densidad óptica es menos sensible que el método de recuento de viables en placa (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Valero y col., 2006, Biesta-Peters y col., 2010).

4.3 Determinación de las mínimas concentraciones fungicidas de los ácidos orgánicos

Se determinaron las mínimas concentraciones fungicidas (MCF) de los ácidos cítrico y málico. Para ello, se tomaron 35 μ l de cada pocillo donde el crecimiento había sido inhibido y se sembraron en placas con agar Sabouraud. Las placas se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7 días. La MCF se define como la menor concentración donde no se observa crecimiento (Owen y Palombo, 2007).

4.4 Efecto del xilitol y del pH, ajustado con los ácidos cítrico y málico, sobre el desarrollo de *Z. bailii*

Se formularon sistemas modelo acuosos en caldo Sabouraud con diferentes concentraciones de xilitol (0,00; 10,00 y 20,00% m/m). El pH fue ajustado a 3,50 ó 4,00 con alícuotas de AC o AM según el caso. Las combinaciones de las concentraciones de xilitol, de valores de pH y de tipo de ácidos dieron lugar a 15 sistemas incluyendo los controles. Estos últimos fueron los sistemas conteniendo los distintos niveles de xilitol ensayados sin ajustar el pH (Tabla 5). La actividad de agua se midió a 25°C con un higrómetro Aqualab-Decagon CX-1 (Decagon, Pullman, W.A., Estados Unidos). El error en la determinación de la a_w fue de 0,002 unidades de a_w . El pH se determinó como se indica en la Sección 4.1.

Tabla 5. Composición de los sistemas utilizados para el estudio del efecto de los ácidos orgánicos, del xilitol y del pH sobre el desarrollo de *Z. bailii*.

Ácido cítrico		Ácido málico		Xilitol (%m/m)	a_w
pH 3,50	pH 4,00	pH 3,50	pH 4,00	0,00	1,000
				10,00	0,990
				20,00	0,975

Los sistemas se esterilizaron en autoclave, luego se dispensaron en una microplaca, la cual se incubó a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y durante el almacenamiento se midió el crecimiento a través del registro de lectura de absorbancia tal como se describe en la sección 4.2. Como control positivo se utilizó caldo Sabouraud inoculado y, como controles negativos, los sistemas ensayados no inoculados. Este ensayo se realizó al

menos por cuadruplicado. Con los datos de absorbancia obtenidos de concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos se construyeron curvas de crecimiento las cuales se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada (Ecuación 10).

4.5 Efecto de las nanoemulsiones de aceites esenciales frente al crecimiento de *Z. bailii*

4.5.1 Evaluación del efecto de la metodología de emulsificación sobre la acción de las nanoemulsiones de los aceites esenciales frente al crecimiento de *Z. bailii*

La evaluación del efecto de las nanoemulsiones de CC, CH, LG y M ultrasonificadas a los tiempos 5,0 y 25,0 min (US-5 y US-25, respectivamente) y de la nanoemulsión de CH, elaborada con el homogeneizador de alta velocidad (UT), sobre el desarrollo de *Z. bailii* se realizó mediante la determinación de las MCIs, el recuento de viables en placa a distintos tiempos de almacenamiento a 30°C y la determinación de los parámetros de crecimiento de la levadura.

4.5.1.1 Determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias de las nanoemulsiones de aceites esenciales

Las MCIs de las nanoemulsiones se determinaron mediante el método de microdilución en caldo como se describe en la Sección 4.2. Para ello, se prepararon diluciones en serie en caldo Sabouraud a pH 4,00 de las nanoemulsiones US-5 y US-25 de CC, CH, LG y M después de 14 días de elaboración y de la nanoemulsión UT de CH a las 24 horas de su elaboración. Alícuotas de 180 µl de las diluciones se dispensaron en microplacas estériles. Los niveles probados para cada aceite esencial se muestran en la Tabla 6. Se usó caldo Sabouraud inoculado a pH 4,00, ajustado con ácido cítrico, como control positivo y se usaron los mismos sistemas, no inoculados, como controles negativos. Además, se ensayó el caldo Sabouraud (pH 4,00) que contenía el nivel más alto de Tween®80 utilizado para probar el efecto del Tween®80 sobre el crecimiento. Esta concentración de Tween®80 fue de 5625 ppm, que es la utilizada en el sistema conteniendo 1875,0 ppm de M. La microplaca se incubó y se

determinaron las MCIs, como se describe en la Sección 4.2. Esta prueba se realizó al menos por cuadruplicado. Se utilizaron los controles negativos como blancos de absorbancia.

Tabla 6. Concentración de nanoemulsiones de lemongrass, corteza de canela, hojas de canela y menta para determinar las mínimas concentraciones inhibitorias en caldo, en ausencia de xilitol.

Concentración de nanoemulsiones de aceites esenciales (ppm)			
Lemongrass	Corteza de canela	Hojas de canela	Menta
117,2	19,5	156,3	312,5
234,4	39,1	312,5	468,8
312,5	78,1	468,8	625,0
468,8	156,3	625,0	937,5
625,0	312,5	937,5	1250,0
937,5	468,8	1250,0	1875,0

4.5.1.2 Determinación de los parámetros crecimiento de *Z. bailii* en presencia de distintos niveles de las nanoemulsiones de hojas de canela, de corteza de canela y de lemongrass en medio acuoso

Para determinar los parámetros de crecimiento de *Z. bailii*, a partir de la microplaca empleada para la determinación de las MCIs de la sección anterior, se registraron lecturas de absorbancia tal como se describe en la Sección 4.2. Esta prueba se realizó al menos por cuadruplicado. Con los datos de absorbancia obtenidos de concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos se construyeron curvas de crecimiento las cuales se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada (Ecuación 10).

En paralelo, se determinó la población de *Z. bailii* mediante el recuento de viables en placa. Para ello, se extrajeron alícuotas de cada pocillo de la microplaca a determinados tiempos de almacenamiento (0, 24, 48 y 72 horas) y se sembraron en superficie en agar Sabouraud. Las placas se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y, después de 5 días de incubación, se contaron las colonias. Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado. Con los datos de los recuentos se creó una variable dependiente que es $\text{Log}(N/N_0)$ siendo N la población final y N_0 la población inicial. Se graficó $\text{Log}(N/N_0)$ versus tiempo de almacenamiento.

4.5.2 Estudio de la interacción entre las nanoemulsiones de lemongrass y de corteza de canela frente al desarrollo de *Z. bailii*

Para el estudio de interacciones de entre las nanoemulsiones de LG y CC, se utilizó el método de microdilución de tablero de ajedrez (Schelegueda y col., 2012). Para ello, se realizaron diluciones en serie de las nanoemulsiones US-5 en caldo Sabouraud a pH 4,00 logrando las siguientes concentraciones: 117,2; 234,4; 468,8 y 937,5 ppm para LG; y 19,5; 39,1; 78,1 y 156,3 ppm para CC. Estas diluciones se mezclaron entre sí en microplacas de modo tal que cada fila o columna contuviera una cantidad fija del primer antimicrobiano y cantidades crecientes del segundo, como se muestra en la Figura 14. Luego, se procedió de manera similar a lo indicado en la sección 4.2. Cada pocillo de la microplaca contenía 180 μ l de cada sistema, se agregó 20 μ L de inóculo de *Z. bailii* logrando una población final de 10^6 UFC/ml. Luego, la microplaca se incubó a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas y, durante el almacenamiento, se registró la absorbancia a 600 nm de cada pocillo. Como control positivo se utilizó Sabouraud a pH 4,00 y, como controles negativos, los sistemas sin inocular.

Con los datos de absorbancia obtenidos de concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos se construyeron curvas de crecimiento de *Z. bailii* las cuales se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada (Ecuación 10). El ensayo se realizó al menos por sextuplicado.

Se determinaron las MCIs de ambas nanoemulsiones solas y combinadas, las cuales se utilizaron para representar gráficamente los isobogramas y para calcular las concentraciones fraccionarias inhibitorias (CFI) como la relación de la MCI de un aceite esencial cuando se combinan (MCI_{A-B} o MCI_{B-A}) dividida por la MCI de este aceite cuando se usa solo (MCI_A o MCI_B). Los valores de CFI se utilizaron para calcular el índice de CFI (Lopez-Malo Vigil y col. 2005):

Ecuación 11

$$CFI_I = \frac{MCI_{A-B}}{MCI_A} + \frac{MCI_{B-A}}{MCI_B}$$

A

Concentraciones de nanoemulsión de lemongrass (ppm)						
Sin xilitol		0	117,2	234,4	468,8	937,5
Concentraciones de nanoemulsión de corteza de canela (ppm)	0	0 - 0				
	19,5					
	39,1					
	78,1					
	156,3					

B

Concentraciones de nanoemulsión de lemongrass (ppm)								
Con xilitol		0	39,1	78,1	117,2	234,4	468,8	937,5
Concentraciones de nanoemulsión de corteza de canela (ppm)	0	0 - 0						
	13,0							
	26,0							
	39,1							
	78,1							
	156,3							
	312,5							

Figura 14 Esquema de las microplacas para estudiar la interacción entre las nanoemulsiones de lemongrass y de corteza de canela frente al desarrollo de *Z. bailii* en ausencia (Panel A) o en presencia de xilitol (Panel B).

El valor del índice de CFI determina el tipo de interacción entre los antimicrobianos. Un valor de índice CFI cercano a 1 indica un efecto aditivo; si es menor que 1 indica sinergismo; y si es mayor que 1, la interacción es antagónica (López-Malo Vigil y col., 2005).

4.5.3 Determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias, de los parámetros de crecimiento y de la interacción entre las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela sobre el desarrollo de *Z. bailii* en presencia de xilitol

La evaluación del efecto de las nanoemulsiones de LG y CC ultrasonificadas 5,0 minutos (US-5) sobre el desarrollo de *Z. bailii* se realizó mediante la determinación de las MCIs, el recuento de viables en placa a distintos tiempos de almacenamiento a 30°C y la determinación de los parámetros de crecimiento de la levadura.

Las MCIs de las nanoemulsiones se determinaron mediante el método de microdilución en caldo como se describe en la Sección 4.2, preparándose para ello diluciones en serie en caldo Sabouraud a pH 4,00 de las nanoemulsiones US-5 LG y CC. Las MCIs para cada nanoemulsión de AE en presencia de xilitol se determinaron comparando visualmente la turbidez de cada pocillo con los controles y, a través del registro de las lecturas de absorbancia.

Con los datos de absorbancia obtenidos de concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos se construyeron curvas de crecimiento de *Z. bailii* las cuales se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada (Ecuación 10). El ensayo se realizó al menos por cuadruplicado.

Por último, para el estudio de interacciones de entre las nanoemulsiones de LG y CC, se utilizó el método de microdilución de tablero de ajedrez como se describe en la Sección 4.5.2. Las diluciones seriadas se mezclaron entre sí en microplacas como se muestra en la Figura 14. Los niveles de LG fueron de 39,1; 78,1; 117,3; 234,4 468,8 y 937,5 ppm mientras que para CC fueron 13,0; 26,0; 39,1; 78,1; 156,3 y 312,5 ppm. Se determinaron las MCIs de ambas nanoemulsiones solas y combinadas, las cuales se utilizaron para representar gráficamente los isobogramas y para calcular las concentraciones fraccionarias inhibitorias (CFI) con la Ecuación 11.

4.5.4 Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular

Los posibles efectos de los aceites esenciales en la superficie celular se estudiaron mediante la prueba de adhesión microbiana a hidrocarburos (Li y McLandsborough, 1999; Rosenberg y Gutnick, 1980). Los sistemas analizados contenían 312,5 ppm de nanoemulsión US-5 LG (2/3 MCI), 104,3 ppm de nanoemulsión US-5 CC (2/3 MIC) y la mezcla de 117,2 y 39,1 ppm de LG y CC nanoemulsiones US-5 (1/4 MIC), respectivamente. Se usó un sistema libre de antimicrobianos como control. La metodología propuesta por Gliemmo y col. (2015) se utilizó con algunas modificaciones. Alícuotas de los sistemas se inocularon con *Z. bailii*, se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas para obtener células en fase logarítmica y se centrifugaron (10.000 rpm durante 10 min). El pellet obtenido se lavó dos veces y se resuspendió en solución de Ringer a pH 4,00 para alcanzar 1 McFarland. Se distribuyeron alícuotas de cuatro mililitros en dos tubos. Se añadió un mililitro de xileno a uno de ellos (Am), mientras que el otro se usó como control (Ac). Después de 10 minutos de incubación, los tubos se agitaron en vórtex durante 1 minuto y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos para la separación de fases. Por último, se retiraron 2,00 ml de la fase acuosa y se determinó la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1203, Japón). Se utilizó como blanco solución Ringer a pH 4,00. Las determinaciones se realizaron por triplicado. La absorbancia del control (Ac) y la absorbancia de los tubos de muestra (Am) se utilizaron para calcular el porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular de las levaduras según la siguiente ecuación:

Ecuación 12

$$\% \text{ de hidrofobicidad de la pared celular} = \frac{A_c - A_m}{A_c} \times 100$$

5 Determinación de la composición química de los aceites esenciales

Se utilizó un GC-FID-MS Perkin Elmer Clarus 500, provisto de un muestreador automático (Autosampler) conectado a un único inyector tipo split/splitless conectado con un divisor de flujos a dos columnas capilares de sílice fundido: a) polietilenglicol de peso molecular aprox. 20.000 (DB-Wax, J&W Scientific) y b) 5% fenil-95%

dimetilpolisiloxano (DB-5, J&W Scientific), ambas de 60 m x 0,25 mm de diámetro y 0,25 µm de espesor de fase estacionaria. La columna polar se conectó a un detector FID mientras que la columna no polar se conectó a un detector FID y a un detector de masas cuadrupolar (70 eV), a través de un sistema de venteo MSVent®.

Se empleó como fase móvil helio a flujo constante de 1.87 ml/min. La relación de split fue 1:100. La temperatura se programó de acuerdo al siguiente gradiente: 90-225°C a 3°C/min, luego isotérmico por 15 minutos. Las temperaturas del inyector y detectores FID fueron 255°C y 275°C, respectivamente. Las temperaturas de la línea de transferencia y de la fuente de iones fueron de 180°C y 150°C, respectivamente. El rango de masas analizado fue de 40-300 Da (10 scan/segundo). El volumen de inyección fue de 0,2 µl.

La identificación de los componentes del aceite esencial se realizó por comparación de sus espectros de masa con los de bases de datos computarizadas (Adams, 2007; Wiley/NIST MassSpectral Library, 2008; bases de datos propios) y por comparación de sus índices de retención con los obtenidos con estándares propios (patrones o aceites esenciales de composición química conocida) y con los que figuran en bibliografía.

El análisis cuantitativo se realizó usando el método de porcentaje de áreas, sin considerar alguna corrección por factores de respuesta. Se tomó para cada componente la menor respuesta obtenida entre las correspondientes a cada columna usada.

6 Jugo de Yacón

6.1 Procesamiento de las raíces, obtención de la pulpa y elaboración del jugo

Se utilizó el yacón proveniente de la Comunidad Aborigen Los Chorrillos, Dpto de Tumbaya, Jujuy, Argentina.

Las raíces se seleccionaron, se lavaron con abundante agua para eliminar restos de tierra y materia orgánica adheridos a la cáscara y se sumergieron en una solución de 200 ppm de hipoclorito de sodio durante 5 minutos con el objetivo de reducir la carga microbiana en la materia prima. Los tubérculos, se pelaron con peladores manuales procurando eliminar todos los restos de cáscara dado que en ella se concentra una alta cantidad de compuestos químicos propensos al pardeamiento enzimático. Se cortaron

en cubos de aproximadamente 1 cm³. Los cubos se sumergieron en una solución de 2,40% m/v de ácido cítrico durante 5 minutos, se centrifugaron en una centrífuga de cocina para eliminar restos de agua, se escaldaron al vapor durante 5 minutos, se enfriaron por inmersión en una solución de 2,40 % m/v de ácido cítrico y nuevamente se centrifugaron. Por último, se envasaron al vacío en fracciones de aproximadamente 250 g en bolsas de copolímero de PCPC (cloruro de polivinil-cloruro de polivinilideno, BB4L, Cryovac® Inc., Sealed Air Corporation; 59 mm de espesor; permeabilidad al oxígeno 30,4 cm³/m² d atm (23°C), Argentina) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Este procesamiento se muestra en la Figura 15.

Para la elaboración del jugo, se descongelaron los cubos previamente procesados y se pasaron por juguera centrífuga con un sistema prensador de alto rendimiento (Max Juicer PE-SJ15, Peabody). El jugo obtenido se filtró, se le agregó xilitol (20,0% m/m) y/o ácido ascórbico (AA) (0,22% m/m) según el ensayo que se quisiera realizar y se ajustó el pH a 4,00 con ácido cítrico. Para realizar los distintos ensayos, alícuotas de 20,0 ml de jugo con distintos aditivos agregados se envasaron al vacío en las bolsas Cryovac®.

6.2 Determinación del color

Con el objetivo de determinar el efecto del tratamiento térmico y del agregado de distintos aditivos al jugo de yacón y los cambios deteriorativos que pudieran ocurrir durante el almacenamiento, se estudió la evolución de los parámetros de color X, Y y Z. La muestra, dispuesta en bolsas con 20,0 ml de jugo, se enrolla hasta una longitud predeterminada de manera de medir siempre el mismo volumen de jugo. Luego, la muestra se coloca sobre una placa blanca y, mediante el empleo de un colorímetro (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón), se miden los valores triestímulo utilizando el iluminante CD65, y un ángulo de observación estándar de 2°. A partir de los valores obtenidos se calcula la coordenada cromática x (Ecuación 5, Introducción) y, mediante el empleo de la Ecuación 7 se obtiene el IP. El cálculo se realizó por triplicado.



Figura 15 Diagrama de flujo del procesamiento de las raíces de yacón.

6.3 Efecto del tratamiento térmico sobre la flora nativa y las propiedades fisicoquímicas del jugo de yacón

En una primera instancia se ensayaron dos tratamientos térmicos al jugo de yacón: Tratamiento A (TA): 90°C-60 segundos y Tratamiento B (TB): 80°C-90 segundos. Para ello, se utilizó jugo conteniendo 20,0% m/m de xilitol y 0,22% m/m de AA. Bolsas con 20,0 ml de jugo se sumergieron en un baño a la temperatura a ensayar. Una vez cumplido el tiempo del tratamiento a la temperatura determinada, los jugos se enfriaron en un baño de agua a 0°C y se almacenaron a 25°C ± 1°C. Durante el almacenamiento se evaluaron el recuento de coliformes totales, hongos y levaduras y mesófilos totales y las propiedades físico químicas color, pH, °Brix y actividad de agua (a_w).

Para la determinación de la flora nativa se midieron alícuotas del jugo tal cual y diluciones de las mismas para determinar su población por recuento en placa en los siguientes medios y las siguientes condiciones de incubación de las placas:

- Agar PCA para el recuento de mesófilos totales, incubación a 25°C ± 1°C durante 48hs;
- Agar Sabouraud para el recuento de hongos y levaduras, incubación a 25°C ± 1°C durante 7 días; y
- Agar VRBL para el recuento de coliformes totales, incubación a 30°C ± 1°C durante 24hs.

El pH, la a_w y el color se determinaron como se indica en las secciones 4.1, 4.4 y 6.2, respectivamente. La concentración de sólidos solubles (°Brix) se midió utilizando un refractómetro PR-101 Palette (ATAGO Co. LTD, Japón).

6.4 Efecto del ácido ascórbico sobre el desarrollo de pardeamiento en jugo de yacón

Para estudiar el efecto del AA sobre el desarrollo de pardeamiento, se elaboraron jugos conteniendo 20,0% m/m de xilitol, ajustados a pH 4,00 con AC y 0,22% m/m de AA como se indicó en la Sección 6.1. A las muestras de jugo utilizadas como control no se les agregó AA. Los jugos se sometieron al TA y se almacenaron a 25°C ± 1°C.

Durante el almacenamiento se siguió la evolución del color como se describe en la Sección 6.2.

6.5 Efecto del tratamiento térmico sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones de aceites esenciales

Se estudió el efecto del tratamiento térmico del jugo sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones de LG y CC y la existencia de interacciones entre los mismos frente al desarrollo de *Z. bailii* en jugo de yacón conteniendo 20,0% m/m de xilitol a pH 4,00. Se utilizaron las nanoemulsiones US-5 de ambos aceites y los niveles ensayados fueron 468,8 ppm de LG y 156,3 ppm de CC.

El jugo se dividió en cuatro porciones, a dos de ellas se les agregó una alícuota de cada nanoemulsión por separado. Luego, todas las porciones se envasaron en fracciones de 20,0 ml en bolsas Cryovac® y se sellaron al vacío. Todas las bolsas recibieron el tratamiento térmico de 90°C por 60 segundos y, luego, se enfriaron en un baño de agua a 0°C. A las bolsas libres de nanoemulsiones, se les agregó cada nanoemulsión por separado. Como control positivo, se utilizaron bolsas conteniendo jugo sin el agregado de nanoemulsiones. Luego, todas las bolsas fueron inoculadas con 10⁴ UFC/ml de *Z. bailii* y fueron almacenadas a 25°C ± 1°C. Se realizó el recuento de viables en placa con agar Sabouraud a los 0, 6 y 12 días de almacenamiento utilizando la metodología descrita en la Sección 4.5.1.2.

6.6 Estudio del efecto de la nanoemulsiones de aceites esenciales de lemongrass y corteza de canela y del xilitol sobre el desarrollo de *Z. bailii* en jugo de yacón

6.6.1 Determinación de mínimas concentraciones inhibitorias de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y corteza de canela en jugo de yacón en ausencia o presencia de xilitol

Para determinar las MCIs de las nanoemulsiones en jugo de yacón, se hicieron diluciones seriadas de las nanoemulsiones US-5 de CC y de LG en el jugo (con o sin 20,0% xilitol y todas ajustados a pH 4,00 con AC), utilizando la técnica similar a la descrita en la Sección 4.2: se dispensaron 170 µl de los sistemas con las distintas

concentraciones de las nanoemulsiones en los pocillos de una microplaca, se agregaron 20 µl de inóculo de la levadura alcanzando una población final en cada pocillo de 10⁶ UC/ml y se incubaron durante 48 horas a 30°C ± 1°C. Las concentraciones de nanoemulsiones estudiadas se muestra en la Tabla 7.

La detección del crecimiento de *Z. bailii* se determinó mediante un ensayo colorimétrico dado que por la turbidez propia del medio aportada por el jugo no fue posible medir la absorbancia. Se utilizó un método rápido de detección de crecimiento que emplea sales de tetrazolio como reactivos indicadores (Meletiadis y col., 2001; Tunney y col., 2004; Moriarty y col., 2005; Brady y col., 2007; Tsukatani y col., 2012; Zalazar y col., 2018).

El indicador redox utilizado fue el cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio (INT), y el mediador de electrones (MDE), 2-metoxi-1-4 naftoquinona. Se prepararon distintas soluciones madre del indicador:

- INT: se preparó una solución madre de 2,775 mM en agua destilada.
- MDE: se preparó una solución madre de 1 mM en dimetilsulfóxido.

Las soluciones se esterilizaron por filtración con membrana de 0,2 µm. Las concentraciones de colorante se seleccionaron teniendo en cuenta las propuestas por Grabielson y col. (2002), Fai y Grant (2009) y Tsukatani y col. (2014). Luego, se preparó una solución mezcla de ambas soluciones, agregando 900 µl de la solución madre de INT y 100 µl de la solución madre del MDE preparadas previamente. Esta mezcla se utilizó para adicionar a los pocillos para detectar el punto final.

Luego de la incubación de la microplaca, se agregaron 10 µl de solución mezcla de INT y MED en cada pocillo. A los 30 minutos, los pocillos que presentaron una coloración rosada indicaron crecimiento de la levadura. Se utilizaron caldo Sabouraud y jugo, libres de xilitol y con pH 4,00 ajustado con AC, inoculados y sin inocular, como controles positivos y negativos, respectivamente. La MCI fue la mayor dilución a la cual no se observó viraje del indicador.

Tabla 7. Concentración de nanoemulsiones de lemongrass y corteza de canela para determinar las MCIs en jugo de yacón en ausencia o en presencia de 20,0% m/m de xilitol.

Aceites solos – Concentración en ppm	
Lemongrass	Canela Corteza
117,2	39,1
234,4	78,1
468,8	156,3
937,5	312,5
1250,0	468,8
1875,0	625,0

6.6.2 Estudio de la interacción entre las nanoemulsiones de lemongrass y de corteza de canela frente al desarrollo de *Z. bailii* en jugo de yacón en ausencia o presencia de xilitol

6.6.2.1 Determinación de las concentraciones inhibitorias fraccionarias de las nanoemulsiones de lemongrass y corteza de canela en jugo de yacón

Se estudió la interacción entre las nanoemulsiones en el jugo a través de la determinación de las CFI, de manera análoga a lo estudiado en caldo Sabouraud que se explica en la Sección 4.5.2, a partir del método de microdilución de tablero de ajedrez. Para ello, se realizaron diluciones en serie de nanoemulsiones US-5 en jugo de yacón, logrando las siguientes concentraciones: 156,3; 234,4; 468,8 y 937,5 ppm para LG; y 78,1; 156,3 y 312,5 ppm para CC. Las alícuotas de las diluciones en serie se mezclaron en microplacas de modo tal que cada fila o columna contuviera una cantidad fija del primer antimicrobiano y cantidades crecientes del segundo, como se muestra en la Figura 16. Luego, se procedió de manera similar a lo indicado en la sección 4.5.2, con la diferencia de que no pudo seguirse el crecimiento por turbidez debido a la opacidad del jugo, por ello, se registró el punto final luego de 48 h de incubación con la mezcla redox (INT/MED), como se describió en la Sección 6.6.1. Como control positivo se utilizó jugo a pH 4,00 inoculado y, como controles negativos, los sistemas sin inocular. Se estudió la presencia de interacciones entre las nanoemulsiones mediante la

construcción de isobogramas y determinando las CFI, como se describe en la Sección 4.5.2. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

En la Figura 16 se muestra la distribución de los sistemas en la microplaca.

Concentraciones de nanoemulsión de lemongrass (ppm)						
		0	156,3	234,4	468,8	937,5
Concentraciones de nanoemulsión de corteza de canela (ppm)	0	0 - 0				
	78,1					
	156,3					
	312,5					

Figura 16. Esquema de las microplacas para estudiar la interacción entre las nanoemulsiones de lemongrass y de corteza de canela frente al desarrollo de *Z. bailii* en ausencia o en presencia de 20,0 % de xilitol en jugo de yacón.

6.6.1.2 Estudio de una combinación sinérgica de las nanoemulsiones de lemongrass y de corteza de canela sobre el desarrollo de *Z. bailii*

Del ensayo anterior se seleccionó la combinación de 468,8 ppm de LG y 78,1 ppm de CC y se estudió la interacción entre ambos sobre el desarrollo de *Z. bailii* mediante el recuento de viables en placa. Para ello, se realizó un diseño factorial completo con dos variables (LG y CC) a dos niveles (0 y 468,8 ppm LG; 0 y 78,1 ppm CC), dos puntos centrales, en dos bloques, resultando en un total de 12 experimentos (Tabla 8). Los jugos se elaboraron, se envasaron y se trataron como se describió en la Sección 6.1, la adición de las nanoemulsiones se realizó antes del tratamiento térmico para LG y luego del tratamiento térmico para CC. Todas las bolsas fueron inoculadas con 10^4 UFC/ml de *Z. bailii* y fueron almacenadas a 25°C. Se realizó el recuento de viables en placa con agar Sabouraud a los 0, 6 y 12 días de almacenamiento. Con los datos de los recuentos se creó una variable dependiente que es $\text{Log} (N/N_0)$ siendo N la población final y N_0 la población inicial. Se graficó $\text{Log} (N/N_0)$ versus tiempo de almacenamiento.

Tabla 8. Diseño factorial completo utilizado para evaluar la interacción entre las nanoemulsiones frente al crecimiento de *Z. bailii*.

Nivel de aceite esencial (ppm)		
Ensayo	Corteza de canela	Lemongrass
1	0	468,8
2	0	0
3	78,1	468,8
4	78,1	0
5	39,1	234,4
6	39,1	234,4
7	0	468,8
8	0	0
9	78,1	468,8
10	78,1	0
11	39,1	234,4
12	39,1	234,4

Los datos experimentales del diseño factorial se sometieron a un análisis de regresión para el ajuste de la siguiente ecuación de primer orden:

Ecuación 13

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_{1-2} X_1 X_2$$

donde Y es $\log(N/N_0)$; α_0 el término independiente; α_1 y α_2 los coeficientes lineales; α_{1-2} el coeficiente de interacción; X_1 el nivel de LG; y X_2 el nivel de CC.

6.7 Efecto de la temperatura de almacenamiento y de la presencia de la nanoemulsión de lemongrass sobre el desarrollo de *Z. bailii* en jugo de yacón

Se estudió el efecto de la temperatura de almacenamiento y del nivel de LG sobre el desarrollo de *Z. bailii* a través de un diseño factorial con dos variables: temperatura de almacenamiento (5 y 15°C) y nivel de lemongrass (0 y 937,5 ppm.). Los jugos se elaboraron, se envasaron y se trataron como se describió en la Sección 6.1, se adicionó la nanoemulsión de LG y se realizó el tratamiento térmico. Todas las bolsas

fueron inoculadas con 10^4 UFC/ml de *Z. bailii* y fueron almacenadas a 5 y 15°C. Se realizó el recuento de viables en placa con agar Sabouraud a los 0, 7, 14 y 28 días de almacenamiento. Con los datos de los recuentos se calculó el $\text{Log}(N/N_0)$, siendo N la población final y N_0 la población inicial de la levadura. Se graficó el $\text{Log}(N/N_0)$ en función de los días de almacenamiento para ambas temperaturas estudiadas.

6.8 Aprovechamiento del residuo de la elaboración del jugo de yacón como crioprotector de cepas de interés industrial

El bagazo obtenido de la elaboración del jugo se fraccionó en alícuotas de 100 g, las que se envasaron al vacío en las bolsas Cryovac, se enfriaron y liofilizaron (ALPHA 1-4 LD2 Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, GmbH, Alemania). Se utilizó un diseño experimental factorial con un factor categórico. Los factores fueron: medio de liofilización en tres niveles (A, B y C) y tiempo de almacenamiento en dos niveles (0 y 45 días). Para la preparación de los medios de liofilización a base de yacón se partió de una suspensión acuosa de bagazo (10% p/v). Una porción de suspensión se esterilizó a 121°C durante 15 minutos (medio A), el resto de la suspensión se centrifugó y el sobrenadante libre de sólidos se esterilizó por filtración (medio B). Las células de *Lactobacillus sakei* ACU-16 a conservar se cosecharon por centrifugación a 4°C a partir de un cultivo activo en caldo MRS y se lavaron dos veces con solución fisiológica. Alícuotas del pellet resuspendido en solución fisiológica se dispensaron en los medios A, B y en agua destilada (medio C). Las suspensiones se congelaron a -80°C por 4 horas y se liofilizaron a -30°C y 10 Pa por 48 horas. El número de células viables se determinó antes, inmediatamente después de la liofilización (t=0) y a los 45 días de almacenamiento a 5°C. Los análisis se realizaron por duplicado.

Se determinó la tasa de supervivencia (TS) como el porcentaje de la población inicial de acuerdo a la siguiente ecuación:

Ecuación 14

$$TS (\%) = \frac{N}{N_0} \cdot 100$$

Donde:

N = recuento de *Lb sakei* ACU-16 (UFC/ml) inmediatamente después de la liofilización (t=0) o a los 45 de almacenamiento a 5°C.

N₀ = recuento de *Lb sakei* ACU-16 (UFC/ml) antes de la liofilización.

Las cepas de *L. sakei*, fueron proviamente aisladas a partir de un homogeneizado de carne. Para ello se reinoculan en caldo MRS, se incubó a 30° C y se comprobó la pureza mediante estriado en agar MRS. Se utilizaron placas con cultivos puros para probar la morfología celular por fase. El aislamiento se mantuvo como reserva congelada en caldo MRS suplementado con Glicerol al 10% (v / v) a -18 ° C durante un mes. Antes del uso experimental, la cepa se recuperó en caldo MRS y se incubó a 30 ° C (Castro y col., 2011)

6.9 Determinación de la composición nutricional, polifenoles totales y capacidad antioxidante del jugo de yacón

6.9.1 Propiedades nutricionales

Cenizas

La determinación del contenido de cenizas se realizó en el jugo formulado con 937,5 ppm de nanoemulsion de LG y 20,0% de xilitol. Se utilizó el método gravimétrico AOAC 923.03. Para ello, se pesaron entre 4,0000 y 5,0000 g de muestra en un crisol de porcelana y se calcinaron a 600°C durante 5 horas hasta peso constante en una mufla. El contenido de ceniza se considera como el peso total mineral remanente de la muestra luego de la calcinación. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Humedad

La humedad se determinó en el jugo formulado con 937,5 ppm de nanoemulsion de LG y 20,0% m/m de xilitol a través del método gravimétrico AOAC 934.01, en el cual se considera que la humedad es el único compuesto volátil del alimento. Para la realización del ensayo se colocaron entre 2-3 g de muestra en un pesafiltro y se colocó en una estufa de vacío a 70°C durante 20 horas (hasta peso constante). No se utilizó un horno convencional debido a que el yacón presenta azúcares reductores capaces de descomponerse a temperaturas mayores. El porcentaje de humedad fue determinado por la diferencia de peso de la masa antes y después de someterla al secado con

respecto a la masa inicial (Ecuación 19). De esta manera, se determina indirectamente la masa de agua evaporada. La determinación se realizó por duplicado.

Ecuación 15

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{masa inicial} - \text{masa final}}{\text{masa inicial}} \cdot 100$$

Proteínas

El contenido de proteínas en el jugo formulado se calculó usando el método de Kjeldahal (920.87 AOAC). Se realizó la digestión mediante el calentamiento de 1 a 5 g en un balón conteniendo en ácido sulfúrico concentrado hasta que la materia orgánica se oxidó y el nitrógeno proteico se redujo y retuvo en forma amoniacal. Se colocó el balón en el equipo de destilación y se agregó NaOH concentrado. Se destiló un volumen de agua conocido para asegurar que el amoníaco fuera arrastrado en su totalidad. La cuantificación de nitrógeno amoniacal se realizó por medio de una volumetría ácido-base, empleando un exceso de H₂SO₄ 0,1 N. Se tituló por retorno con NaOH 0,1N utilizando rojo de metilo como indicador. Los equivalentes de ácido consumidos correspondieron a los equivalentes de amoníaco destilados. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Lípidos

El contenido de lípidos se determinó en el jugo formulado a través del método de extracción de Soxhlet (925.38 AOAC). Para ello, la muestra se pesó, se colocó en el cuerpo del extractor, en un cartucho cubierto con algodón desgrasado. Se adosó un balón a dicho recipiente donde se colocó el volumen de solvente que se utilizó en la extracción. El solvente cumplió ciclos sucesivos de evaporación, condensación y pasaje por la muestra para extraer cada vez mayor cantidad de lípidos que se recogieron en un balón. El solvente de extracción se evaporó y se pesó la grasa disuelta. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Fibra dietaria total y Fructooligosacáridos

Se determinó la fibra dietaria total según la metodología AOAC 991.43. El contenido de fructooligosacáridos se determinó según se describe en Zuleta y Sambucetti (2001). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Carbohidratos

Los carbohidratos se determinaron por diferencia según la metodología AOAC, 2000.

6.9.2 Determinación de polifenoles totales

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), el cual se basa en la capacidad que tienen los polifenoles presentes en la muestra para reducir el Mo (VI) a Mo (V). A pH básico, los compuestos fenólicos reaccionan con el ácido fosfomolibdotúngstico -formado por la mezcla de las sales wolframato (tungstato) sódico (Na_2WO_4) y molibdato sódico (Na_2MoO_4) en ácido fosfórico- de color amarillo, el cual, luego de su reducción, da lugar a un complejo de color azul intenso. Este complejo tiene un máximo de absorción a 765 nm, por ello, el contenido de polifenoles totales se determina por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 765 nm y refiriendo su valor a mg de ácido gálico por g de producto en base a una curva de calibración que utiliza ácido gálico como patrón.

Se tomaron 0,5 ml del extracto etanólico, se le agregó 2,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y se incubó de 7 a 8 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Luego, se le adicionó 2 ml de solución de carbonato de sodio y se incubó 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (UV 1800, Shimadzu, Japón). Como blanco se utilizó el solvente de extracción que fue sometido al mismo proceso que la muestra. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. En paralelo se realizó una curva de calibración utilizando diluciones seriadas de ácido gálico, cubriendo el rango de 10 mg ácido gálico/L a 100 mg ácido gálico/l, como patrón (Figura 17). La concentración de polifenoles se expresó como mg de ácido gálico/g de jugo, utilizando la curva de calibración.

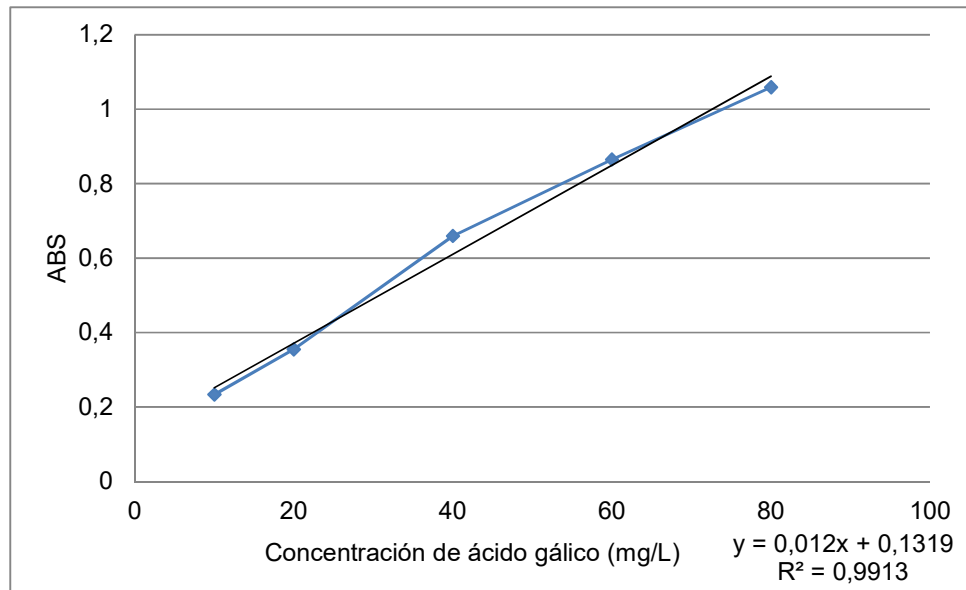


Figura 17. Curva de calibración con ácido gálico equivalente (GAE) para la determinación del contenido de polifenoles.

6.9.3 Determinación de capacidad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante en jugo liofilizado por medio de la técnica de la capacidad de inactivación del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), cuando reacciona con sustancias antioxidantes (Molyneux, 2004; Prior y col., 2005). La intensidad de este cambio se cuantifica por espectrofotometría a 517 nm y se relaciona con la capacidad antioxidante de la muestra.

En un tubo de ensayos se colocó una alícuota de 200 μ l del extracto etanólico de la muestra, se le agregó 1,80 ml de la solución etanólica DPPH 0,16 mM. Después, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y se midió su absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro (UV 1800, Shimadzu, Japón), se utilizó etanol absoluto como blanco.

Paralelamente, se midió la absorbancia de una solución control, que solamente contenía el reactivo de DPPH y que sufrió el mismo proceso que las muestras. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

La capacidad antioxidante se evaluó como el porcentaje de inhibición del radical DPPH según la Ecuación 16:

Ecuación 16

$$\%DPPH = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

Donde A_0 es la absorbancia de la solución control (conteniendo solo DPPH) y A es la absorbancia remanente de la solución de DPPH en presencia de la muestra.

7 Evaluaciones sensoriales

En todas las evaluaciones realizadas se trabajó una habitación con luz natural, temperatura agradable y libre de posibles distracciones, que fue dividida en dos sectores: zona de análisis y zona de preparación de las muestras, según lo recomendado por Meilgaard y col. (1999). Para que los juicios fuesen independientes, el sector de análisis fue dividido en seis cubículos blancos. Cada uno de ellos fue provisto de un vaso con agua para el enjuague de la boca entre las degustaciones en caso de ser necesario.

7.1 Jugo de manzana

En una primera instancia, se determinó la aceptabilidad global de las nanoemulsiones de LG y CC en jugos de manzana concentrados (20% de jugo de manzana con sabor a manzana; Mocoetá, Argentina). Para ello, se agregaron al jugo concentrado las nanoemulsiones de LG y CC en los niveles de las MCIs, solos y combinados; y luego cada jugo se diluyó 1: 4 en agua según las indicaciones del producto. Un grupo de 87 consumidores regulares (36 hombres y 51 mujeres) de jugos evaluaron la aceptabilidad global con una escala hedónica verbal equilibrada de 9 puntos (1 = “No me gusta extremadamente”; 9 = “Me gusta extremadamente”) (Meilgaard y col., 1999). Los evaluadores recibieron monódicamente las muestras a 7°C en contenedores codificados (5 ml) y en orden aleatorio. Se usó agua mineral a la misma temperatura como limpiador de paladar entre muestras. Completaron la planilla que se muestra en la Figura 18.

Con los datos obtenidos se calculó el índice de aceptación de cada muestra como el porcentaje de consumidores que evaluaron los jugos con una puntuación mayor o igual a 6 (“me gusta ligeramente”) (Granato y col., 2009).

Nombre: _____ Fecha: _____

En la bandeja frente a usted hay 3 jugos saborizados.

Coloque los códigos de las muestras en la tabla en el orden en que se le presentan.

Enjuague su boca con agua antes de comenzar. Ud. puede enjuagarse nuevamente en cualquier momento durante el test si lo necesita.

Por favor, pruebe las muestras e indique el grado de aceptabilidad según la escala:

1. Me disgusta muchísimo
2. Me disgusta mucho
3. Me disgusta bastante
4. Me disgusta ligeramente
5. Ni me gusta ni me disgusta
6. Me gusta ligeramente
7. Me gusta bastante
8. Me gusta mucho
9. Me gusta muchísimo

CÓDIGO	---	---	---
Grado de aceptabilidad			

Comentarios: _____

MUCHAS GRACIAS

Figura 18. Planilla para el análisis sensorial de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela en jugo de manzana.

7.2 Jugo de yacón

Se evaluaron diluciones seriadas (1/2, 1/3 y 1/4) del jugo de yacón conteniendo 20,0% de xilitol, 937,5 ppm de la nanoemulsión de LG y con el pH ajustado a 4,00 con ácido cítrico. Participaron ochenta consumidores (34 hombres y 46 mujeres) habituales de jugos / bebidas saborizadas quienes recibieron monódicamente las muestras a 7°C en contenedores codificados (5 ml) y en orden aleatorio. Los evaluadores primero debían ordenar las muestras en orden decreciente de preferencia y, luego, calificar la aceptabilidad global de las mismas sobre la base de una escala hedónica verbal

equilibrada de 9 puntos (1 = “No me gusta extremadamente”; 9 = “Me gusta extremadamente”) (Meilgaard y col., 1999). Las muestras se presentaron monádicamente siguiendo un diseño completamente al azar. El agua mineral estaba disponible como neutralizador entre las muestras para evitar efectos de arrastre. La planilla que completaron los evaluadores se muestra en la Figura 19.

Además, se determinó el índice de aceptación de las muestras según se indicó en la Sección 8.1.

Nombre: _____ Fecha: _____

En la bandeja frente a usted hay 3 jugos saborizados.

Enjuague su boca con agua antes de comenzar. Ud. puede enjuagarse nuevamente en cualquier momento durante el test si lo necesita.

Por favor, pruebe las muestras e indique:

1) Ordénelas según su preferencia en orden decreciente:

	Mas preferida		Menos preferida
CÓDIGO	---	---	---

2) El grado de aceptabilidad según la escala:

1. Me disgusta muchísimo
2. Me disgusta mucho
3. Me disgusta bastante
4. Me disgusta ligeramente
5. Ni me gusta ni me disgusta
6. Me gusta ligeramente
7. Me gusta bastante
8. Me gusta mucho
9. Me gusta muchísimo

CÓDIGO	---	---	---
Grado de aceptabilidad			

Comentarios: _____

MUCHAS GRACIAS

Figura 19. Planilla para el análisis sensorial de diluciones de jugo de yacón conteniendo 20,0% de xilitol, 937,5 ppm de la nanoemulsión de lemongrass y con el pH ajustado a 4,00 con ácido cítrico.

8 Análisis estadístico de los datos

Para los datos obtenidos de halos de inhibición, Z-average, IPD, velocidad de crecimiento (μ), valor asintótico (A), recuentos en placa, hidrofobicidad, índice de pardeamiento (IP), tasa de supervivencia (TS), aceptabilidad global, contenido de humedad, cenizas, lípidos, proteínas, fibra dietaria y FOS se informó el promedio y el desvío estándar. Los promedios calculados se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) determinándose las diferencias significativas a través del test de Tukey para la comparación de medias.

Para comprobar el ajuste del modelo de Gompertz modificado y de los modelos de regresión generados por los diseños de Box-Behnken y factorial completo se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Se obtuvieron los coeficientes de correlación ajustados, (R^2_{aj}), el error cuadrático medio (CME) para el caso de Gompertz y la desviación promedio absoluta (AAD) para los diseños como medida de bondad de ajuste, según sugiere Ratkowsky (2004). Además, el ANOVA y p-valor se utilizaron para evaluar la significatividad de los términos lineales y de interacción de cada modelo.

La significancia estadística se evaluó a un nivel de 5% ($P \leq 0,05$) y los análisis se realizaron utilizando Statgraphics Plus para Windows, versión 5.1 (Manugistics, Inc., Rockville, MD, EE.UU.).

Capítulo I: Selección de los aceites esenciales, elaboración de nanoemulsiones y estudio de la estabilidad

Los objetivos de este capítulo fueron:

- Evaluar la acción antimicrobiana de varios aceites esenciales frente al desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii*, una levadura causante de deterioro en jugos ácidos.
- Seleccionar los aceites que posean mayor actividad antimicrobiana.
- Elaborar nanoemulsiones estables de los aceites esenciales seleccionados evaluando el efecto de distintos estabilizantes.

I. Resultados y discusión

I.1. Testeo de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales

En la Tabla I.1 se muestran, en orden decreciente, los diámetros de los halos de inhibición de los aceites esenciales testeados.

Tabla I.1. Promedio de halos de inhibición de los aceites esenciales testeados en agar Sabouraud.

Aceite Esencial	Halo (mm)
Corteza de canela	41,7 ± 0,7
Hojas de canela	19,5 ± 0,7
Lemongrass	17,8 ± 1,9
Menta	17,0 ± 1,0
Bergamota	14,1 ± 1,3
Albahaca	14,0 ± 1,0
Laurel	12,5 ± 1,0
Estragón	12,0 ± 1,0
Lavanda	11,0 ± 1,0
Salvia	sin halo
Jengibre	sin halo
Eucalipto	sin halo
Naranja	sin halo
Pomelo	sin halo

No todos los aceites esenciales probados mostraron una acción inhibitoria sobre el crecimiento de *Z. bailii* (Tabla I.1). El aceite esencial de corteza de canela (CC) fue el más efectivo, seguido por el de hojas (CH) de canela, mostrando halos de inhibición de

41,7 ± 0,7 y de 19,5 ± 0,7 mm, respectivamente. Luego continuaron los aceites de lemongrass (LG) (17,8 ± 1,9 mm), menta (M) (17,0 ± 1,0 mm) y bergamota (14,1 ± 1,0 mm). Estos resultados son consistentes con los informados por otros autores, quienes mostraron la alta efectividad del aceite esencial de canela con una MCI de 50 mg/L para *Z. bailii* y otras levaduras como *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida krusei* y *Torulaspota delbrueckii* (Monu y col., 2016; Ribes y col., 2017). Este ensayo fue útil como prueba preliminar de la efectividad de los aceites esenciales y para seleccionar los aceites con mayor actividad reduciendo el rango de aceites a utilizar.

A modo de ejemplo, en la Figura I.1 se pueden observar los halos de inhibición de los aceites de CC y CH frente a *Z. bailii*, siendo el primero el doble del último.

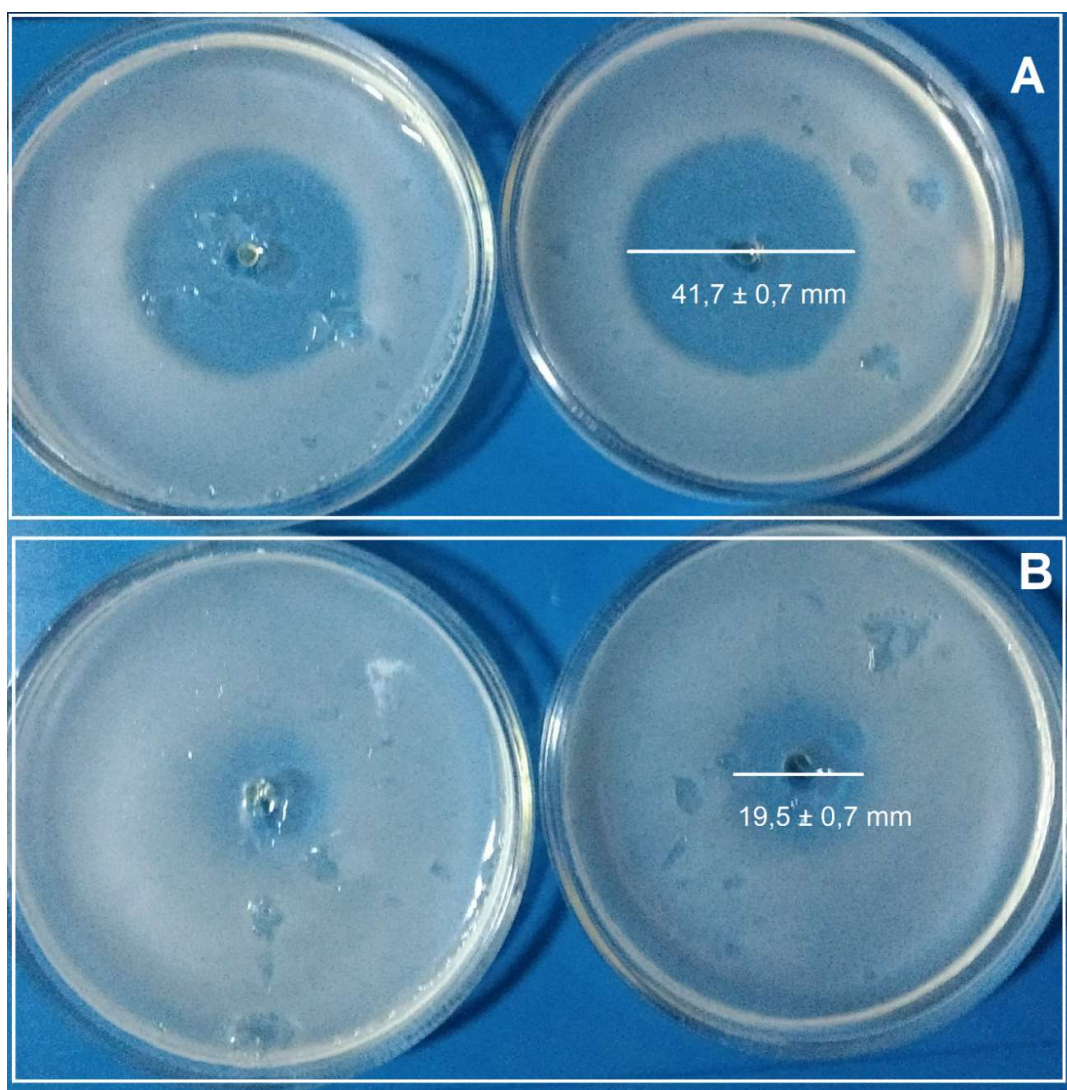


Figura I.1. Halos de inhibición de los aceites esenciales de corteza de canela (Panel A) y de hojas de canela (Panel B).

En base a la mayor efectividad, se seleccionaron los aceites esenciales de corteza (CC) y de hojas de canela (CH), lemongrass (LG) y menta (M) para la elaboración de nanoemulsiones.

I.2. Ensayos preliminares para la elaboración de nanoemulsiones

Para poder determinar las formulaciones finales de las emulsiones se realizaron ensayos preliminares. A continuación se describen las etapas del proceso de selección de variables y niveles para lograr nanoemulsiones estables:

- Se eligió comenzar con aceite esencial de lemongrass, goma arábica como estabilizante y Tween®20 como emulsificante. Los niveles de goma arábica iniciales utilizados estuvieron entre 10,00 y 20,00%, concentraciones que fueron elegidas en base a lo observado por Mirhosseini y col. (2008a). La concentración de aceite esencial elegida fue elevada, en un rango de 3,00 a 5,00%, debido a que la nanoemulsión, una vez elaborada, se utilizará como solución madre del antimicrobiano. Está reportado que valores de aceite esencial de eucalipto a un nivel de 16,66% forman nanoemulsiones estables para una relación con Tween®80 1:1 (Sugumar y col., 2014). Además, las pruebas se realizaron utilizando como medio caldo Sabouraud o agua destilada para finalmente elegir este último debido a que la goma arábica precipitó en el caldo.
- Para la elaboración se usaron dos equipos, un homogeneizador de alta velocidad Ultra-Turrax® (UT) y un Ultrasonido de alta intensidad (US). Como se describe en la Sección 3.1 de Materiales y Métodos, se utiliza uno u otro, o en combinación a fin de alcanzar tamaño de gota nanométrico.
- Una vez fijado el nivel de aceite a 3,00%, la concentración de goma arábica fue en disminución desde 2,00 hasta 0,20% dado que algunos autores observaron que una concentración de 0,40% fue crítica para la floculación y la consecuente inestabilidad de la nanoemulsión (Chanamai y McClements, 2001).

- Con el UT sólo se lograron obtener emulsiones gruesas de LG, es por ello que se decidió utilizar el US para reducir el tamaño de gota. Una de las variables a experimentar con dicho equipo fue la amplitud, en un rango de 20 a 40%, puesto que se observó que a mayor amplitud, menor tamaño de gota (Hashtjin y Abbasi, 2015). Sin embargo, no fue posible lograr emulsiones estables aumentando la amplitud ya que se producían vapores a medida que avanzaba la ultrasonicación, observando como resultado final dos fases en la nanoemulsión.
- Por último, se reemplazó el uso de Tween®20 por Tween®80 obteniéndose emulsiones con mayor estabilidad, mayor transparencia y menor tamaño de gota tal como observaron Gosh y col. (2013a) para nanoemulsiones de eugenol cuando se compararon ambos emulsificantes. Las concentraciones utilizadas de Tween®80 estuvieron en un rango de 0,50 a 9,00%, en base a lo estudiado por los autores antes mencionados (Ghosh y col., 2013a).

A partir de los ensayos preliminares realizados, se seleccionaron Tween® 80 y goma arábica (GA) en medio acuoso para elaborar las nanoemulsiones de lemongrass mediante la técnica que consiste, en primer lugar, en la elaboración de una emulsión gruesa con UT y luego, disminuir el tamaño de gota con US obteniendo nanoemulsiones de aceites esenciales.

I.3. Estudio del efecto de la goma arábica, del Tween®80 y del tiempo de ultrasonicación sobre la estabilidad de la nanoemulsión de lemongrass

Se estudió el efecto de la goma arábica, del Tween®80 y del tiempo de ultrasonicación sobre la estabilidad de la nanoemulsión de LG a los 14 días de almacenamiento a 25°C a través de un diseño de Box-Behnken. Todos los sistemas ensayados fueron estables y pudieron medirse a los 14 días de almacenamiento. Como medida de la estabilidad se utilizó el diámetro promedio de las gotas (Z-average). Los niveles ensayados y las respuestas se muestran en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Variables, niveles y respuestas del diseño de Box-Behnken.

Ensayo	Nivel de Tween®80 (%m/m)	Nivel de goma arábica (%m/m)	Tiempo de sonicación (minutos)	Z-average (nm)
1	9,00	0,15	5,0	15,41 ± 0,03
2	3,00	0,00	15,0	68,28 ± 0,35
3	6,00	0,30	5,0	198,75 ± 14,04
4	3,00	0,15	5,0	88,92 ± 1,72
5	3,00	0,30	15,0	73,43 ± 0,81
6	6,00	0,30	25,0	159,68 ± 6,53
7	9,00	0,30	15,0	16,51 ± 0,01
8	9,00	0,15	25,0	15,27 ± 0,20
9	9,00	0,00	15,0	27,19 ± 4,78
10	6,00	0,00	5,0	148,36 ± 8,12
11	6,00	0,00	25,0	141,46 ± 9,39
12	3,00	0,15	25,0	88,85 ± 0,81
13	6,00	0,15	15,0	145,30 ± 0,99
14	6,00	0,15	15,0	190,35 ± 29,85
15	6,00	0,15	15,0	153,05 ± 3,10
16*	9,00	0,30	25,0	14,06 ± 0,69
17*	9,00	0,00	10,0	13,35 ± 0,38

El análisis de regresión múltiple permitió ajustar los datos a una ecuación polinómica de primer orden cuyos coeficientes de regresión y su análisis estadístico se muestran en la Tabla I.3. El coeficiente de correlación ajustado (R^2_{aj}) fue 0,925 y la desviación promedio absoluta (AAD) fue 16,78. Estos resultados indican una buena correlación entre los valores observados y predichos de la respuesta y que el modelo proporciona una estimación razonablemente buena de la respuesta en el rango estudiado.

Los valores de probabilidad (p) de los coeficientes del modelo de regresión indican que sólo el nivel de Tween®80 ($p < 0,00001$) afectó significativamente el diámetro promedio de gota de la nanoemulsión de LG a un nivel de confianza del 95% (Tabla I.3.). Esto también puede observarse en la Figura I.2, la cual muestra la representación gráfica (Diagrama de Pareto) del tamaño del efecto de cada variable sobre el Z-average. Estos resultados también se observan en las superficies de respuesta obtenidas (Figuras I.3, I.4 y I.5), como se discute a continuación.

Tabla I.3. Valores-p, coeficiente de correlación (R^2_{aj}), desviación promedio absoluta (AAD), coeficientes de regresión del modelo de regresión para el diámetro promedio (Z-average). Variables independientes, X_1 : nivel de goma arábica, X_2 : tiempo de ultrasonificación, X_3 : nivel de Tween®80. Coeficientes, α_1 : goma arábica, α_2 : tiempo de ultrasonificación, α_3 : nivel de Tween®80, α_{1-2} : interacción goma arábica-tiempo, α_{1-3} : interacción goma arábica-nivel de Tween®80, α_{2-3} interacción tiempo de ultrasonificación-nivel de Tween®80.

Diámetro promedio (z-average)	p-valor	X_1	0,8168
		X_2	0,9109
		X_3	0,0000
		$X_1 * X_2$	0,3329
		$X_1 * X_3$	0,7589
		$X_2 * X_3$	0,8590
	R^2_{aj}		0,925
	AAD		16,78
	Coeficientes de regresión	α_0	231,139
		α_1	84,5383
		α_2	0,875337
		α_3	-25,7435
		α_{1-2}	- 8,13167
α_{1-3}		8,51	
	α_{2-3}	0,0738417	

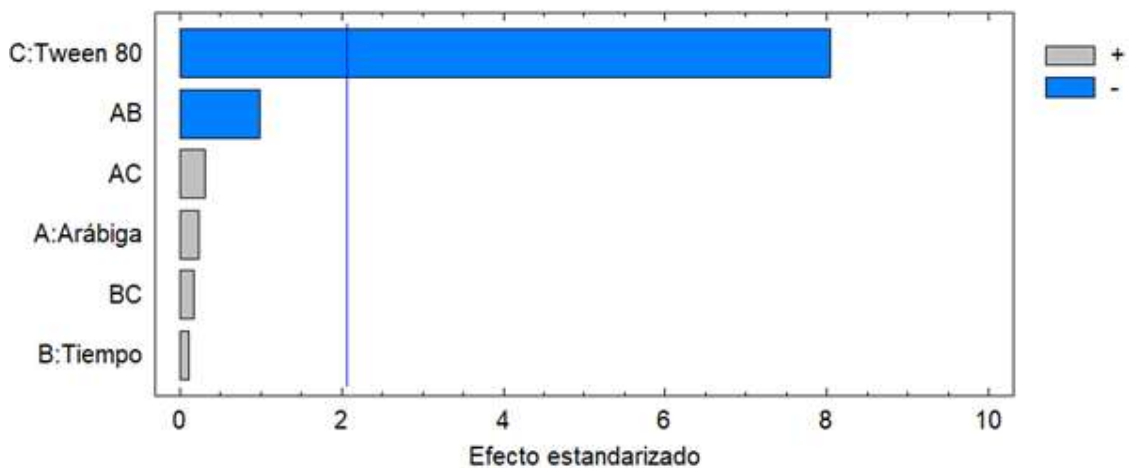


Figura I.2. Diagrama de Pareto para los efectos individuales y las interacciones significativas sobre el valor del diámetro promedio.

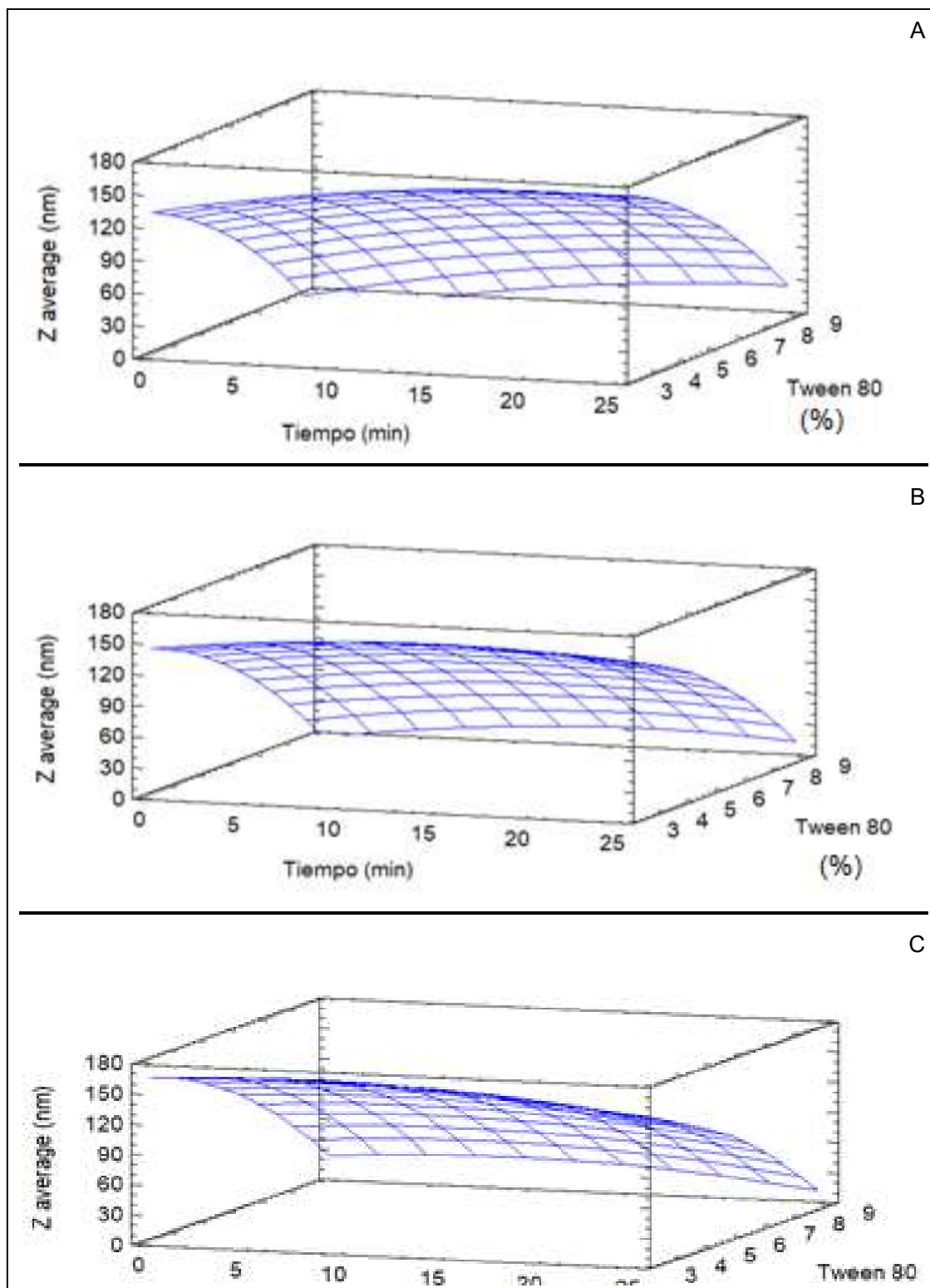


Figura I.3. Gráficos de superficie de respuesta estimados para la combinación del efecto del nivel de Tween@80 y del tiempo de ultrasonicación sobre el Z-average para cada concentración de goma arábiga estudiada: 0,00% m/m (Panel A), 0,15% m/m (Panel B); 0,30% m/m (Panel C).

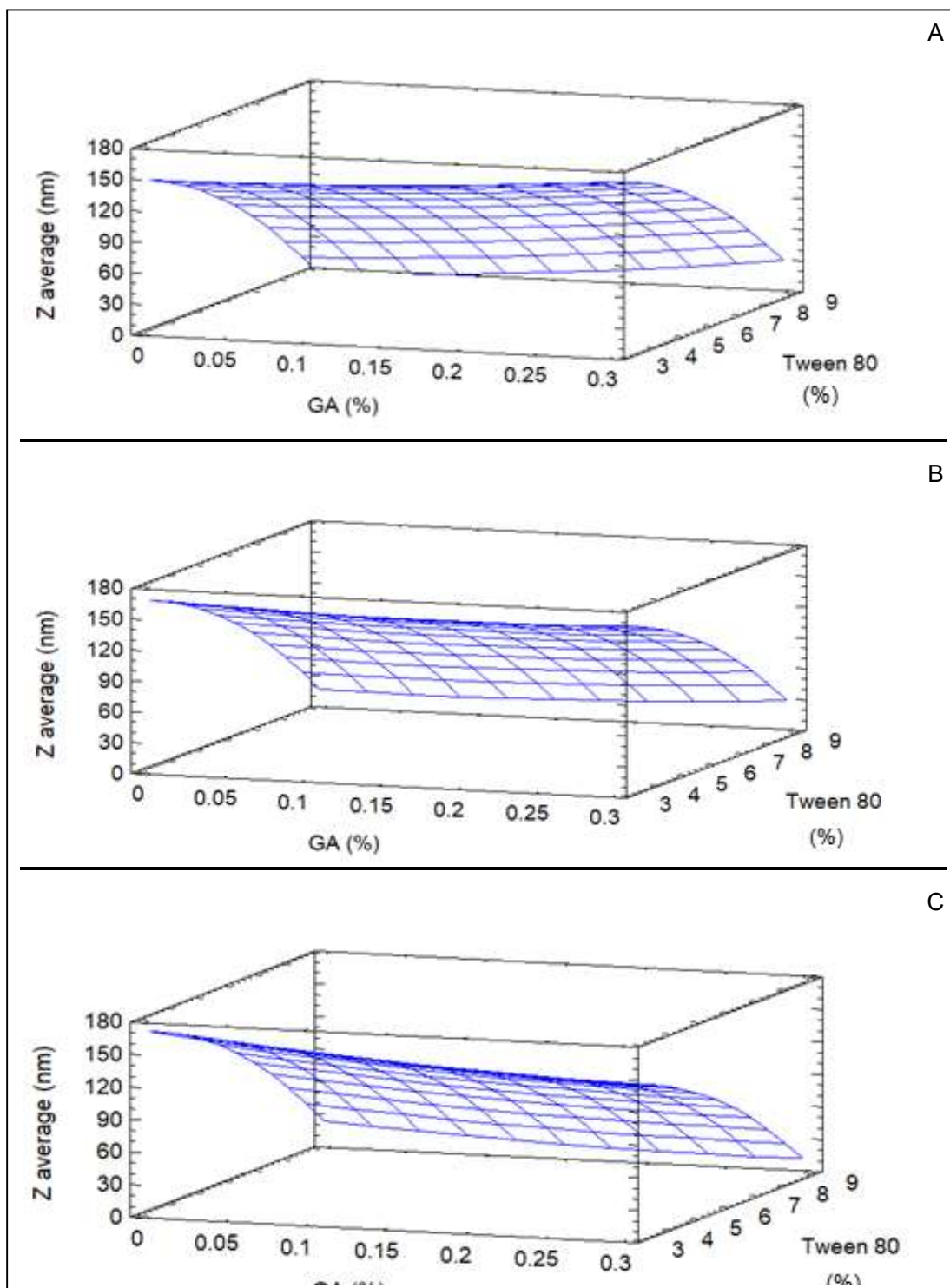


Figura I.4. Gráficos de superficie de respuesta estimados para la combinación del efecto del nivel de Tween®80 y de la concentración de goma arábiga sobre el Z-average para cada tiempo de ultrasonificación estudiado: 5,0 minutos (Panel A), 15,0 minutos (Panel B); 25,0 minutos (Panel C).

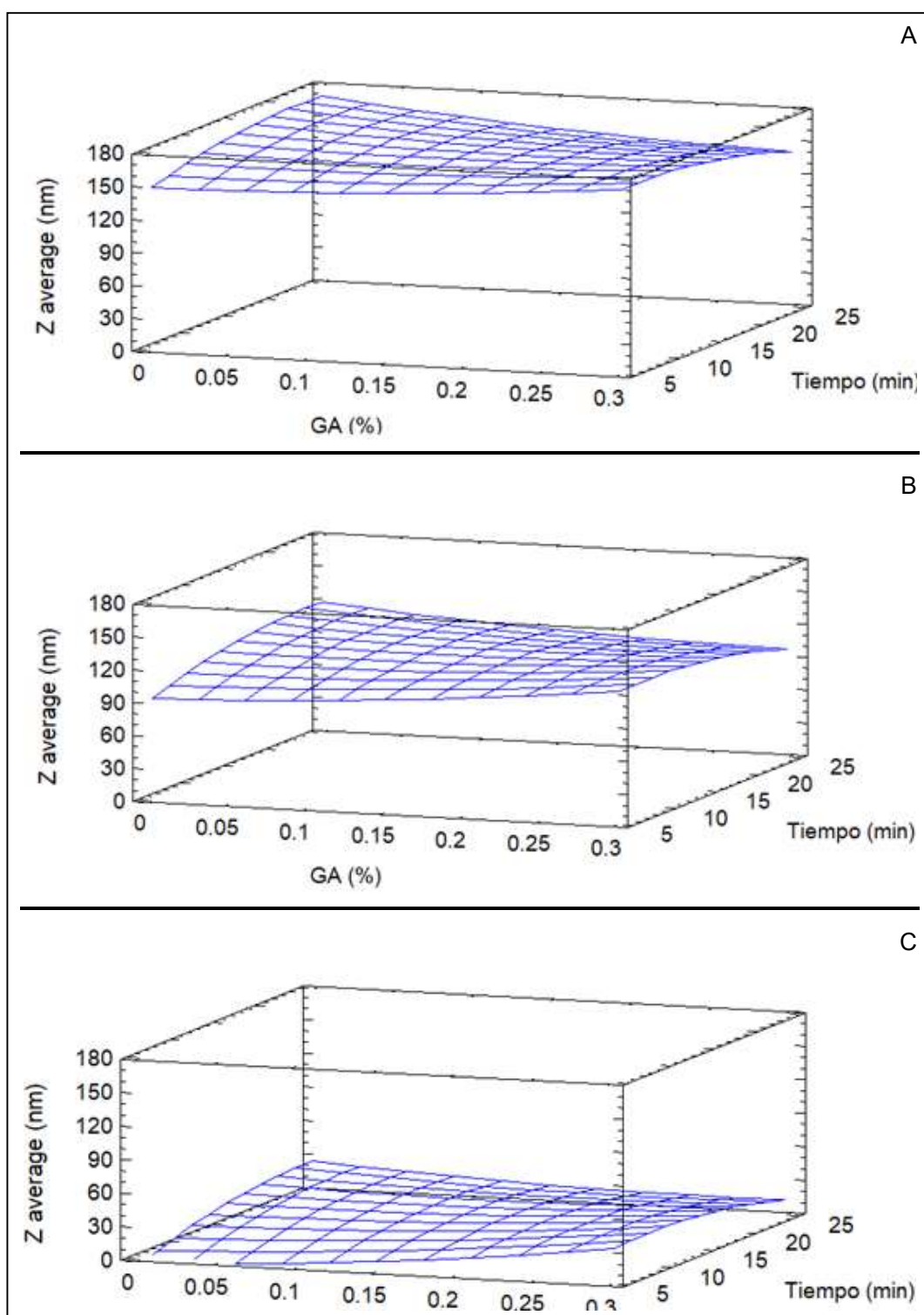


Figura I.5. Gráficos de superficie de respuesta estimados para la combinación del efecto del tiempo de ultrasonicación y de la concentración de goma arábica sobre el Z-average para cada concentración de Tween@80 estudiada: 3,00% m/m (Panel A), 6,00% m/m (Panel B); 9,00% m/m (Panel C).

Las superficies de respuesta muestran que, independientemente del tiempo de ultrasonificación (Figura I.3) y de la presencia de GA (Figura I.4), al aumentar la concentración de Tween®80 de 3,00 a 9,00 %, se produjo una disminución significativa del diámetro promedio. Por otra parte, se observa que el incremento del nivel de GA o del tiempo de ultrasonificación no afectó el valor de Z-average, independientemente de la presencia de Tween®80 (Figura I.5). Por lo tanto, como se mencionó, la presencia de GA y el tiempo de ultrasonificación no tuvieron efecto significativo sobre el diámetro de gota.

Considerando los coeficientes de regresión del ajuste de los datos se obtiene la siguiente ecuación de primer orden para el diámetro promedio (Z-average):

Ecuación I.1

$$\text{Z-average} = 231,139 + 84,5383 \cdot \text{GA} + 0,875337 \cdot t - 25,7435 \cdot \text{T80} - 8,13167 \cdot \text{GA} \cdot t + 8,51 \cdot \text{GA} \cdot \text{T80} + 0,0738417 \cdot t \cdot \text{T80}$$

donde GA es el nivel de goma arábica; t, el tiempo de ultrasonificación y T80, el nivel de Tween®80.

Para la validación del modelo de regresión se formularon los sistemas que se indican en los ensayos 16 y 17 de la Tabla I.2. Se graficaron los datos observados versus los predichos por el modelo (Ecuación I.1) de los diámetros promedio de las nanoemulsiones de LG a los 14 días de almacenamiento a 25°C (Figura I.6), incluyendo los sistemas formulados para la validación. El gráfico permite visualizar qué tan alejados están los puntos de la recta $y = z$, así como las tendencias de los puntos a dicha recta, la cual representa la exactitud ideal. La distribución de los puntos en la Figura I.6 muestra que éstos se encuentran "cerca" y alrededor de la exactitud ideal ($y = z$), esto indica gráficamente que el modelo no presenta sesgo en sus pronósticos (Piñeiro y col., 2008).

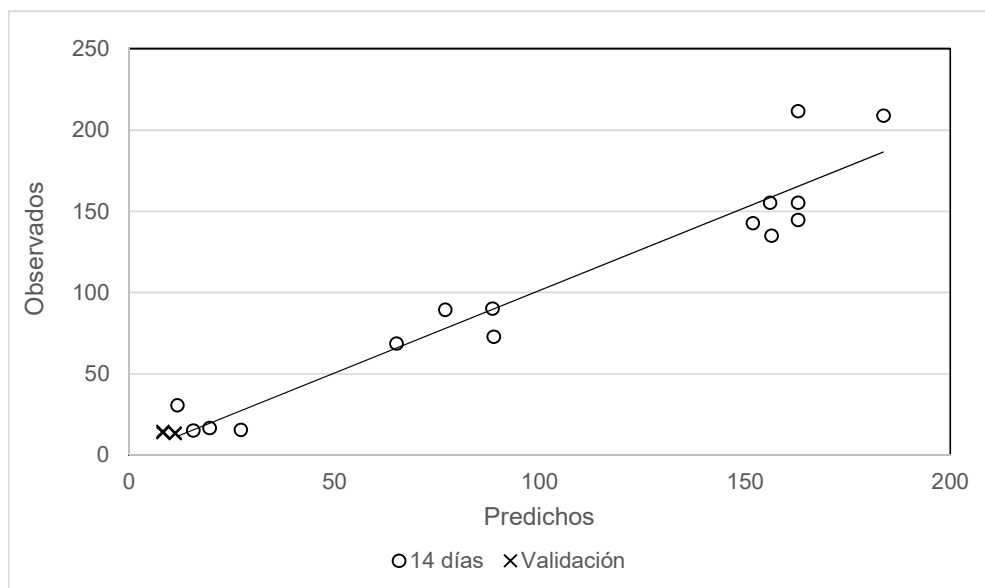


Figura I.6. Diámetros promedio (Z-average) observados versus predichos de las nanoemulsiones de lemongrass a los 14 días de almacenamiento.

Mediante la aplicación de la Ecuación I.1 se obtiene que la combinación de factores que minimiza el tamaño de gota es: 0,00% GA, 9,00% Tween®80 y 5,0 minutos de ultrasonicación, el valor de Z-average predicho es 11,27 nm, siendo el valor experimental 12,90 nm.

En base a los resultados obtenidos se decide utilizar 9,00% m/m de Tween®80 en ausencia de GA para la elaboración de las nanoemulsiones, ya que en estas condiciones se observó el menor diámetro promedio. En cuanto al tiempo de ultrasonicación, se seleccionaron 5,0 y 25,0 minutos de ultrasonicación para evaluar el efecto del tiempo de ultrasonicación sobre la actividad antimicrobiana de los aceites, como se verá más adelante, ya que sus tamaños de gota a los 14 días de elaboración fueron muy similares ($13,75 \pm 0,35$ nm para 5,0 minutos y $13,60 \pm 1,41$ nm para 25,0 minutos). Si bien estos ensayos se realizaron con aceite de lemongrass, se utilizaron las mismas variables para elaborar las nanoemulsiones del resto de los aceites seleccionados.

I.4. Evaluación del efecto de la metodología de emulsificación sobre la estabilidad de las nanoemulsiones

En la formulación de las nanoemulsiones de CC y CH se utilizaron 15000 ppm de aceite esencial porque no se llegaron a obtener nanoemulsiones con 30000 ppm como en el caso de los aceites de LG y M.

Las emulsiones gruesas o primarias de LG, CC y M, elaboradas con el homogeneizador de alta velocidad (UT), fueron de color blanco con aspecto lechoso y se volvieron completamente transparentes luego de la ultrasonificación. Por el contrario, la emulsión UT de CH fue transparente y no cambió luego de la ultrasonificación. Esto indica que la utilización del homogeneizador de alta velocidad permitió obtener una nanoemulsión sólo para el caso de CH, mientras que para LG, CC y M, se obtuvieron nanoemulsiones recién luego de someter a ultrasonificación a la emulsión gruesa, independientemente del tiempo de ultrasonificación. A modo de ejemplo, se muestra en la Figura I.7 la emulsión gruesa de lemongrass (Panel A) y la nanoemulsión obtenida luego de someterla a ultrasonificación (Panel B) por 5,0 minutos.

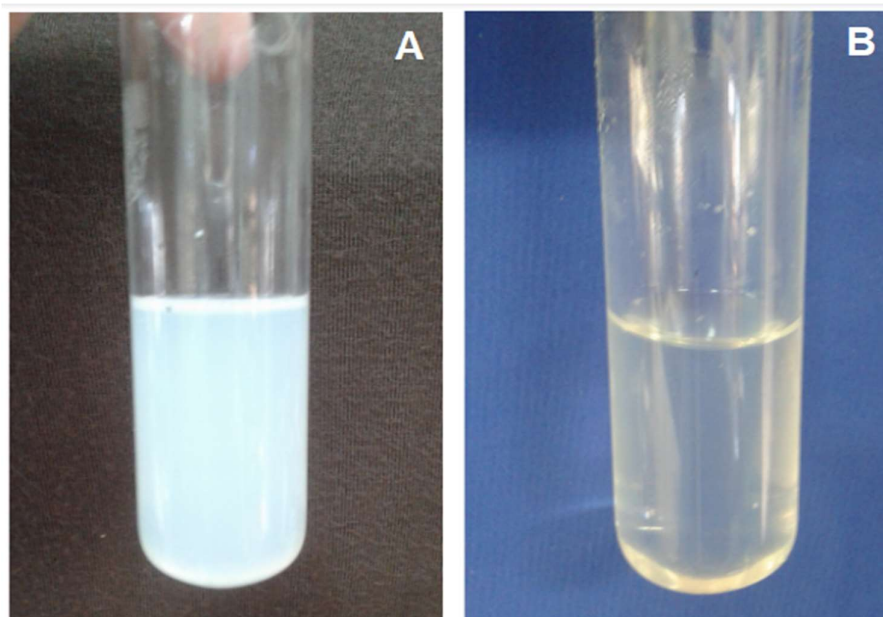


Figura I.7. Emulsión gruesa de lemongrass obtenida con el homogeneizador de alta velocidad (Panel A) y nanoemulsión de lemongrass obtenida luego de 5,0 minutos de ultrasonificación (Panel B).

La calidad, la estabilidad, la uniformidad y la dispersabilidad de las nanoemulsiones se pueden describir por la distribución del tamaño de partícula, diámetro promedio e IPD (Zhang y col., 2017). En las Figuras I.8, I.9, I.10 y I.11 se muestran las distribuciones de tamaño por intensidad y volumen de las nanoemulsiones US-5 y US-25 de los aceites de LG, CC y M, y las nanoemulsiones UT y US-25 del aceite de CH, a los 14 y 65 días de almacenamiento a 25°C. Los tiempos intermedios mostraron un comportamiento similar.

En particular, la distribución en intensidad de las gotas de todas las nanoemulsiones fue trimodal, con tamaños de alrededor de 13 nm para LG, 16 nm para CH y 17 nm para CC correspondientes al pico de mayor intensidad (Panel A, Figuras I.8, I.9 y I.10, respectivamente). La nanoemulsión de M presentó mayores valores al inicio de la elaboración que luego fueron disminuyendo con el tiempo de almacenamiento mostrando un pico de mayor intensidad de alrededor de 22 nm (Figura I.11, Panel A).

Los aumentos en el diámetro promedio y en los valores IPD indican que la nanoemulsión US-25 de CC fue menos uniforme y más polidispersa que la US-5, lo que demuestra que el aumento en el tiempo de ultrasonificación no mejoró la estabilidad (Tablas I.4 y I.5).

Los IPD de las nanoemulsiones de M fueron los mayores de todos los aceites estudiados, pero estables en el tiempo y sin presentar diferencias significativas entre tiempos de ultrasonificación.

La constancia de los parámetros IPD y diámetro promedio a lo largo del tiempo es un indicador de la estabilidad de las emulsiones y el IPD está relacionado con la desviación del tamaño promedio (Klang y col., 2012; Guerra-Rosas y col., 2016; Zhang y col., 2017).

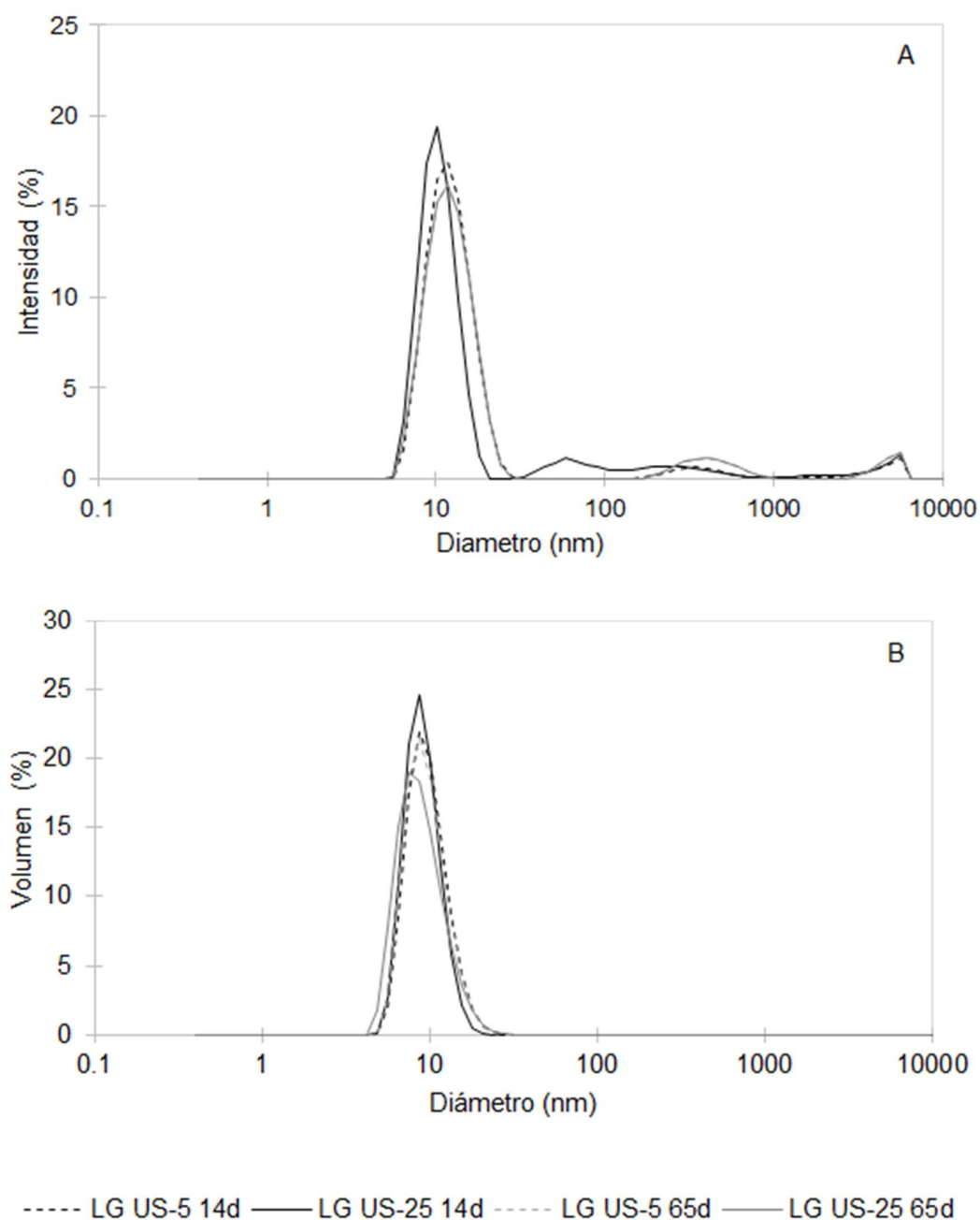


Figura I.8 Distribución de tamaño de gotas por intensidad (Panel A) y por volumen (Panel B) para nanoemulsiones de aceite esencial de lemongrass (LG) sometidas a 5,0 (US-5) y 25,0 (US-25) minutos de ultrasonificación a los 14 y 65 días de almacenamiento a 25°C.

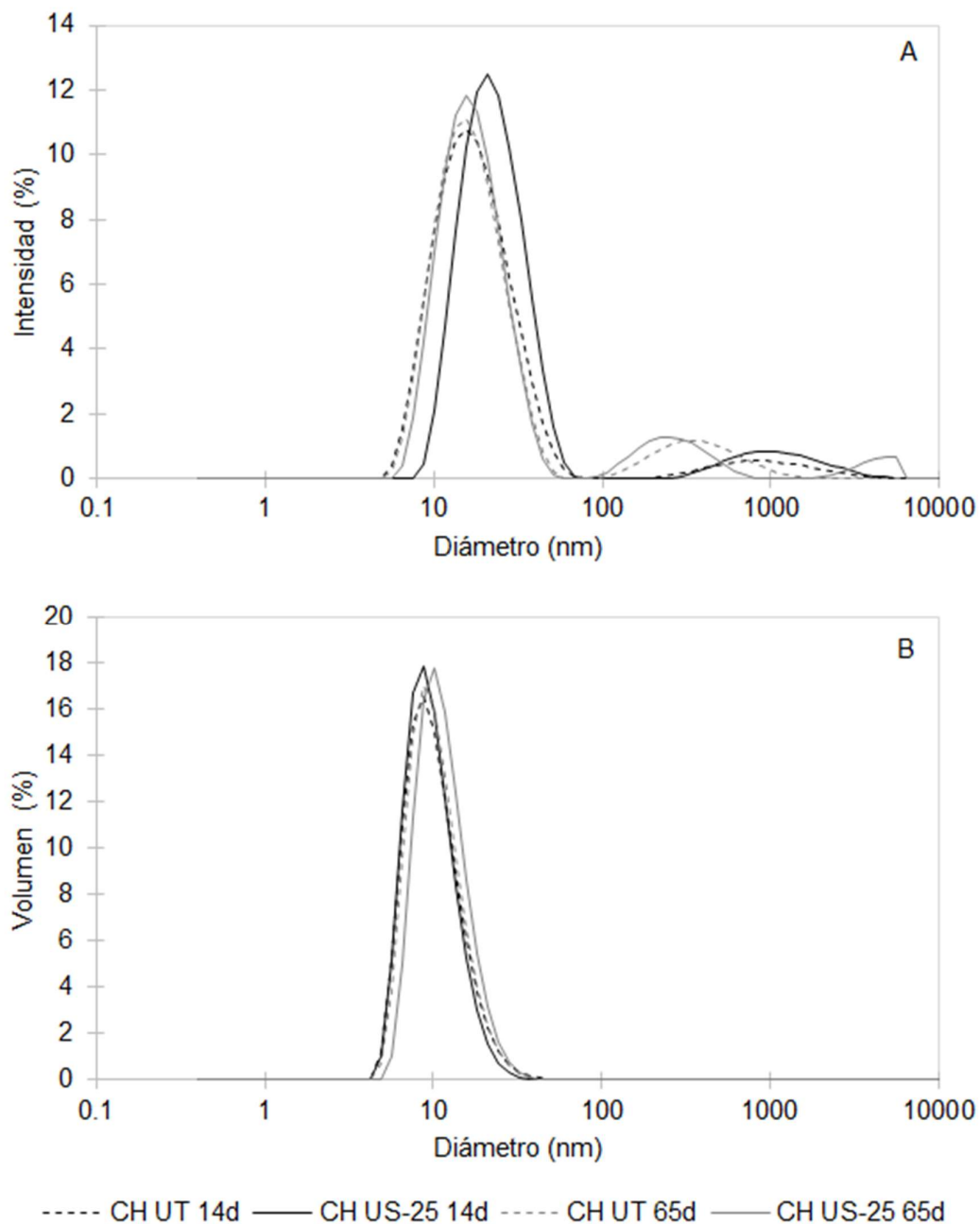


Figura I.9. Distribución de tamaño de gotas por intensidad (Panel A) y por volumen (Panel B) para nanoemulsiones de aceite esencial de hojas de canela (CH) elaboradas con un homogeneizador de alta velocidad (UT) y sometida a 5,0 de ultrasonificación (US-5) a los 14 y 65 días de almacenamiento a 25°C.

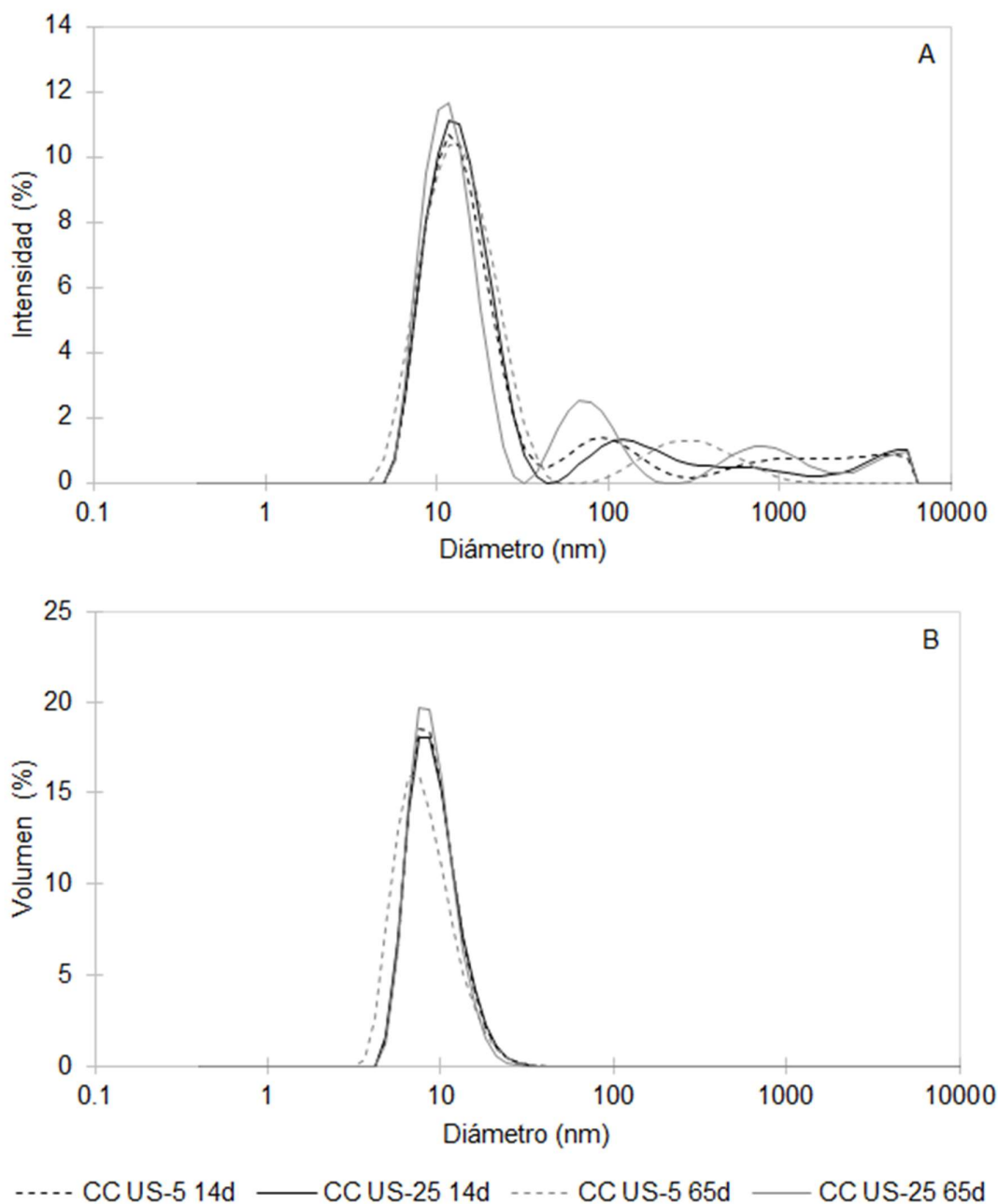


Figura I.10. Distribución de tamaño de gotas por intensidad (Panel A) y por volumen (Panel B) para nanoemulsiones de aceite esencial de corteza de canela (CC) sometidas a 5,0 (US-5) y 25,0 (US-25) minutos de ultrasonificación a los 14 y 65 días de almacenamiento a 25°C.

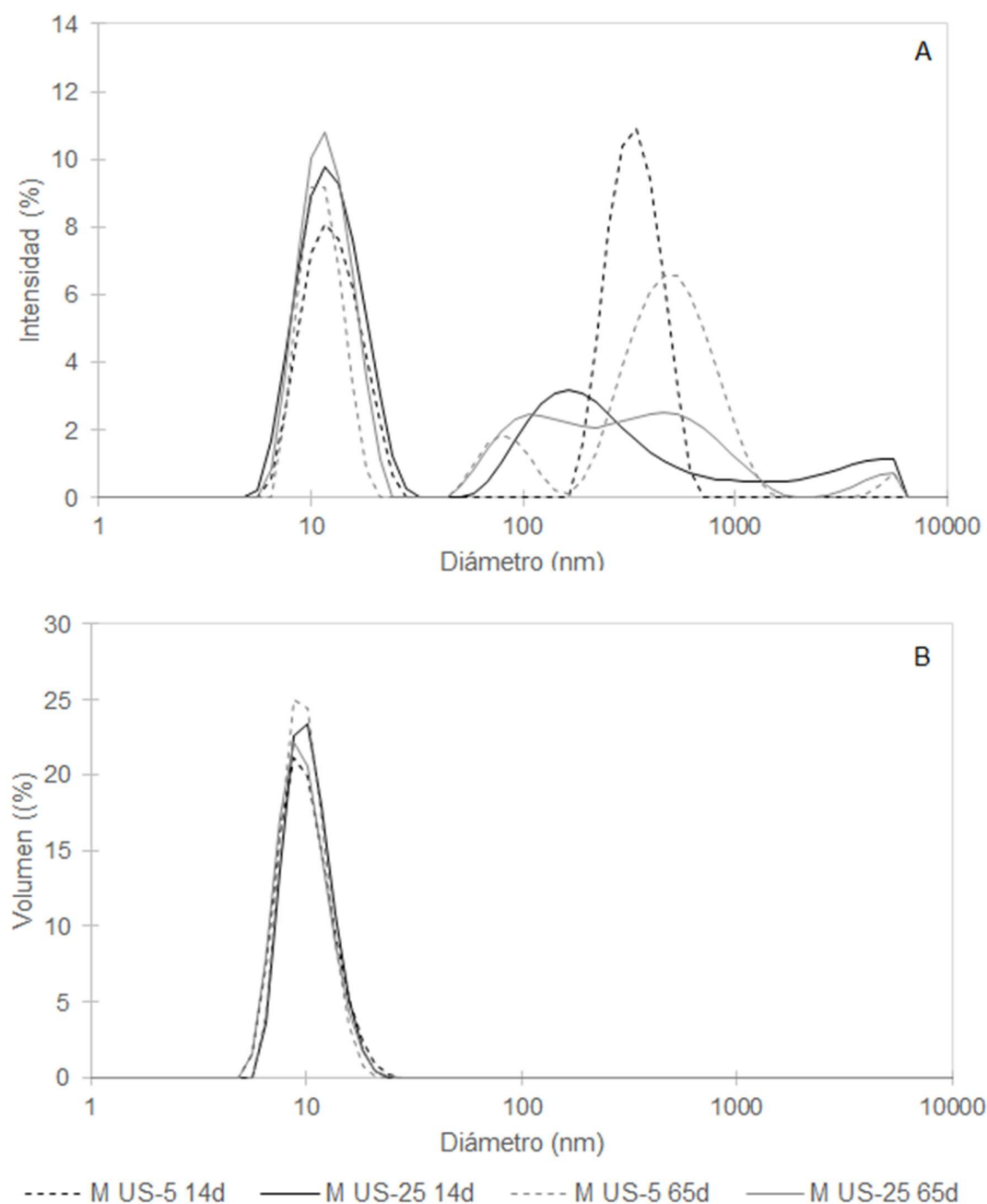


Figura I.11. Distribución de tamaño de gotas por intensidad (Panel A) y por volumen (Panel B) para nanoemulsiones de aceite esencial de menta (M) sometidas a 5,0 (US-5) y 25,0 (US-25) minutos de ultrasonificación a los 14 y 65 días de almacenamiento a 25°C.

Con respecto a la distribución del tamaño en volumen, se observó un solo pico alrededor de los valores antes mencionados de diámetro para cada aceite, para todas las emulsiones y tiempos de almacenamiento ensayados (Figuras I.8, I.9, I.10 y I.11, Panel B). Este resultado indica que las gotas del pico con mayor intensidad corresponden a la mayor población de gotas de las nanoemulsiones, mostrando que las distribuciones en volumen de las nanoemulsiones fueron monomodales.

Los valores obtenidos de diámetros promedio para las distintas nanoemulsiones en función del tiempo de almacenamiento se muestran en la Tabla I.4. Los valores de los diámetros promedio de las nanoemulsiones indican que se lograron emulsiones en escala nanométrica con la metodología utilizada (Rao y McClements, 2011).

Tabla I.4. Valores de diámetro promedio (nm) de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de: lemongrass (LG), hojas de canela (CH), corteza de canela (CC) y menta (M) en función del tiempo de almacenamiento. US: Ultrasonido; UT: homogeneizador de alta velocidad; 5,0 y 25,0: tiempo de ultrasonicación (min); (---) valores no determinados. Para cada aceite por separado, los valores seguidos por la misma letra minúscula dentro de cada columna y por la misma letra mayúscula dentro de cada fila no presentan diferencias significativas (alfa = 0,05).

Aceite esencial	Metodología	Tiempo de almacenamiento a 25°C (días)				
		0	7	14	28	65
LG	US-5	---	---	13,72 ± 0,45 ^{a,A}	12,85 ± 0,59 ^{b,A}	12,73 ± 0,47 ^{c,A}
	US-25	---	---	13,73 ± 1,71 ^{a,B}	12,27 ± 0,74 ^{b,B}	12,25 ± 0,15 ^{c,B}
CH	UT	16,50 ± 0,06 ^{d,C}	16,21 ± 0,10 ^{e,C}	16,09 ± 0,08 ^{f,C}	16,17 ± 0,12 ^{g,C}	18,43 ± 0,30 ^{h,D}
	US-5	16,58 ± 0,13 ^{d,E}	16,17 ± 0,10 ^{e,E}	16,11 ± 0,07 ^{f,E}	16,08 ± 0,09 ^{g,E}	16,88 ± 0,38 ^{i,E}
	US-25	16,94 ± 0,51 ^{d,F}	16,31 ± 0,08 ^{e,F}	16,29 ± 0,11 ^{f,F}	16,25 ± 0,12 ^{g,F}	17,60 ± 0,50 ^{i,F}
CC	US-5	---	17,26 ± 0,46 ^{j,G}	17,04 ± 0,17 ^{k,G}	---	---
	US-25	17,64 ± 0,41 ^H	18,36 ± 0,07 ^{j,H}	19,68 ± 0,08 ^{i,J}	---	---
M	US-5	---	182,62 ± 53,45 ^{m,K}	52,00 ± 18,85 ^{o,L}	32,32 ± 2,49 ^{q,M}	33,98 ± 0,86 ^{s,M}
	US-25	---	22,63 ± 1,09 ^{n,N}	21,85 ± 1,15 ^{p,N}	24,91 ± 2,29 ^{r,N}	21,57 ± 0,66 ^{t,N}

En el caso de la nanoemulsión de LG, sólo fue posible obtener mediciones repetitivas y no significativas recién a partir de los 14 días de elaboración mientras que las nanoemulsiones de CH se mantuvieron estables desde el inicio del almacenamiento (Tabla I.4).

Con relación al efecto del tiempo de ultrasonicación (Tabla I.4), para el caso del LG y CH, no hubo diferencias significativas entre los diámetros de gotas de las

nanoemulsiones para todos los tiempos de ultrasonicación y entre los tiempos de almacenamiento. Para la nanoemulsión de CH obtenida por UT, se observaron diferencias recién a los 65 días. A ese tiempo, el tamaño de gota de esa nanoemulsión fue mayor que los de las ultrasonicadas.

Respecto a las nanoemulsiones de CC, sólo fue posible obtener mediciones repetitivas de diámetros promedio a los 7 y 14 días para US-5 y desde el inicio del almacenamiento para US-25. Hasta los 14 días, los diámetros promedio de US-25 fueron significativamente más altos que US-5 y aumentaron con el tiempo, mientras que no hubo efecto del tiempo de almacenamiento para US-5.

Se obtuvieron medidas repetitivas de los diámetros de las nanoemulsiones de M a partir de los 7 días de almacenamiento. En el caso de US-5, los diámetros disminuyeron con el tiempo, mientras que para US-25 se mantuvieron estables (Tabla I.4). La tendencia a la reducción del tamaño con el tiempo de almacenamiento también fue observada para una nanoemulsión de aceite esencial de naranja, cuyo tamaño de gota disminuyó a las 4 semanas de almacenamiento a 25°C, alcanzando un valor de 15 nm (Hashtjin y Abbasi, 2015). Este comportamiento estaría vinculado con la reducción gradual de la barrera de alta energía cinética que muestran los sistemas emulsionados, hasta que alcanzan el equilibrio cinético (Rao y McClements, 2011; Hashtjin y Abbasi, 2015; Lu y col., 2018).

El hecho de que el incremento en el tiempo de ultrasonicación no modifique el tamaño de gota está relacionado con el aumento en la densidad de energía de entrada, que produce una disminución exponencial en el tamaño de la gota, llegando a una zona de meseta, donde un mayor aumento en el tiempo de ultrasonicación no tiene efecto en el tamaño (Delmas y col., 2011; Abbas y col., 2013). Esta zona podría haberse alcanzado en las nanoemulsiones de LG y CH después de 5,0 minutos de ultrasonicación.

Cabe señalar que después de un almacenamiento de 65 días, para LG, CH y M, o de 14 días, para CC, se observaron distribuciones polimodales de tamaños por lo que no se pudieron registrar los diámetros promedio. Sin embargo, las nanoemulsiones permanecieron ópticamente transparentes y ninguno de los fenómenos de desestabilización (separación gravitacional, floculación y coalescencia) se observaron hasta, al menos, 120 días de almacenamiento.

Los IPD de las nanoemulsiones de LG y CH no variaron con el tiempo de almacenamiento ni con el tiempo de ultrasonicación (Tabla I.5), a excepción del sistema US-25 de CH, cuyo IPD aumentó significativamente a los 65 días.

Tabla I.5. Valores de índice de polidispersidad de nanoemulsiones de los aceites esenciales de: lemongrass (LG), hojas de canela (CH), corteza de canela (CC) y menta (M) según el tiempo de almacenamiento. US: Ultrasonido; UT: homogeneizador de alta velocidad; 5 y 25: tiempo de ultrasonificación (min); (---) valores no determinados. Para cada aceite por separado, los valores seguidos por la misma letra minúscula dentro de cada columna y por la misma letra mayúscula dentro de cada fila no presentan diferencias significativas (alfa = 0,05).

AE	Metodología	Tiempo de almacenamiento a 25°C (días)				
		0	7	14	28	65
LG	US-5	---	---	0,34 ± 0,09 ^{a,A}	0,25 ± 0,06 ^{b,A}	0,26 ± 0,03 ^{c,A}
	US-25	---	---	0,39 ± 0,08 ^{a,B}	0,33 ± 0,10 ^{b,B}	0,25 ± 0,05 ^{c,B}
CH	UT	0,27 ± 0,02 ^{d,C}	0,26 ± 0,01 ^{e,C}	0,25 ± 0,01 ^{f,C}	0,26 ± 0,02 ^{g,C}	0,24 ± 0,01 ^{h,C}
	US-5	0,28 ± 0,01 ^{d,D}	0,25 ± 0,01 ^{e,D}	0,24 ± 0,01 ^{f,D}	0,25 ± 0,01 ^{g,D}	0,29 ± 0,01 ^{h,D}
	US-25	0,30 ± 0,01 ^{d,E}	0,28 ± 0,01 ^{e,E}	0,28 ± 0,02 ^{f,E}	0,26 ± 0,02 ^{g,E}	0,50 ± 0,03 ^{i,F}
CC	US-5	0,82 ± 0,15 ^{i,G}	0,42 ± 0,04 ^{i,H}	0,42 ± 0,01 ^{m,H}	---	---
	US-25	0,41 ± 0,01 ^{k,J}	0,47 ± 0,01 ^{l,J}	0,54 ± 0,01 ^{n,J}	---	---
M	US-5	---	0,64 ± 0,13 ^{o,K}	0,64 ± 0,10 ^{p,K}	0,64 ± 0,04 ^{q,K}	0,63 ± 0,02 ^{r,K}
	US-25	---	0,60 ± 0,04 ^{o,L}	0,62 ± 0,02 ^{p,L}	0,61 ± 0,04 ^{q,L}	0,67 ± 0,04 ^{r,L}

Las nanoemulsiones de aceites esenciales pueden usarse como sistemas coloidales para el suministro de aceites esenciales en productos alimenticios, por lo que es interesante estudiar su estabilidad, ya que deben almacenarse antes de ser utilizadas. Las nanoemulsiones son sistemas "meta-estables" cuyo proceso de formación no es espontáneo (energía libre de Gibbs positiva). El proceso de ultrasonido reduce de manera eficiente el tamaño de las gotas debido a que ofrece altas tasas de deformación (hasta 10^9 s^{-1}) al sistema (Mason y col., 2006; Delmas y col., 2011). En los ensayos realizados en este trabajo, la presencia de Tween®80 permitió disminuir la tensión interfacial en la interfaz aceite/agua, reduciendo la energía libre del proceso de formación. Además, el nivel de Tween®80 (relación aceite/surfactante 1: 3) utilizado y el aporte de energía asociado con la homogeneización de alta velocidad fueron suficientes para alcanzar la nanoemulsión de CH en el homogeneizador de alta velocidad (Rao y McClements, 2011). Es poco frecuente obtener nanoemulsiones de esta composición mediante homogeneización de alta velocidad, ya que esta metodología es útil en el caso de emulsiones de alta viscosidad o cuando el emulsionante tiene cinética de adsorción lenta (Neumann y col., 2018). Este resultado es interesante porque los métodos de emulsificación de baja energía son preferidos a

los de alta energía, ya que los primeros son aquellos en los cuales la energía requerida para producir la emulsión proviene de las transiciones o cambios de fases que se producen durante la formación de las mismas y consumen menos energía (Sugumar y col., 2016). Por otro lado, es poco probable que se produzca un fenómeno de engrosamiento en las nanoemulsiones "meta-estables". Este estado puede persistir durante mucho tiempo, incluso sin cambiar la evolución del tamaño de la gota (Mason y col., 2006).

Recientemente, se está incrementando el interés por la incorporación de aceites esenciales en nanoemulsiones. Se han obtenido nanoemulsiones de lemongrass por ultrasonido en presencia de alginato de sodio como agente estabilizante y Tween®80 como agente tensioactivo alcanzando un diámetro de 4,31 nm (Salvia-Trujillo y col., 2013). Ghosh y col. (2013) informaron que el nivel de Tween®80 y el tiempo de ultrasonificación están inversamente relacionados con el tamaño medio de las gotas de las nanoemulsiones de CH, obteniendo una formulación estable (65 nm de diámetro de gotas) después de 30 min de ultrasonificación en presencia de una relación de aceite/surfactante de 1: 3.

En resumen, la ultrasonificación redujo los tamaños de gota de las emulsiones gruesas de LG, CC y M a escala nanométrica, obteniéndose nanoemulsiones. Por otro lado, la nanoemulsión de CH se obtuvo después de la homogeneización a alta velocidad. Todas ellas fueron estables durante el almacenamiento a 25°C por, al menos, 120 días. El aumento del tiempo de ultrasonificación para las nanoemulsiones LG, CH y M, o la aplicación de ultrasonido en la nanoemulsión de CH obtenida por homogeneización de alta velocidad no tuvieron ningún efecto sobre la estabilidad. El aumento del tiempo de ultrasonificación redujo el tamaño de gota para las nanoemulsiones de M.

Debido a que no se obtuvieron diferencias significativas en el diámetro promedio de gota de las nanoemulsiones al aumentar el tiempo de ultrasonificación, se decidió seleccionar las nanoemulsiones sonicadas por 5,0 minutos ya que se conoce que el proceso de ultrasonido de alta intensidad puede aumentar la temperatura en las zonas que rodean al sonotrodo y esto podría traer como consecuencia un deterioro en los aceites esenciales que son termolábiles, afectando su actividad antimicrobiana. Además, al tener menor tiempo de ultrasonificación, la energía utilizada en este proceso es menor que a mayor tiempo de ultrasonificación (Mc Clements, 2011).

I. Conclusiones

El aceite esencial de CC fue el que mostró mayor actividad frente al desarrollo de *Z. bailii*, seguido por los aceites de CH, LG y M. En base a estos resultados, se decidió seleccionar estos aceites para la elaboración de nanoemulsiones con el objetivo de utilizarlas como soluciones madre de antimicrobianos en la formulación de alimentos.

El nivel de Tween®80 fue el factor que determinó la mayor disminución significativa en el tamaño de gota de las nanoemulsiones, por ello fue seleccionado en una relación aceite: Tween®80 de 1:3. La presencia de goma arábica no afectó el tamaño de gota, por ello fue descartada de las formulaciones de las nanoemulsiones.

La metodología utilizada para la elaboración de nanoemulsiones influyó en el tamaño de gota cuando se utilizaron distintos equipos para su fabricación. Se lograron obtener nanoemulsiones estables sólo de CH con el homogeneizador de alta velocidad. La ultrasonificación durante 5,0 minutos fue suficiente para obtener nanoemulsiones de CC y LG y fueron necesarios 25,0 minutos de ultrasonificación para obtener una nanoemulsión estable de M desde el inicio de su elaboración.

Las nanoemulsiones obtenidas fueron monomodales hasta los 65 días de almacenamiento, a excepción de la nanoemulsión de CC que fue hasta los 14 días. Todas las nanoemulsiones permanecieron transparentes hasta, al menos, 120 días de almacenamiento a 25°C. Lograr una nanoemulsión estable en el tiempo permitiría su uso para preservar alimentos ya que, su tamaño de gota nanométrico le confiere mayor área interfacial respecto al de una emulsión de mayor tamaño de gota, por lo tanto mayor sería el área de contacto entre el antimicrobiano y la fase acuosa, donde crecen los microorganismos, permitiendo, probablemente, una mayor acción antimicrobiana con menor concentración de aceite y minimizando los posibles efectos sensoriales en el producto final. Además, permitiría prescindir del uso de conservantes sintéticos.

En base a todos los resultados obtenidos en el testeado de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, en la elaboración de las nanoemulsiones y en el estudio de su estabilidad, se decide seleccionar los aceites esenciales de CC, CH, LG y M elaborados con 5,0 y 25,0 minutos de ultrasonificación para estudiar su actividad antimicrobiana en sistemas modelo. Cabe destacar que, si bien el aumento del tiempo de ultrasonificación no fue determinante para disminuir el tamaño de gota de las nanoemulsiones, se seleccionaron ambos tiempos a fin de estudiar el posible efecto sobre la acción antimicrobiana de los aceites que podría ocasionar el aumento de

energía cuando se utiliza mayor tiempo de ultrasonificación. Esto se estudia en el siguiente capítulo.

**Capítulo II: Efecto de ácidos orgánicos, xilitol y
nanoemulsiones de aceites esenciales sobre el crecimiento de
*Z. bailii***

Los objetivos de este capítulo fueron:

- Evaluar la acción de los ácidos cítrico y málico, del pH, del xilitol y de las nanoemulsiones de aceites esenciales sobre el desarrollo de *Z. bailii* en caldo Sabouraud a fin de detectar efectos sinérgicos.
- Evaluar la existencia de interacciones entre las nanoemulsiones de aceites esenciales que sinergicen la acción antimicrobiana de las mismas.
- Evaluar el efecto de los aceites sobre la pared celular de la levadura.

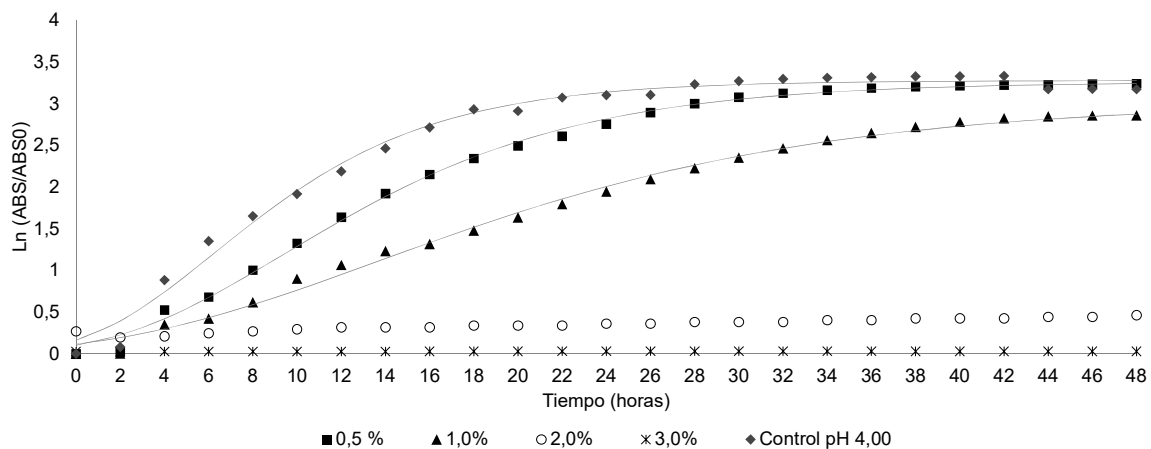
II. Resultados y discusión

II.1 Efecto de los ácidos cítrico y málico sobre el desarrollo de *Z. bailii*

Una manera eficaz para limitar el crecimiento de levaduras es aumentar la acidez del medio, creando así un entorno desfavorable para el desarrollo de estos microorganismos (Doores, 2005). Agregar un acidulante reduce el pH del producto, logrando un efecto microbiostático, pero no microbicida. El éxito en la reducción del número de microorganismos dependerá de la especie de microorganismo, el tipo y la concentración del acidulante, el tiempo de exposición, la capacidad amortiguadora del alimento y cualquier condición preexistente en el alimento que pueda aumentar la inhibición. Los ácidos orgánicos utilizados en este trabajo están presentes naturalmente en las frutas: el ácido cítrico, en cítricos como naranja, mandarina, pomelo, limón y el ácido málico, en manzana. Además, estos ácidos son compatibles con la matriz alimentaria utilizada en este trabajo. En base a ello, se evaluó, en primera instancia, el efecto del descenso del pH a 4,00 y de la naturaleza del ácido para reducirlo, y, en segunda instancia, el efecto de la concentración del ácido orgánico en equilibrio con su forma disociada, sobre el desarrollo de *Z. bailii*.

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de *Z. bailii* por turbidez para los diferentes niveles de ácidos orgánicos. Las mismas se modelaron satisfactoriamente mediante la ecuación de Gompertz modificada obteniéndose valores de R^2_{aj} entre 0,98 y 0,99 y valores de CME alrededor de 0,002. Estos valores indican una buena correlación entre los valores de absorbancia observados y predichos por la ecuación. En la Figura II.1 se muestran los datos experimentales y las curvas modeladas del crecimiento de la levadura en los sistemas conteniendo ácido cítrico y málico.

A



B

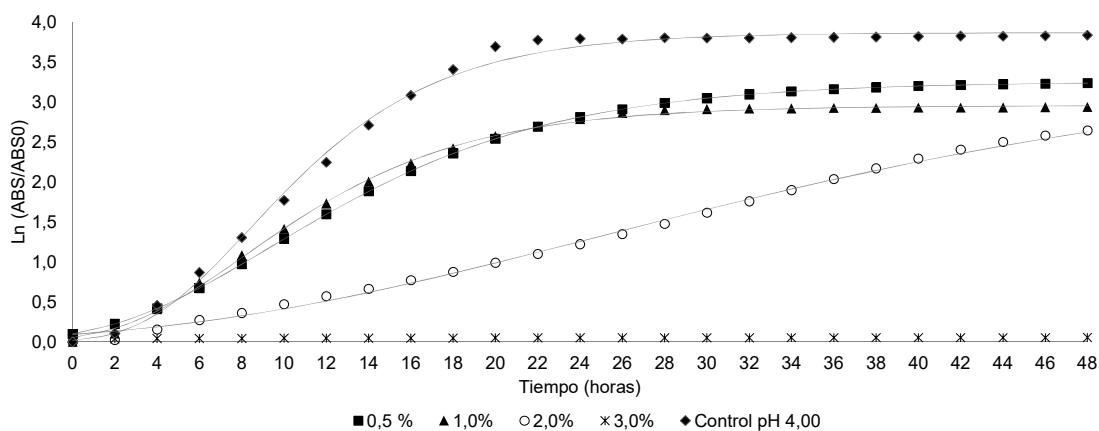


Figura II.1. Curvas de crecimiento de *Z. bailii* a diferentes niveles de ácido cítrico (Panel A) y ácido málico (Panel B). Puntos: datos experimentales. Línea: curvas modeladas por la ecuación de Gompertz modificada.

Dado que la turbidimetría no permite la detección de poblaciones inferiores a 10^6 - 10^7 UFC/ml (Dalgaard y col., 1995), sólo se utilizaron los parámetros μ y A para el análisis de los resultados en todos los casos en los que se aplicó el modelo de Gompertz modificado a los datos de turbidez. En la Tabla II.1 se muestran los valores de los parámetros μ y A obtenidos.

Tabla II.1. Parámetros de crecimiento de *Z. bailii* en caldo Sabouraud en presencia de ácidos orgánicos.

Sistemas		Parámetros	
		μ	A
Controles	Sin ajuste de pH	0,330 \pm 0,019	3,082 \pm 0,493 ^a
	Con pH ajustado a 4,00 con HCl	0,243 \pm 0,025 ^a	3,561 \pm 0,237 ^a
	Con pH ajustado a 4,00 con ácido cítrico	0,214 \pm 0,004 ^a	3,103 \pm 0,221 ^a
	Con pH ajustado a 4,00 con ácido málico	0,221 \pm 0,003 ^a	2,904 \pm 0,021 ^a
Niveles de Ácido Cítrico (%m/m)	0,5	0,234 \pm 0,020 ^a	3,560 \pm 0,250 ^a
	1,0	0,100 \pm 0,040 ^b	3,090 \pm 0,050 ^a
	2,0	MCI	
	3,0	MCF	
	4,0 y 5,0	no creció	
Niveles de Ácido Málico (%m/m)	0,5	0,278 \pm 0,008	3,276 \pm 0,261 ^a
	1,0	0,187 \pm 0,02	2,993 \pm 0,059 ^a
	2,0	0,068 \pm 0,02	3,502 \pm 0,103 ^a
	3,0	MCI	
	4,0	no creció	
	5,0	no creció	

^aPara cada parámetro, los valores señalados con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$). μ : velocidad específica de crecimiento; A: valor asintótico; MCI: mínima concentración inhibitoria, MCF: mínima concentración fungicida.

En el estudio del efecto del descenso del pH a 4,00 por agregado de ácido cítrico o málico sobre el crecimiento de la levadura se utilizó ácido clorhídrico como control y se observó que la reducción del pH disminuyó la μ independientemente del ácido utilizado (Tabla II.1). En cuanto al parámetro A, no se observaron diferencias significativas entre los sistemas estudiados, si bien la velocidad de crecimiento es menor por el descenso del pH, probablemente el tiempo de la fase exponencial sea mayor que el control sin el pH ajustado, y se alcance similar población en la fase estacionaria. Se encuentra ampliamente reportado que el descenso del pH afecta el crecimiento de los microorganismos por producir un desequilibrio ácido-base entre el pH interno, cercano a 7, y el externo, afectando la homeostasis de la célula (Russell y Gould, 1991; Piper y col., 2001). La reducción del pH externo puede producir cambios en la estructura de las macromoléculas de la membrana celular y, de esta manera, cambiar su permeabilidad afectando el transporte de nutrientes o causando liberación de material intracelular (Doores, 2005).

En función de estos resultados, se estudió el efecto de la naturaleza del ácido orgánico sobre el desarrollo de la levadura. Para ello, se elaboraron sistemas con diferentes niveles de ácidos orgánicos y se les ajustó el pH a 4,00 con HCl o NaOH según el sistema para independizarse del pH. En la en la Tabla II.1 se muestran los parámetros de crecimiento de todos los sistemas estudiados y en la Figura II.2, las curvas de crecimiento de la levadura en presencia de 0,5% m/m de los distintos ácidos ensayados. El incremento de la concentración de ambos ácidos redujo de manera creciente la μ hasta alcanzar la MCI. En el caso del AC, se observó una MCI de 2,0% m/m y una MCF del 3,0% m/m y, en el caso del AM, se obtuvo una MCI del 3,0 % m/m y no se alcanzó la MCF a los niveles estudiados. El AC fue más efectivo en la disminución del crecimiento de *Z. bailii* que el AM ya que, para un mismo nivel de ácido, la velocidad de crecimiento en presencia de AC fue menor que con AM.

Con respecto a los valores asintóticos del crecimiento de *Z. bailii*, en general no se modificaron por el efecto de los ácidos.

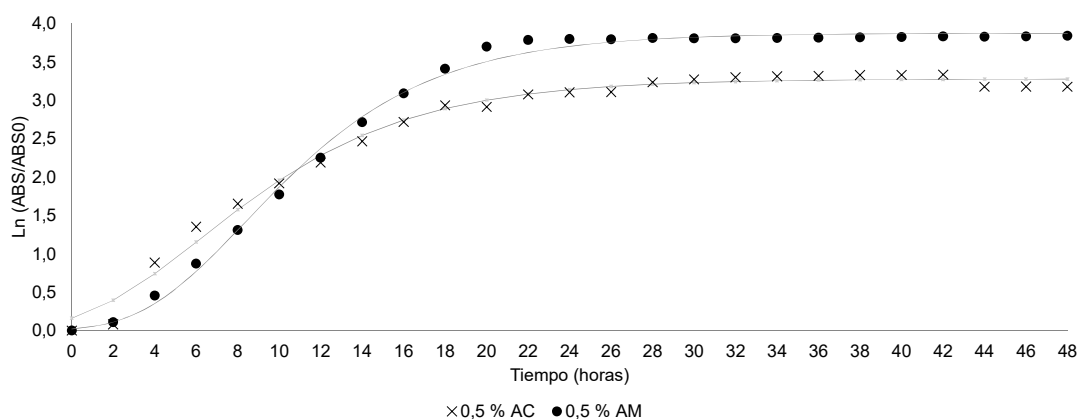


Figura II.2. Comparación del crecimiento de *Z. bailii* en presencia de 0,5% m/m de los ácidos cítrico y málico.

Estos resultados muestran, por un lado, que el AC fue más efectivo que el AM, y que, si bien está reportado en bibliografía que la acción antimicrobiana de los ácidos orgánicos se atribuye a la especie no disociada, el nivel de la especie disociada también influyó. Según los valores de pKa de los AC y AM (Tabla II.2), a pH 4,00, la concentración del primer anión está en mayor proporción que la del ácido sin disociar.

Una mayor efectividad del AC respecto al AM también fue encontrada por Rajashekhara y col. (1998), quienes, al estudiar la inactivación térmica de ascoesporas de *Neosartorya fischeri* en jugos de uva y mango a pH 3,50, en presencia de varios

ácidos, encontraron que el uso de ácido cítrico era el que permitía la mayor inhibición. Observaron 3 reducciones logarítmicas de la población de ascosporas en el jugo de mango a los 89,19 y 130,60 min en presencia de AC y AM, respectivamente. Varios investigadores han estudiado la tolerancia térmica de los hongos resistentes al calor en soluciones de ácidos orgánicos y en jugos de frutas. Las variaciones en los niveles de la forma no disociada de los ácidos orgánicos a pH 3,5 podrían haber contribuido en parte a las diferencias en las tasas de muerte térmica de *N. fischeri*. Sin embargo, King y Whitehand (1990) no encontraron diferencias entre los ácidos cítrico, tartárico, málico y láctico en la resistencia térmica de *Talaromyces flavus*. La menor efectividad del ácido málico podría vincularse con la capacidad que tienen algunas levaduras, entre ellas *Z. bailii*, de metabolizar L-malato (Saayman y Viljoen-Bloom, 2006; Casal y col., 2008).

El pH es un factor importante que afecta la actividad de los ácidos orgánicos y a valores de pH superiores al valor de pKa (pH al que se produce la ionización al 50%), la actividad antimicrobiana disminuye rápidamente (Sofos y col., 1986). Aunque inicialmente se creía que el ácido no disociado era totalmente responsable del efecto antimicrobiano, se conoce que también debe considerarse el comportamiento de un ácido dentro de la célula microbiana. En un rango de pH externo de 5,50 a 9,00, el pH del citoplasma está estrictamente regulado, de modo que las moléculas de un ácido orgánico se disociarán casi por completo de manera similar a una solución acuosa. Por lo tanto, se considera que tanto el protón como el anión contribuyen a los efectos.

Tabla II.2. Valores de pKa de los ácidos orgánicos (Doores, 2005).

Ácido	pKa1	pKa2	pKa3
Cítrico	3,14	4,77	6,39
Málico	3,40	5,11	---

II.2. Efecto del xilitol y del pH, ajustado con ácido cítrico o málico, sobre el desarrollo de *Z. bailii*

Las curvas de crecimiento se modelaron satisfactoriamente con el modelo propuesto obteniéndose valores de R^2_{aj} de entre 0,98 y 0,99 y valores de CME menores que 0,007.

En las Figura II.3 se muestran los parámetros de crecimiento de *Z. bailii* en función del contenido de xilitol y del pH ajustado con AC o AM. En ausencia o en

presencia de 10,0% m/m de xilitol, la reducción del pH disminuyó la velocidad de crecimiento independientemente del valor de pH y del ácido utilizado. En presencia de 20,0% m/m de xilitol sólo se observó una disminución significativa de la velocidad cuando se redujo el pH a 3,50 ya sea por agregado de AC o de AM. Estos resultados muestran que, independientemente de la presencia de xilitol, la naturaleza del ácido no tuvo efecto sobre la velocidad de crecimiento de *Z. bailii*.

En general, el agregado de xilitol disminuyó la velocidad de crecimiento de la levadura, obteniéndose las menores velocidades a pH 3,50 en presencia de 20,0% m/m de xilitol independientemente del ácido. Con respecto a la población de la fase estacionaria, en ausencia de xilitol, se observó que disminuyó debido al descenso del pH de manera independiente del valor del mismo y del tipo de acidulante, mientras que, en presencia de xilitol, en general, no se afectó significativamente por el descenso del pH o por la naturaleza del ácido. Por otra parte, al aumentar la concentración de xilitol en ausencia de ácidos, el parámetro A disminuyó significativamente mientras que aumentó ligeramente en presencia de AC, a ambos valores de pH, y de AM a pH 4,00. Estos resultados indican que la velocidad de crecimiento fue más sensible que el valor asintótico frente a las variables estudiadas.

El efecto antimicrobiano observado debido a la presencia de xilitol podría estar relacionado con el descenso de la a_w . Según lo reportado en bibliografía, la disminución de la a_w produce cambios en la permeabilidad celular y la acumulación intracelular de polioles, afectando la síntesis o la actividad enzimática. Los polioles son solutos compatibles, es decir, se sintetizan en el interior de las células aumentando la resistencia de la levadura frente al descenso de la a_w (Lenovich y col., 1988). Un balance entre estos sucesos se refleja en el comportamiento de la célula frente al descenso de la a_w . La síntesis de los solutos compatibles consume parte de la energía que la levadura utiliza para desarrollarse. Este hecho estaría reflejado en el descenso de la velocidad de crecimiento observado en presencia de xilitol. Sin embargo, la adaptación de la célula mediante la síntesis de solutos compatibles durante la fase de crecimiento incrementaría su resistencia dando como resultado el ligero aumento de la máxima población alcanzada. Por otra parte, este comportamiento parece depender del pH y del nivel y naturaleza del poliol utilizado, ya que en estudios previos se observó que el xilitol presentó un ligero efecto inhibitorio sobre *Z. bailii* a un nivel del 11,00% m/m del poliol y a pH 3,00 ajustado con AC, mientras que la presencia de manitol o sorbitol no afectó el crecimiento de la levadura (Gliemmo y col., 2006).

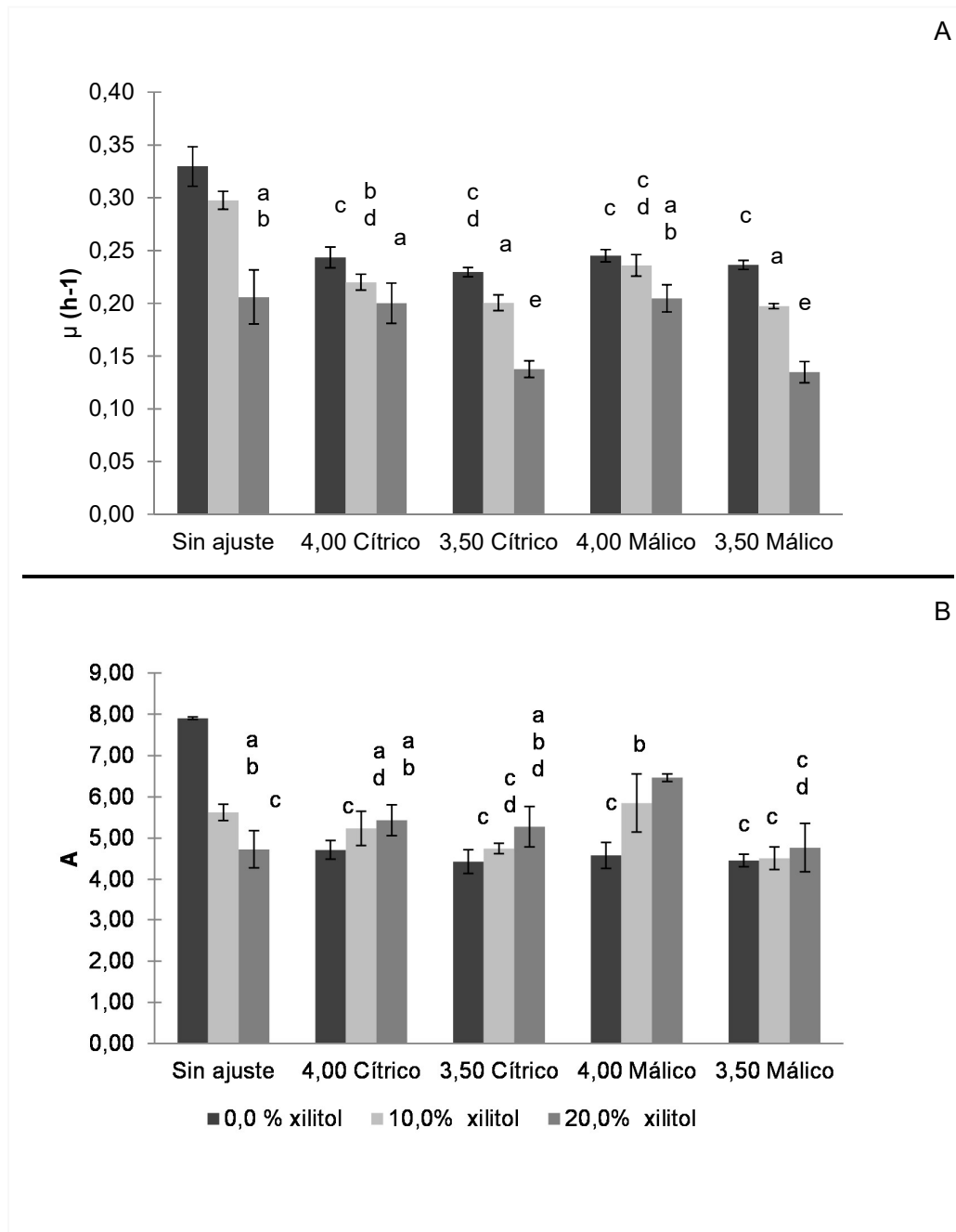


Figura II.3. Velocidad específica de crecimiento de *Z. bailii* (μ) (Panel A) y valor asintótico (A) (Panel B) en función del contenido de xilitol y del pH. Las columnas seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de los promedios.

Por otra parte, cabe destacar que, de manera informal, personal del laboratorio indicó la preferencia de las muestras estudiadas en esta sección. Se observó que

prefirieron las muestras a pH 4,0 con respecto a las de pH 3,5 para ambos niveles de xilitol e indicaron que el dulzor aportado por el xilitol no era suficiente para compensar el descenso de acidez producida por la reducción del pH a 3,50 (datos no mostrados). Teniendo en cuenta estos resultados y considerando que el ácido cítrico mostró mayor efectividad que el ácido málico frente a *Z. bailii* y que la presencia de xilitol redujo ligeramente su crecimiento, se decidieron utilizar, como barreras para estudiar la estabilidad microbiológica del jugo de yacón, el ajuste del pH a 4,00 con ácido cítrico como acidulante y un nivel de 20,0% m/m de xilitol. Este último, además de actuar como depresor de la a_w , cumple la función de endulzar el sistema.

II.3. Efecto de las nanoemulsiones de aceites esenciales sobre el desarrollo de *Z. bailii* en caldo Sabouraud

II.3.1. Evaluación del efecto de la metodología de emulsificación sobre la acción de las nanoemulsiones de los aceites esenciales frente al crecimiento de *Z. bailii*

II.3.1.1 Mínimas concentraciones inhibitorias de las nanoemulsiones de aceites esenciales

Se determinaron las MCIs de las nanoemulsiones US-5 y US-25 de los aceites de CC, LG, M y CH y de la nanoemulsión UT de CH. Los valores de MCIs obtenidos para cada aceite fueron independientes del tiempo de ultrasonificación y, para el caso de CH, del equipo utilizado para elaborarlas. Estos resultados se muestran en la Tabla II.3.

El aceite esencial de CC fue el más efectivo en inhibir el crecimiento de *Z. bailii*, ya que mostró los valores MCI más bajos, seguidos, en orden decreciente, por LG, M y CH.

Tabla II.3. Mínimas concentraciones inhibitorias (MCIs) de las nanoemulsiones US-5 y US-25 para lemongrass, corteza de canela y menta y de las nanoemulsiones UT y US-25 para hojas de canela.

Nanoemulsión	MCI (ppm)
Corteza de canela	156,3
Lemongrass	468,8
Menta	937,5
Hojas de canela	1250,0

Cabe destacar que el Tween®80 no presentó inhibición del crecimiento en la concentración más alta utilizada en este trabajo (datos no mostrados).

Estos aceites son eficaces para inhibir el crecimiento de levaduras y bacterias. La sensibilidad a la acción de los aceites esenciales depende de varios factores, tales como los géneros de levaduras y entre levaduras y bacterias, el solvente en el cual se vehiculiza el aceite esencial, el nivel de la población inicial (Conner y Beuchat, 1984; Hili y col., 1997; Ribes y col., 2017). Hili y col. (1997), utilizando como vehículo dimetilsulfóxido, demostraron que fue necesario un nivel de aceite de CH de 10 ppm para inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae*, mientras que 400 ppm de CH fue la MCI de *Trulopsisutilis* y *Schizosaccharomyces pombe* en caldo de extracto de malta. Ribes y col. (2017) observaron valores de MCI de una nanoemulsión de CC de 40 ppm y 50 ppm para *Z. bailii* en agar dextrosa de papa para poblaciones iniciales de 10^3 y 10^6 células/ml, respectivamente. Un nivel de 5000 ppm de CC disuelto en etanol fue la MCI para el crecimiento de *Z. bailii* en agar de extracto de levadura peptona - dextrosa reportado por Monu y col. (2016). Si bien estos resultados muestran la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, los medios utilizados no tenían el pH ajustado, como es el caso de los sistemas de este trabajo. Al respecto, Gliemmo y col. (2015) estudiaron la efectividad del aceite esencial de CC frente al crecimiento de *Z. bailii* y *Z. rouxii* en caldo Sabouraud a pH 3,50 con el agregado de agar bacteriológico al 0,15%. Observaron valores de MCI de 112 ppm y de 28 ppm de CC frente al crecimiento de *Z. bailii* y *Z. rouxii*, respectivamente. Estos valores están en concordancia con los observados en este trabajo.

En relación con LG, se informó una MCI de 1130 ppm frente a *Z. bailii* a través del método de dilución en caldo mediante la mezcla directa del aceite con Tween®80 (Tyagi y col., 2014). Podría esperarse que cuando disminuye el tamaño de gota, aumente la superficie de contacto del aceite con el medio acuoso, haciendo que la

concentración efectiva sea menor, aunque esto depende de la naturaleza del aceite esencial y del compuesto que se utilice como emulsionante. En algunos casos, la formulación de la nanoemulsión puede causar una reducción en la inactivación microbiana respecto de los AE libres debido a la interacción de la macromolécula emulsionante con el AE (Donsi y Ferrari, 2015). Por ejemplo, las nanoemulsiones de aceite de menta estabilizadas con almidón modificado (Liang y col., 2012) o nanoemulsiones de eugenol con proteína de suero y maltodextrina (Shah y col., 2013) exhibieron una actividad antimicrobiana más baja que los compuestos no encapsulados. Sin embargo, en otros casos, el uso de macromoléculas contribuyó a potenciar la actividad antimicrobiana, como en el caso del aceite de tomillo emulsionado con caseinato de sodio o el aceite de lemongrass emulsionado con una combinación de Tween®80 y alginato de sodio (Salvia Trujillo y col., 2014; Xue y col., 2015). La aparente contradicción en las diferentes observaciones experimentales enumeradas se puede explicar en base a los diferentes mecanismos de interacción de los AE con las membranas celulares cuando se utilizan nanoemulsiones como sistemas de liberación. Para poder comparar los resultados de este trabajo con los reportados en bibliografía, sería necesario realizar pruebas en las mismas condiciones de elaboración y de emulsionante.

Los valores de MCI más bajos de las nanoemulsiones de LG y CC en comparación con las de CH y M permitirían minimizar el impacto sensorial negativo de los aceites cuando se agregan a los alimentos sin afectar su acción antimicrobiana.

Para continuar con los ensayos, de los aceites esenciales estudiados, se seleccionaron las nanoemulsiones de LG y CC por ser las más efectivas, y las nanoemulsiones de CH debido a que pueden elaborarse tanto con el homogeneizador de alta velocidad como con el ultrasonido. A pesar de que fueron menos efectivas que la de M, esto último permitirá estudiar el efecto de las metodologías de emulsificación sobre la actividad antimicrobiana.

II.3.1.2 Parámetros de crecimiento de *Z. bailii* en presencia de distintos niveles de las nanoemulsiones de hojas de canela, de corteza de canela y de lemongrass

Como se comentó en la sección anterior, el efecto de la metodología de emulsificación sobre la acción de las nanoemulsiones de los aceites esenciales frente al crecimiento de *Z. bailii* no se observó en los valores de MCIs obtenidos. Por ello, para

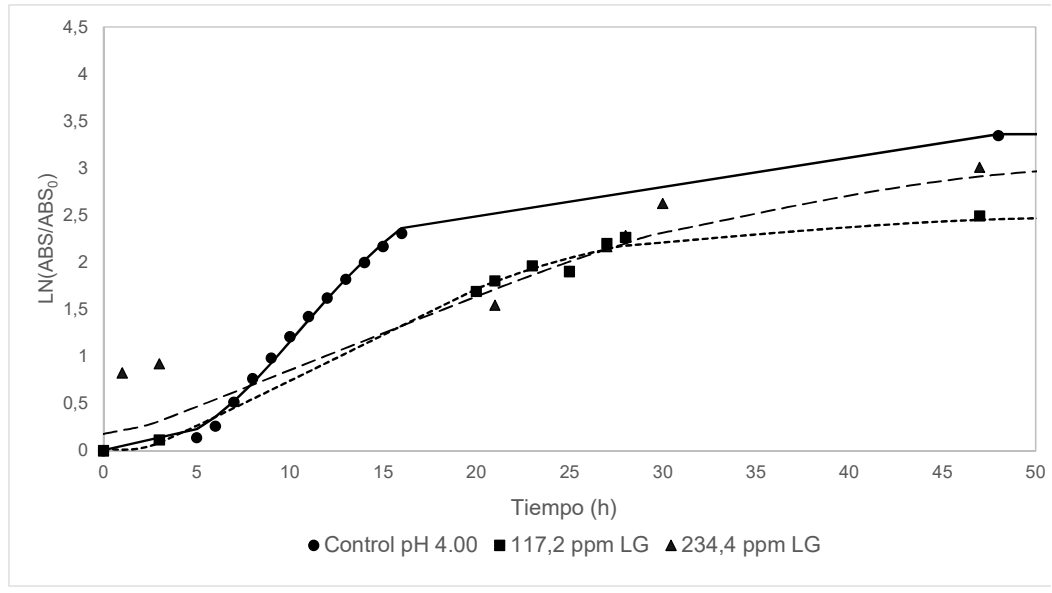
profundizar en este estudio, se siguió la evolución en el tiempo del crecimiento de la levadura en presencia de las nanoemulsiones seleccionadas.

Las curvas de crecimiento se ajustaron satisfactoriamente con la ecuación de Gompertz modificada. Los valores de CME estuvieron dentro del rango de 0,005 y 0,159 y los valores de R_{2aj} en entre 0,98 y 0,99, lo que indica una buena correlación entre los valores observados y los valores pronosticados de las respuestas. En la Figura II.4 se muestran los datos experimentales y las curvas modeladas del sistema control (caldo Sabouraud a pH 4,00) y de los sistemas con distintos niveles de las nanoemulsiones US-5 de CC (Panel A) y de LG (Panel B).

Los parámetros de crecimiento de *Z. bailii* se muestran en la Tabla II.4. Los niveles analizados corresponden a 1/2 y 1/4 de las MCI de cada nanoemulsión. Las velocidades de crecimiento disminuyeron por la adición de las nanoemulsiones y, en la mayoría de los casos, con el aumento de la concentración de aceite esencial. Los valores asintóticos, en general, disminuyeron por la presencia de nanoemulsiones, con algunas excepciones en las que no cambiaron, lo que indica que en estos últimos el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria fue mayor.

Cabe destacar que la metodología de elaboración afectó la actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones (Tabla II.4). El incremento del tiempo de sonicación de 5,0 a 25,0 minutos aumentó la velocidad de crecimiento de la levadura a todos los niveles ensayados y, en general, no afectó la población máxima alcanzada. Por otra parte, la ultrasonificación de la nanoemulsión UT de CH (UT vs US-25) produjo el aumento de la velocidad de crecimiento y del valor asintótico del sistema conteniendo 312,5 ppm indicando que el proceso de ultrasonificación redujo la actividad antimicrobiana. Sin embargo, este efecto no se observó en presencia de 625,0 ppm de CH. Algunos autores han reportado que la actividad antimicrobiana de nanoemulsiones de aceites esenciales está fuertemente influenciada por el método utilizado para reducir las gotas de la emulsión. El ultrasonido es una tecnología muy eficiente para reducir el tamaño de gota, pero comprometería la acción fungicida, esto podría ser causado por el alto estrés aplicado durante el tratamiento y su calentamiento durante el proceso de homogeneización, lo que promovería la degradación de compuestos activos (Donsi y col., 2011; Ribes y col., 2017).

A



B

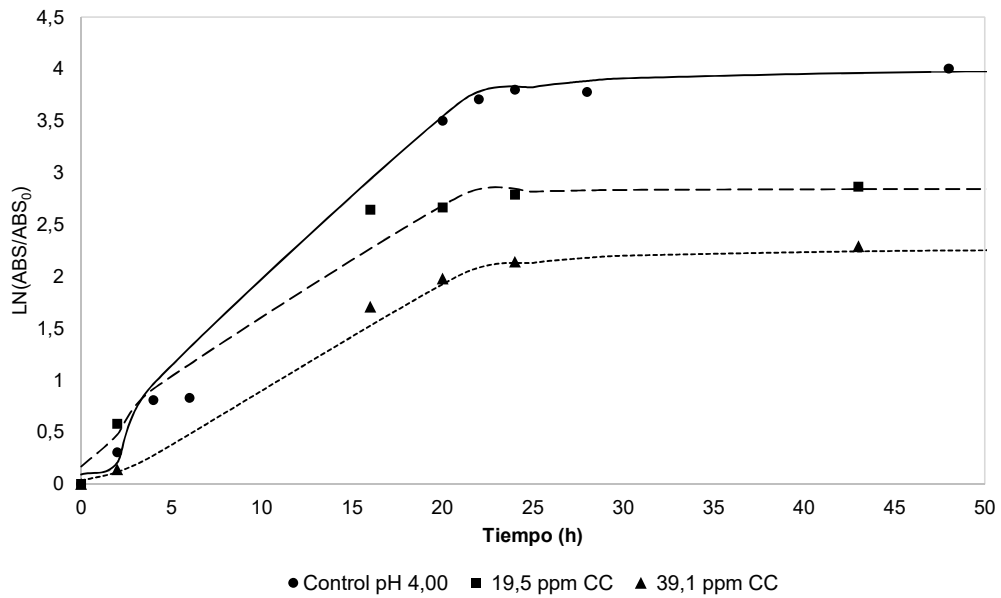


Figura II.4. Curvas de crecimiento de *Z. bailii* en presencia de diferentes niveles de las nanoemulsiones US-5 de lemongrass (LG, Panel A) y de corteza de canela (CC, Panel B).

Para verificar estos resultados se decidió evaluar el efecto de la metodología de elaboración sobre la población de la levadura en el tiempo, lo cual se discute en la siguiente sección.

Tabla II.4. Parámetros de crecimiento de *Z. bailii*: velocidad de crecimiento (μ) y valor asintótico (A) para distintos niveles de las nanoemulsiones de lemongrass, corteza de canela y hojas de canela, elaboradas con el homogeneizador de alta velocidad (UT) y/o ultrasonificadas 5,0 ó 25,0 minutos (US-5 y US-25, respectivamente).

Composición (ppm)				Parámetros de crecimiento	
LG	CC	CH	Tratamiento	μ (h^{-1})	A
0	0	0	pH = 4,00	0,225 \pm 0,015 ^a	3,398 \pm 0,294 ^a
117,2	0	0	US-5	0,125 \pm 0,010	2,874 \pm 0,319 ^b
117,2	0	0	US-25	0,148 \pm 0,004 ^b	2,875 \pm 0,076 ^b
234,4	0	0	US-5	0,092 \pm 0,009	3,373 \pm 0,250 ^a
234,4	0	0	US-25	0,153 \pm 0,017 ^b	3,073 \pm 0,394 ^b
0	39,1	0	US-5	0,142 \pm 0,016 ^c	2,662 \pm 0,356 ^c
0	39,1	0	US-25	0,167 \pm 0,025 ^d	2,919 \pm 0,310 ^c
0	78,1	0	US-5	0,053 \pm 0,012	2,992 \pm 0,376 ^c
0	78,1	0	US-25	0,103 \pm 0,006	2,972 \pm 0,310 ^c
0	0	312,5	UT	0,131 \pm 0,005	2,399 \pm 0,091 ^d
0	0	312,5	US-25	0,217 \pm 0,013 ^a	3,168 \pm 0,258 ^a
0	0	625,0	UT	0,096 \pm 0,004 ^e	2,582 \pm 0,102 ^d
0	0	625,0	US-25	0,101 \pm 0,005 ^e	2,427 \pm 0,145 ^d
117,2	19,5	0	US-5	0,068 \pm 0,017	2,596 \pm 0,419
117,2	39,1	0	US-5	0,075 \pm 0,010	3,749 \pm 0,290

II.3.1.3 Recuento de células viables de *Z. bailii* en presencia de distintos niveles de las nanoemulsiones de hojas de canela, de corteza de canela y de lemongrass

En la Figura II.5 se muestran los recuentos de la levadura en presencia de diferentes niveles de las nanonemulsiones de LG, CC y CH a distintos tiempos de almacenamiento. Al igual que con los parámetros de crecimiento, se observó un ligero efecto de la metodología de elaboración de las nanoemulsiones sobre la población de la levadura para cada nivel de aceite. La población de los sistemas US-25 fue mayor que el resto de los sistemas a lo largo de la incubación. Los aumentos en la población fueron de hasta 0,8 log y se observaron las mayores diferencias para las nanoemulsiones de LG (Figura II.5, Panel A). Estos resultados indicarían que la ultrasonificación podría haber afectado la composición química del aceite esencial y, como consecuencia, disminuir su actividad antimicrobiana.

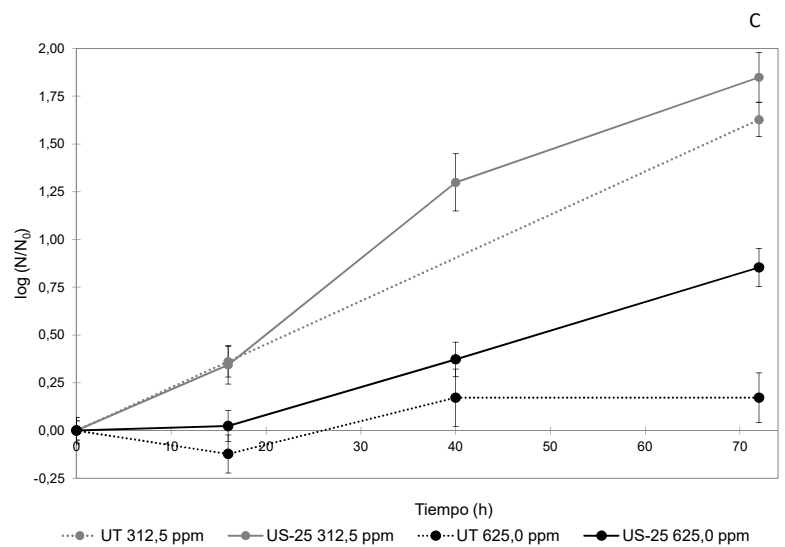
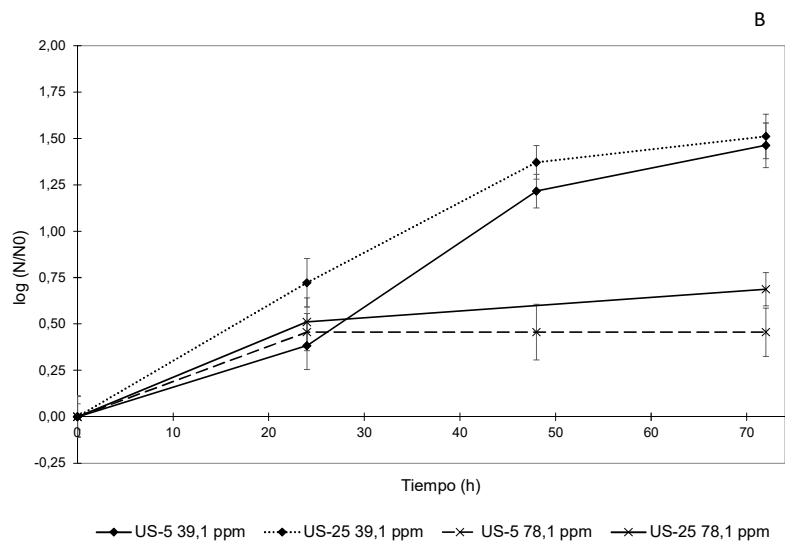
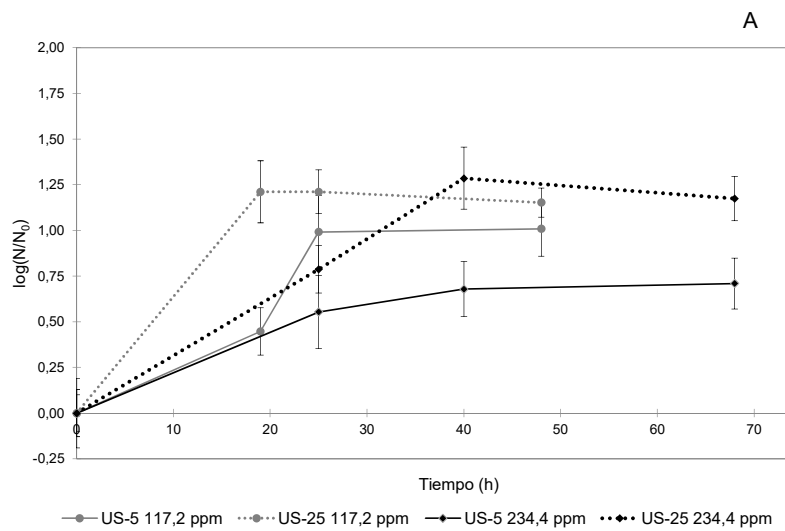


Figura II.5 Efecto de diferentes niveles de nanoemulsiones de aceites esenciales de lemongrass (Panel A), de corteza de canela (Panel B) y de hojas de canela (Panel C) sobre el crecimiento de *Z. baillii*.

Otros autores también informaron sobre la reducción de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales mediante procesos de emulsificación de alta energía. Ribes y col. (2017) observaron la disminución del 40% de trans-cinamaldehído en CC mediante la elaboración de una emulsión gruesa con un homogeneizador de alta velocidad. Esta pérdida se hizo mayor cuando la emulsión gruesa se sometió a homogeneización a alta presión. Donsi y col. (2011) observaron la degradación de carvacrol y otros compuestos activos de una mezcla de terpenos durante el procesamiento a alta velocidad seguido por la homogeneización a alta presión. Salvia-Trujillo y col. (2014) concluyeron que, a pesar de ser una tecnología factible para reducir el tamaño de gota de la emulsión hasta escala nanométrica, el procesamiento con ultrasonido disminuye la actividad antimicrobiana de nanoemulsiones de lemongrass frente a *E. coli*, con una pérdida completa de las propiedades antimicrobianas de esas nanoemulsiones al aumentar la amplitud y el tiempo de sonicación. Sin embargo, aplicando otra metodología, como la microfluidización se pueden formar nanoemulsiones con mayor acción bactericida en comparación con la emulsión de mayor tamaño de gota. De todas maneras, la efectividad depende del aceite esencial ensayado, siendo el lemongrass y el clavo de olor los aceites que mostraron actividad antimicrobiana (Salvia-Trujillo y col., 2014).

Los resultados obtenidos hasta ahora mostraron que el aumento del tiempo de ultrasonicación no tuvo efecto en el tamaño de las gotas, en la estabilidad de la nanoemulsión y en la MCI de las nanoemulsiones. Sin embargo, se observó una leve disminución en la eficacia antimicrobiana de las nanoemulsiones debido a la aplicación del proceso de ultrasonido y al incremento del tiempo de ultrasonicación. Además, cabe destacar que el aumento del tiempo de ultrasonicación conlleva mayor consumo de energía en el proceso de elaboración de las nanoemulsiones. Por otro lado, las nanoemulsiones de LG y CC mostraron los valores más bajos de MCI. Por lo tanto, se seleccionaron las nanoemulsiones US-5 de LG y CC para estudiar la existencia de interacción entre ellas sobre el crecimiento de *Z. bailii*.

II.3.2. Evaluación de la interacción entre las nanoemulsiones de lemongrass y de corteza de canela sobre el desarrollo de *Z. bailii*

Los niveles analizados de nanoemulsiones fueron de 1/8 a dos veces los valores de las MCIs (Tabla II.3). Luego de 48 h de incubación, las mínimas concentraciones a

las cuales no se observó crecimiento cuando se utilizaron las nanoemulsiones combinadas fueron 234,4 ppm para LG y 78,1 ppm para CC. Estos valores dieron un índice CFI = 1, indicando que los aceites actuaron de manera aditiva en la inhibición del crecimiento de la levadura.

Mediante la construcción de un isoblograma, se puede observar cuáles combinaciones de concentraciones de antimicrobianos, en este caso de AE, producen un determinado efecto cuando se aplican en forma conjunta. En este caso, se observó un efecto aditivo de la combinación de las nanoemulsiones de aceites estudiada, según se muestra en la Figura II.6 (Panel A). Al ser un efecto aditivo, es decir, que el efecto combinado de ambos es igual a la suma de los efectos individuales, si las nanoemulsiones se utilizaran en combinación, se lograría, de esta manera, reducir al medio la concentración de cada una respecto a utilizarlas individualmente. La reducción de la concentración de un aceite a utilizar para asegurar la estabilidad microbiana de un sistema podría ser un aporte positivo en la reducción del impacto sensorial negativo que podría ocasionar la presencia de aceites esenciales.

Con respecto a las curvas de crecimiento, sólo las combinaciones de 117,2 ppm de LG sólo o en presencia de 19,5 ó 39,1 ppm de CC se ajustaron satisfactoriamente con la ecuación de Gompertz modificada, con CME dentro del rango de 0,007-0,138. En la Figura II.7 y en la Tabla II.4 se muestran las velocidades de crecimiento y los valores asintóticos para los sistemas modelados. El ANOVA mostró una interacción significativa entre ambos aceites ($p = 0,0001$) y solo el efecto de CC fue significativo para el valor asintótico ($p = 0,0101$). En ausencia de LG, la adición de 19,5 ppm de CC no afectó la μ , mientras que 39,1 ppm CC la disminuyó significativamente (Fig. II.7, Panel A). En presencia de LG, la adición de CC produjo una reducción significativa de μ . Estos resultados están de acuerdo con la CFI obtenida. Los valores asintóticos no cambiaron significativamente con la adición de 19,5 ppm de CC ó de 117,2 ppm de LG pero, en presencia de 39,1 ppm de CC, la adición de 117,2 ppm de LG mostró un valor asintótico similar al del control sin aceite (Fig. II.7, Panel B).

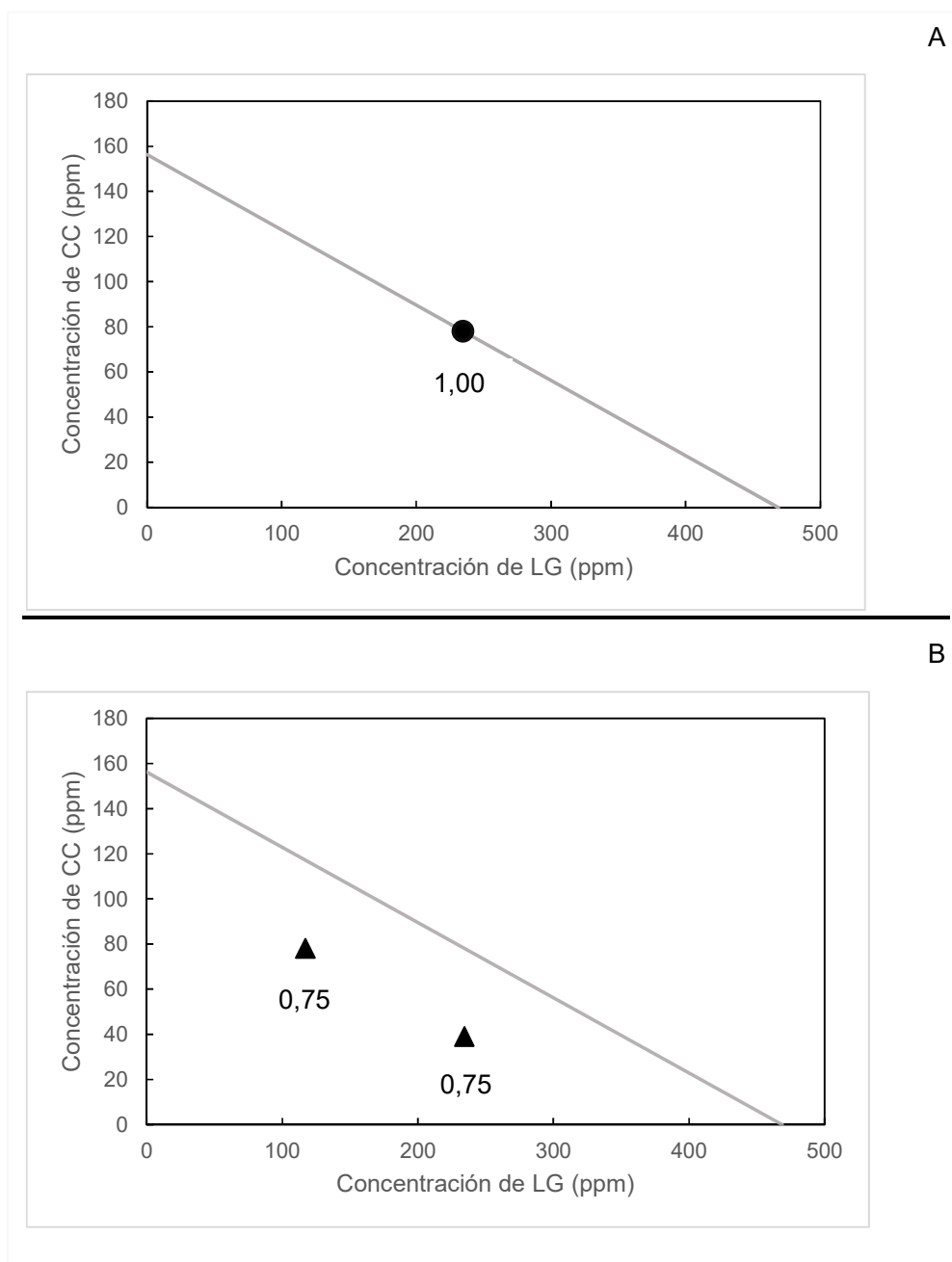


Figura II.6 Isobogramas de las mínimas concentraciones inhibitorias de aceite esencial de corteza de canela (CC) y de lemongrass (LG) frente a *Z. bailii* en ausencia de xilitol (Panel A) y en presencia de xilitol (Panel B). Los números cercanos a los puntos experimentales representan las CFI.

No se dispone de información sobre el efecto del uso combinado de nanoemulsiones de LG y CC en el crecimiento de levaduras en medios acuosos. Sin embargo, varios trabajos informan el efecto de la presencia combinada de aceites esenciales en el crecimiento de microorganismos. Gliemmo y col. (2015) informaron interacciones sinérgicas y aditivas entre los aceites esenciales de corteza de canela y de clavo de olor en el crecimiento de *Z. bailii* y *Z. rouxii*, respectivamente. Las interacciones entre aceites esenciales dependen de la concentración del aceite y del microorganismo objetivo (Goñi y col., 2009; Matan y col., 2006). Loeffler y col. (2014) observaron que nanoemulsiones de cinamaldehído en combinación con citral inhiben el crecimiento de *Z. bailii* en caldo y en jugo de manzana. Como se verá más adelante, estos son los componentes principales de CC y LG, respectivamente.

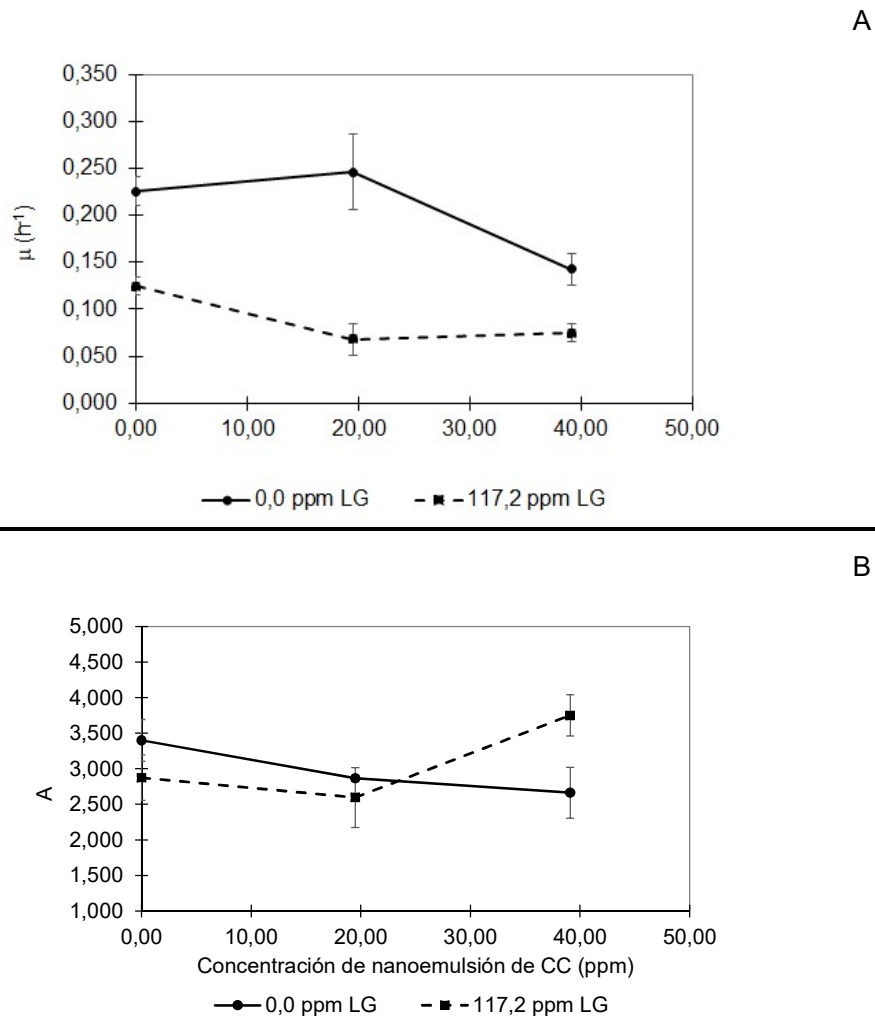


Figura II.7. Velocidad de crecimiento (μ , Panel A) y valor asintótico (A, Panel B) de *Z. bailii* a diferentes concentraciones de nanoemulsiones de lemongrass y corteza de canela en ausencia de xilitol. Las barras de error representan la desviación estándar de los parámetros.

II.3.3 Determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias, de los parámetros de crecimiento y de la interacción entre las nanoemulsiones de lemongrass y de canela corteza sobre el desarrollo de *Z. bailii* en presencia de xilitol

Las MCIs de las nanoemulsiones de ambos aceites no se vieron afectadas por el agregado de 20,0% m/m de xilitol, obteniéndose los mismos valores que se observaron en ausencia de xilitol, los cuales fueron 468,8 y 156,3 ppm para LG y CC, respectivamente (Tabla II.5). Estos resultados indican que el descenso de la actividad de agua a 0,975 por el agregado de xilitol, si bien redujo la velocidad de crecimiento (μ) de *Z. bailii* en caldo Sabouraud ajustado a pH 4,00 con AC (Sección II.2), esta disminución no se reflejó en los valores de las MCIs de los aceites necesarias para inhibir el crecimiento. Este hecho probablemente se deba a que la adaptación de la célula al descenso de la a_w (síntesis de solutos compatibles) durante la fase de crecimiento exponencial, incrementaría su resistencia resultando en el ligero aumento de la población de la fase estacionaria observado y, como consecuencia, necesitándose la misma MCI del aceite esencial que en ausencia de xilitol.

Las curvas de crecimiento de la levadura en presencia de diferentes diluciones de las nanoemulsiones de LG y CC, solas o combinadas, se ajustaron satisfactoriamente con la ecuación de Gompertz modificada, obteniéndose valores de R^2_{aj} entre 0,98 y 0,99 y valores de CME alrededor de 0,002, lo que indica una buena correlación entre los valores observados y los valores pronosticados de las respuestas.

Los parámetros de crecimiento de la levadura para distintos niveles de nanoemulsiones de LG y CC cuando se utilizaron por separado se muestran en la Tabla II.5. Se observó que las μ disminuyeron al aumentar el nivel de aceite, siendo el aceite de CC el más efectivo, ya que mostró menor μ que el de LG para un mismo nivel (39,1 y 78,1 ppm).

Tabla II. 5. Valores de velocidad específica de crecimiento (μ) y de la turbidez máxima alcanzada (A) de *Z. bailii* para distintos niveles de nanoemulsiones US-5 en función de la concentración de xilitol.

Aceite Esencial	Concentración de xilitol (% m/m)	Concentración de aceite esencial (ppm)	μ (h^{-1})	A	
Control*	0,0	0	$0,244 \pm 0,010$	$4,715 \pm 0,228$	
	20,0	0	$0,200 \pm 0,019$	$5,434 \pm 0,372$	
Lemongrass	0,0	117,2	$0,125 \pm 0,010^a$	$2,874 \pm 0,294$	
		234,4	$0,092 \pm 0,009^b$	$3,373 \pm 0,250$	
		468,8	Mínima Concentración Inhibitoria		
	20,0	39,1	$0,226 \pm 0,021^c$	$3,746 \pm 0,203^a$	
		78,1	$0,196 \pm 0,016^c$	$3,770 \pm 0,353^a$	
		117,2	$0,147 \pm 0,017^a$	$3,712 \pm 0,172^a$	
		234,4	$0,081 \pm 0,013^b$	$5,130 \pm 0,924^b$	
		468,8	Mínima Concentración Inhibitoria		
	Corteza de canela	0,0	0,0	$0,142 \pm 0,016^a$	$2,662 \pm 0,356$
			78,1	$0,053 \pm 0,012^b$	$2,992 \pm 0,250$
156,3			Mínima Concentración Inhibitoria		
20,0		14,6	$0,234 \pm 0,028^c$	$3,721 \pm 0,239^a$	
		29,3	$0,208 \pm 0,008^c$	$3,756 \pm 0,547^a$	
		39,1	$0,138 \pm 0,015^a$	$3,640 \pm 0,075^a$	
		78,1	$0,085 \pm 0,008^b$	$4,176 \pm 0,667^a$	
		156,3	Mínima Concentración Inhibitoria		

*Caldo Sabouraud a pH 4,00.

El uso conjunto de las nanoemulsiones de los aceites esenciales dio como resultado las CFI que se muestran en la Tabla II.6. Si bien los valores obtenidos de MCIs para ambos aceites esenciales fueron independientes de la presencia de xilitol, el agregado de 20,0% de xilitol contribuyó a potenciar la actividad de los AE combinados al observarse dos interacciones sinérgicas que no habían sido encontradas en ausencia de xilitol. Las interacciones sinérgicas para la mezcla corresponden a 1/2 MCI de LG y 1/4 de MCI de CC y 1/4 MCI de LG y 1/2 de MCI de CC. Estos resultados indican que aún a niveles más bajos de MCIs de los AE, la combinación de los mismos es efectiva para afectar el desarrollo de la levadura. El efecto sinérgico para dos combinaciones con distintos niveles de aceite en presencia de xilitol, podría ser beneficioso para lograr una formulación con menores niveles de MCIs de aceites esenciales y mejorar, de esta manera, las características sensoriales de la formulación final.

Se observó un efecto sinérgico de la combinación de las nanoemulsiones de aceites estudiada, según se muestra en la Figura II.6 (Panel B). Al ser un efecto sinérgico, el efecto combinado de ambos es mayor que los efectos individuales de las nanoemulsiones de los AE, quiere decir que si las nanoemulsiones se utilizaran en combinación, se lograría, de esta manera, reducir la concentración de cada una respecto a utilizarlas individualmente.

Tabla II.6. Concentraciones fraccionarias inhibitorias de las nanoemulsiones de lemongrass (LG) y de corteza de canela (CC) en caldo Sabouraud a pH 4,00 en ausencia y en presencia de xilitol.

Concentración de xilitol (%m/m)	LG (ppm)	CC (ppm)	CFI	Efecto
0,0	234,4	78,1	1,00	Aditivo
20,0	234,4	39,1	0,75	Sinérgico
	117,2	78,1	0,75	Sinérgico

En la Figura II.8 se muestran los parámetros de crecimiento de *Z. bailii* para distintas combinaciones de nanoemulsiones de LG y CC en presencia de xilitol. A partir de un nivel de 78,1 ppm de LG, la velocidad de crecimiento (μ) se reduce significativamente por el agregado de 13,0 ppm de CC o concentraciones mayores (Figura II.8, Panel A). La menor velocidad de crecimiento (μ) se obtuvo al combinar 117,2 ppm de LG con 26,0 ppm de CC. Estos resultados muestran la interacción entre ambos aceites observada cuando se determinaron las CFI. Con respecto al valor asintótico, en general, no se observaron diferencias significativas entre los valores de A (Figura II.8, Panel B).

Algunos autores estudiaron el sinergismo antifúngico entre los componentes individuales de un aceite esencial. Braga y col. (2007) testearon la actividad del eugenol y del timol, componentes principales de los AE de clavo de olor y de tomillo, respectivamente, solos o combinados, frente a *Candida albicans* en medio acuoso. Ambas moléculas alteraron la morfología de la pared celular, los efectos del timol fueron más pronunciados que los del eugenol. Combinaciones de las moléculas de hasta 1/4 MCI de ambas condujeron a un efecto sinérgico para inhibir el hongo estudiado. Guarda y col. (2011) ensayaron carvacrol y timol microencapsulados en películas plásticas flexibles frente a *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*,

Saccharomyces cerevisiae y *Aspergillus niger* y encontraron combinaciones sinérgicas entre ambos compuestos cuando trabajaron 1/4 MCI de cada molécula.

Sharma y col. (2018) encontraron un efecto sinérgico entre los aceites esenciales de LG y de clavo de olor frente al deterioro que causa el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae*, obtuvieron una CFI de 0,375 y dicho efecto lo atribuyen a la actividad antifúngica de los componentes bioactivos de cada aceite, en particular el eugenol en el AE de clavo de olor y al alfa-citral (geranial) y beta-citral (neral) en el AE de LG. Sin embargo, la bioactividad de los componentes principales de los aceites puede verse potenciada por la presencia de otras moléculas de interés que se encuentran en menor proporción y puede ser la causa de la interacción sinérgica entre ambos aceites. La combinación de LG y clavo de olor generó un sinergismo debido a las actividades antifúngicas de múltiples componentes bioactivos de cada aceite, la posibilidad de modular la bioactividad de los componentes principales de otras moléculas menores durante las interacciones podrían ser la otra razón para la sinergia observada entre ambos aceites (Rai y col., 2017). Aún no hay bibliografía que muestre interacción entre los AE de LG y de CC.

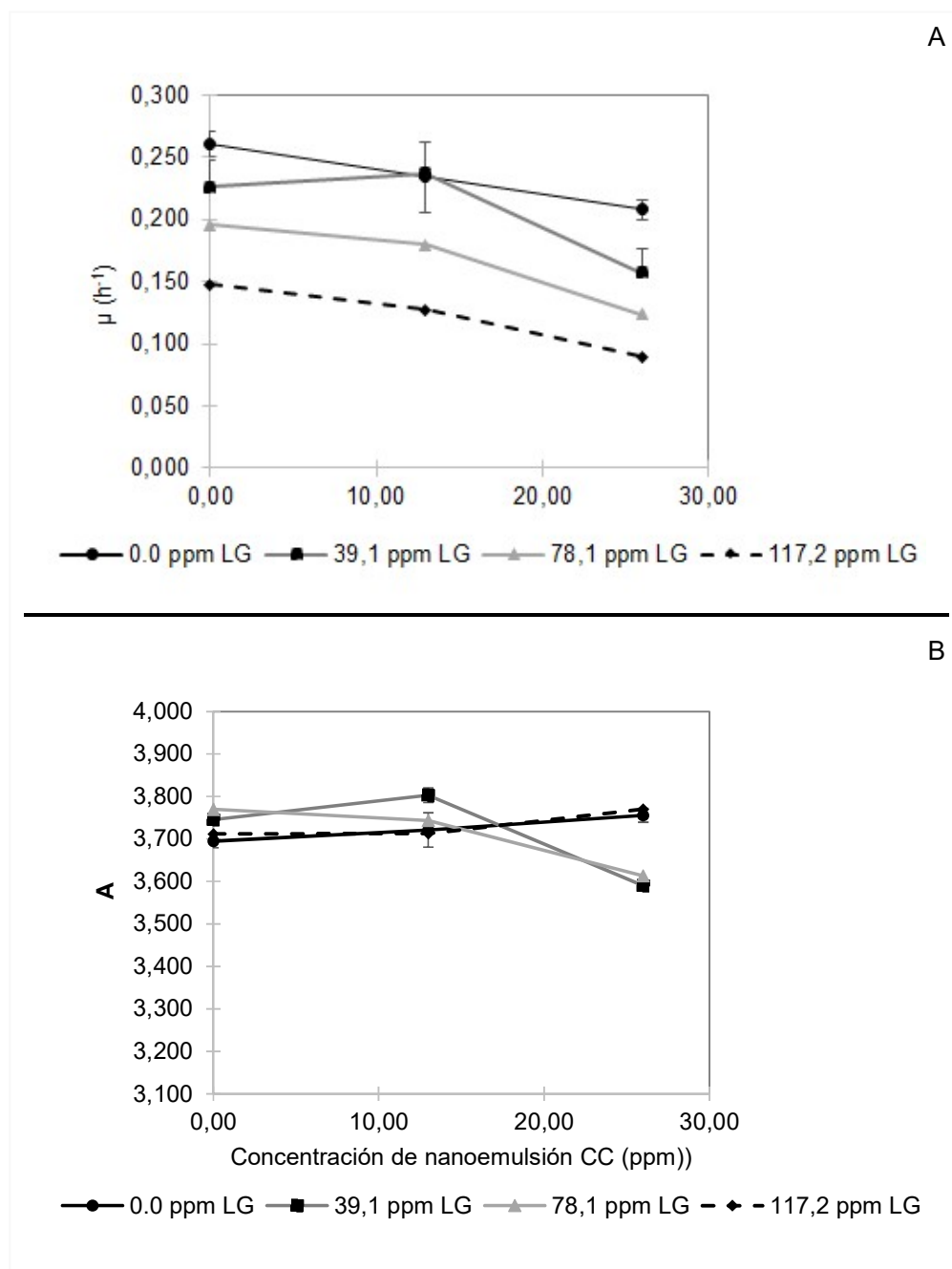


Figura II.8 Velocidad de crecimiento (μ , Panel A) y valor asintótico (A, Panel B) de *Z. baillii* a diferentes concentraciones de nanoemulsiones de los aceites esenciales de corteza de canela (CC) y de lemongrass (LG) en presencia de 20,0% m/m de xilitol. Las barras de error representan la desviación estándar de los parámetros.

II.4. Efectividad de las nanoemulsiones relacionada con la composición química y la hidrofobicidad de la superficie celular

La composición química de los aceites esenciales de LG, CC y CH se muestra en las Tablas II.7 y II.8. La acción antimicrobiana de los aceites esenciales se atribuye generalmente a los constituyentes principales. Sin embargo, los constituyentes menores juegan un papel importante, ya que pueden interactuar con los componentes principales, lo que da como resultado efectos aditivos, sinérgicos o antagonicos (Burt, 2004; Bassolé y Juliani, 2012).

Se identificaron 16 compuestos del aceite de LG. Los principales constituyentes fueron geranial y neral, que son estereoisoméricos de aldehídos monoterpénicos del citral: trans-citral y cis-citral, respectivamente. Otros autores han informado resultados similares (Abdulazeez y col., 2016). La efectividad del LG se atribuye particularmente a citral, ya que se ha informado sobre su acción contra bacterias, levaduras y mohos (Lu y col., 2018; Loeffler y col., 2014; Abdulazeez y col., 2016). La actividad antimicrobiana del citral está relacionada con la alteración y penetración de la estructura lipídica de la pared celular de los microorganismos, produciendo la desnaturalización de las proteínas, la destrucción de la membrana celular y la liberación de material intracelular (Lu y col., 2018). El limoneno, un componente menor del LG, también afecta el perfil de ácidos grasos de la membrana de algunas bacterias patógenas (Di Pasqua y col., 2006).

Con respecto a los aceites esenciales de canela, se identificaron 31 compuestos para CC y CH. La mayoría de ellos son coincidentes, aunque el componente principal de CC fue (E)-cinamaldehído mientras que fue eugenol para CH. Otros autores informaron compuestos similares y la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Hili y col., 1997; Friedman y col., 2000; Di Pasqua y col., 2006; Donsi y col., 2012; Ghosh y col., 2014; Loeffler y col., 2014; Monu y col., 2016). Se cree que el modo de acción del cinamaldehído depende de la concentración. A niveles bajos, inhibe las enzimas involucradas en la citocinesis; a concentraciones más altas (sub-letales), es inhibidor de la ATPasa; y, a concentraciones letales, perturba la membrana celular (Hyldgaard y col., 2012). El eugenol afecta la permeabilidad de la membrana celular y se sugirió que el grupo hidroxilo se une a las proteínas (ATPasa, histidina descarboxilasa, amilasa, proteasa) y afecta sus propiedades (Hyldgaard y col., 2012). El grupo carbonilo del cinamaldehído se uniría a proteínas que afectan la acción de las aminodescarboxilasas en *Enterobacter aerogenes* (Burt, 2004). Di Pasqua y col. (2006) informaron la alteración del perfil de ácidos grasos de la membrana de algunas bacterias debido a la presencia

de cinamaldehído o eugenol. Las nanoemulsiones de cinamaldehído al 0,1% produjeron la inactivación completa de *S. cerevisiae* después de 24 h de incubación a 32°C en agua (Donsi y col., 2012). La nanoemulsión de eugenol mostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* con la alteración de la permeabilidad de la membrana (Ghosh y col., 2014). Cinamaldehído y eugenol actuaron de forma sinérgica inhibiendo el crecimiento de algunas bacterias patógenas (Burt, 2004).

Las nanoemulsiones de LG y CC, solas o combinadas, disminuyeron significativamente el porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular de *Z. bailii* (Tabla II.9). Gliemmo y col. (2015) informaron resultados similares para el aceite esencial de canela frente a *Z. bailii* y *Z. rouxii*. Se observó un cambio notable en la estructura de la superficie de las células que permite que una mayor cantidad de células pueda adherirse a un solvente (Ming y Daeschel, 1995). La disminución de la hidrofobicidad debida a la mezcla de las nanoemulsiones se correlaciona con el efecto aditivo observado de esta mezcla sobre el crecimiento de la levadura (Tabla II.9). La diferencia en la naturaleza del componente principal de los aceites de canela podría ser la razón de la diferente actividad antimicrobiana observada entre ellos en este trabajo (Tabla II.8). El cinamaldehído es más efectivo que el eugenol para inhibir el crecimiento de *Z. bailii*, ya que Monu y col. (2016) obtuvieron MCIs de 50 ppm y 200 ppm, respectivamente. Estos resultados sugieren la existencia de una interacción entre aceites esenciales y la membrana celular de la levadura, siendo la superficie celular uno de los sitios de acción de los mismos.

Tabla II. 7. Composición química del aceite esencial de lemongrass.

Compuestos identificados	%
Metil heptenona	0,7
Limoneno	0,2
Linalol	1,3
Cis isocitral	0,4
Trans isocitral	1,0
Neral	31,2
Geraniol	5,1
Geranial	44,8
Geranil acetato	4,5
alfa- ylangeno	0,2
Beta- elemeno	0,5
Beta-Cariofileno	1,8
Alfa- humuleno	0,2
Gama-Cadineno	1,0
Delta-Cadineno	0,5
Óxido de cariofileno	0,5
Total identificado	93,9

Tabla II. 8. Composición química de los aceites esenciales de corteza de canela y de hojas de canela.

Compuestos identificados	Aceite esencial de corteza de canela (%)	Aceite esencial de hojas de canela (%)
Alfa tuyeno	0,3	0,1
Alfa-Pineno	0,4	1,1
Canfeno	0,2	0,3
Benzaldehído	t	t
Mirceno	nd	0,1
Beta-Pineno	0,2	0,3
Alfa-Felandreno	0,2	0,5
Delta-3-careno	t	0,1
Alfa terpineno	0,4	0,1
Para-cimeno	1,6	0,9
Limoneno	0,4	0,3
Beta-Felandreno	1,3	0,5
1,8-cineol	t	t
Terpinoleno	t	0,1
Linalol	4,4	2,0
Borneol	t	t
Trans hidrato de sabineno acetato	0,6	Nd
Alcanfor	t	t
Terpinen-4-ol	0,2	T
Alfa-Terpineol	0,4	0,2
(Z)-Cinamaldehido	t	Nd
(E)-Cinamaldehido	69,2	t
Safron	t	0,7
Eugenol	1,9	77,9
Alfa-copaeno	0,8	0,9
Beta-Cariofileno	5,2	2,8

E- Cinamil acetato	2,2	1,1
Alfa-humuleno	1,0	0,5
Eugenol Acetato	nd	2,1
O-E-metoxi cinamaldehido	0,3	Nd
Gama-Cadineno	nd	0,1
Delta-Cadineno	0,1	0,2
Oxido de cariofileno	1,1	0,6
Benzoato de bencilo	1,1	2,6
Total identificado	93,5	96,1

Nd: no detectado; t: trazas (< to 0,05%)

Tabla II. 9. Porcentaje de hidrofobicidad de *Z. bailii* en presencia de nanoemulsiones de aceite esencial de corteza de canela (CC), de lemongrass (LG) o de su combinación.

Sistema	Hidrofobicidad (%)
Control	92,44 ± 1,53
CC 2/3 MIC (104,3 ppm)	67,65 ± 4,15
LG 2/3 MIC (312,5 ppm)	54,27 ± 2,13 ^a
LG - CC 1/4 MIC (117,2 ppm / 39,1 ppm)	56,80 ± 5,02 ^a

II.5. Evaluación sensorial de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de corteza de canela y de lemongrass en jugo de manzana

Para evaluar el impacto sensorial de las MCI de los aceites esenciales determinadas en caldo (468,8 ppm de LG y 156,3 ppm de CC), se realizó un análisis sensorial en un jugo de manzana con las nanoemulsiones solas o combinadas. Cabe destacar que, como para la preparación del jugo se debió aplicar un factor de dilución 1/4, los niveles reales testeados también fueron afectados por ese factor de dilución.

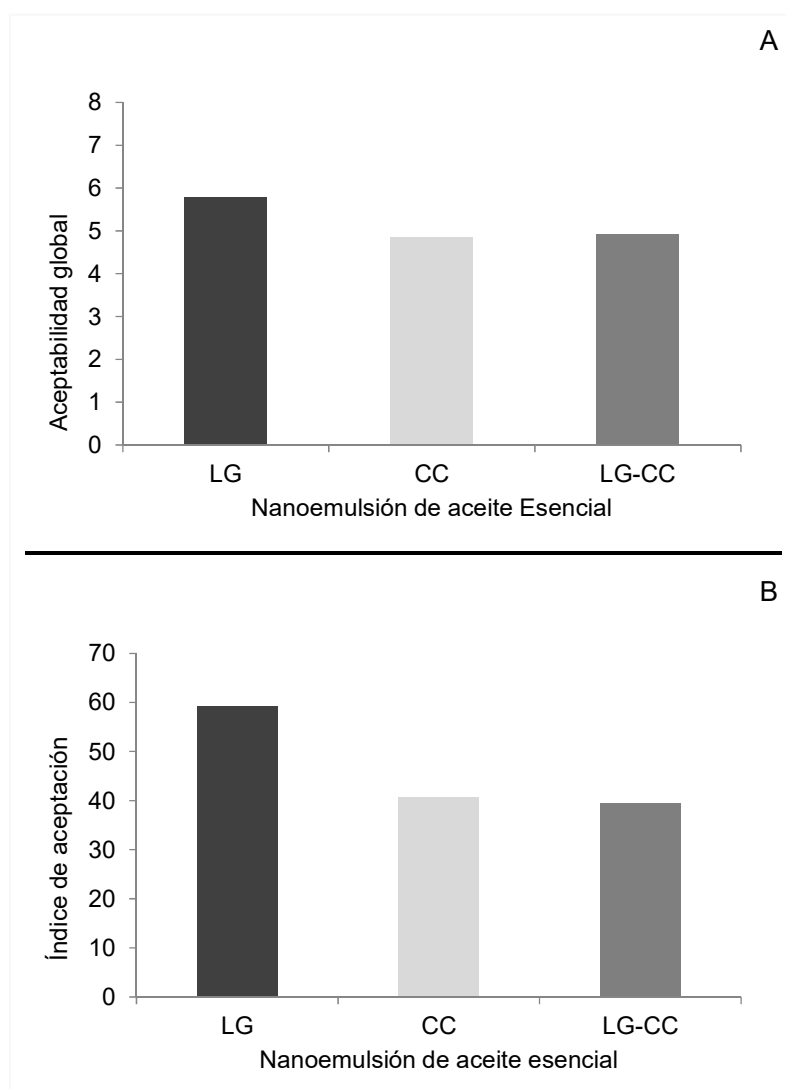


Figura II.9 Evaluación sensorial de jugo de manzana conteniendo nanoemulsiones de lemongrass (LG), corteza de canela (CC) o la mezcla de ambas (LG-CC). Panel A: Aceptabilidad global. Panel B: Índice de aceptación de los jugos con puntuaciones mayores a 6 (“me gusta ligeramente”).

La aceptabilidad global del jugo conteniendo LG tuvo el puntaje más alto (5,77), el cual fue significativamente diferente ($p < 0,05$) del jugo conteniendo CC (4,85) o la mezcla de ambos aceites (4,92), y estuvo cerca de la evaluación "me gusta ligeramente" (Figura II.9, Panel A).

Por otra parte, se determinó el índice de aceptación de las muestras, el cual determina el porcentaje de consumidores que evaluaron los jugos con una puntuación mayor o igual a 6 ("me gusta ligeramente"). Se observó que el 59,2% de los consumidores calificaron el jugo conteniendo LG con 6 o más, mientras que para los otros jugos, los índices de aceptabilidad fueron de 40,8% para CC y 39,5% para la mezcla (Figura II.9, Panel B). Este índice refleja el grado de gusto o disgusto por un producto alimenticio, que a su vez se usa para predecir la aceptabilidad, y es interesante utilizarlo para el análisis del efecto del agregado de nuevos ingredientes o cuando se optimiza una formulación (Granato y col., 2012).

Estos resultados indican que, incluso cuando son diluidos a partir de las MCIs, las nanoemulsiones de AE tienen una fuerte influencia en las propiedades sensoriales de los jugos. Hay numerosos trabajos que investigan las condiciones óptimas para obtener nanoemulsiones de AE estables, pero la mayoría se limita al estudio de su actividad antimicrobiana sin abordar el impacto sensorial de los niveles efectivos en alimentos reales. Las mezclas de un extracto acuoso de lemongrass (1:4) con jugo de naranja en una relación extracto/jugo 2:1 o con jugo de lima en una relación extracto/jugo 3:1 mostraron puntuaciones de aceptabilidad global de 9,0 y 8,5, respectivamente, en una escala hedónica de 9 puntos (Assous y col., 2013). La adición de 2000 mg/l de aceite de CC (nivel con actividad antimicrobiana) a jugos de melón, sandía, manzana, pera, tomate, fresa y naranja, procesados por campo eléctrico pulsado de alta intensidad, los hizo sensorialmente inaceptables (Mosqueda-Melgar y col. 2008, 2012). Una mermelada de tomate que contenía 60 mg/l de aceite de canela (idéntica a la natural) fue sensorialmente aceptable, pero este nivel no fue suficiente para inhibir el crecimiento de *Z. bailii* y *Z. rouxii* (Gliemmo y col., 2015).

Estos resultados indican que si en la formulación de alimentos se usan niveles sensorialmente aceptables de AE, inferiores a los valores con actividad antimicrobiana, se deberán aplicar obstáculos adicionales para garantizar la estabilidad microbiológica de los mismos.

II Conclusiones

Los ácidos orgánicos redujeron el crecimiento de *Z. bailii*, siendo el ácido cítrico el que mostró mayor efecto. Los diferentes efectos observados podrían estar relacionados con el grado de disociación de los ácidos, con la posibilidad de ser metabolizados por las levaduras y con los mecanismos de resistencia.

La velocidad de crecimiento de *Z. bailii* disminuyó en función de la reducción del pH, independientemente de la naturaleza del ácido y del contenido de xilitol. El xilitol mostró un efecto reductor de la velocidad de crecimiento, ya sea en ausencia como en presencia de ácidos, que fue mayor con el aumento de su concentración y fue independiente de la naturaleza de los ácidos. Sin embargo, el parámetro A se incrementó ligeramente por la adición de xilitol. Probablemente, la adaptación de la célula al descenso de la a_w durante la fase de crecimiento incrementaría su resistencia dando como resultado el ligero aumento de la máxima población alcanzada.

Las nanoemulsiones mostraron acción antimicrobiana frente al crecimiento de *Z. bailii* a pH 4,00, obteniéndose valores de MCIs entre 156,3 y 1250,0 ppm, dependiendo del aceite esencial. Se observó una leve disminución en la eficacia antimicrobiana de las nanoemulsiones debido a la aplicación del proceso de ultrasonido y al incremento del tiempo de ultrasonificación. Cabe destacar que el aumento del tiempo de ultrasonificación conlleva a un mayor consumo de energía en el proceso de elaboración de las nanoemulsiones. El ultrasonido es una tecnología eficiente para reducir el tamaño de gota, pero comprometería la acción fungicida, como consecuencia el alto estrés aplicado durante el tratamiento y su calentamiento durante el proceso de homogeneización, lo que promovería la degradación de compuestos activos.

Por otra parte, se observó una interacción aditiva entre las nanoemulsiones de LG y CC frente al crecimiento de *Z. bailii*, en ausencia de xilitol.

Las MCIs de las nanoemulsiones no se vieron afectadas por la presencia de xilitol, probablemente debido a que el xilitol afecte solo la fase de crecimiento exponencial, durante la cual la célula se adapta a la reducción de la a_w , y se necesite la misma MCI del aceite que en ausencia del polirol. Sin embargo, a diferencia de lo observado en ausencia de xilitol, se encontraron combinaciones sinérgicas de los AE en presencia de 20,0% de xilitol, lo que resulta interesante para lograr una formulación final con inferiores niveles de AE y un menor impacto sensorial.

La actividad antifúngica de las nanoemulsiones de LG, CC y CH observada pudo ser debida a la presencia de citral, trans-cinamaldehído y eugenol como componentes principales, respectivamente, y porque produjeron cambios en la hidrofobicidad de la membrana celular.

La evaluación sensorial de las MCIs de las nanoemulsiones de LG y de CC, solas o combinadas, en jugo de manzana dio como resultado que un nivel de 468,8 ppm de LG fue el más aceptado cuando fue diluido 1:4 para la elaboración del jugo de manzana comercial.

Las nanoemulsiones estables obtenidas podrían usarse como agentes antimicrobianos naturales en la formulación alimentos. Sin embargo, es necesario encontrar las concentraciones óptimas, no sólo para garantizar la estabilidad microbiológica, sino también para no afectar las propiedades sensoriales del producto final. En caso de que el factor limitante sea el sensorial, será necesario entonces combinar el agregado de las nanoemulsiones con otras barreras que aseguren la estabilidad microbiológica del alimento.

Estos resultados muestran la importancia de la correcta selección de los factores de estrés a aplicar para inhibir el desarrollo de la levadura deteriorativa estudiada. Es por ello que se seleccionó el ácido cítrico como acidulante para disminuir el pH a 4,00, una concentración de 20,0% de xilitol como edulcorante y como reductor de la a_w y las nanoemulsiones de US-5 de CC y LG para formular un jugo de yacón.

Capítulo III: Jugo de yacón

Los objetivos de este capítulo fueron:

- Optimizar la elaboración de un jugo de yacón mediante el estudio del efecto de la temperatura sobre la estabilidad microbiológica y el desarrollo de pardeamiento del jugo de yacón.
- Estudiar el efecto del ácido ascórbico sobre el desarrollo de pardeamiento del jugo.
- Evaluar el efecto de la presencia del jugo de yacón sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones de aceites esenciales.
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones en el jugo.
- Estudiar la existencia de interacciones entre las nanoemulsiones sobre su acción antimicrobiana en el jugo a fin de hallar combinaciones sinérgicas.
- Evaluar el efecto de la presencia de xilitol, como depresor de la a_w y edulcorante, sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones en el jugo.
- Evaluar el efecto de la nanoemulsion de lemongrass sobre la aceptabilidad sensorial del jugo de yacón.
- Estudiar el efecto de la temperatura de almacenamiento y de la presencia de la nanoemulsion de lemongrass sobre la estabilidad microbiológica del jugo de yacón.
- Estudiar las propiedades crioprotectoras del residuo de yacón resultante de la elaboración del jugo frente a bacterias de interés industrial.
- Determinar la composición química, el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de la formulación final del jugo de yacón.

III. Resultados y discusión

Se obtuvo jugo de yacón a partir de los trozos de yacón almacenados. El rendimiento fue de $57,24 \pm 2,50\%$. El pH del jugo se ajustó a 4,00, mediante el agregado de una solución de ácido cítrico, y se adicionó 20,0% m/m de xilitol. El contenido de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) y la a_w del jugo se muestran en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Contenido de sólidos solubles (°Brix) y actividad de agua del jugo de yacón.

Contenido de xilitol (% m/m)	°Brix	Actividad de agua
0,0	8 ± 1	0,986 ± 0,001
20,0	23 ± 1	0,965 ± 0,001

III.1. Efecto del tratamiento térmico sobre la flora nativa y las propiedades fisicoquímicas del jugo de yacón

En una primera instancia se estudió el efecto del tratamiento térmico sobre la flora nativa y las propiedades fisicoquímicas del jugo de yacón durante el almacenamiento a 25°C. Se estudiaron dos tratamientos térmicos: A) 90°C - 60 segundos y B) 80°C - 90 segundos. Los resultados se muestran en la Tabla III.2.

Ambos tratamientos no afectaron la a_w , los °Brix y el pH durante el almacenamiento con respecto al sistema control, cuyos valores fueron $0,965 \pm 0,001$; 23 ± 1 °Brix y $4,02 \pm 0,01$, respectivamente a los 6 días de almacenamiento.

Con respecto a la estabilidad microbiológica se observó que, en ausencia de tratamiento térmico, luego del almacenamiento el contenido de aerobios mesófilos y de hongos y levaduras se incrementaron en 3 y 4 ciclos log, respectivamente. Esto se evidenció en el hinchamiento de las bolsas a los 6 días de almacenamiento.

Luego de su aplicación, los tratamientos térmicos permitieron reducir el contenido de hongos y levaduras a <1 UFC/ml, valor que se mantuvo constante luego de 6 días de almacenamiento. Sin embargo, el tratamiento B (80°C -90 segundos) no permitió controlar el recuento de mesófilos totales, debido a que luego de su aplicación mostró un recuento de 4 UFC/ml, el cual aumentó en de 2 ciclos log luego del almacenamiento, indicando que las condiciones de tiempo y temperatura del este tratamiento no fueron suficientes para asegurar la calidad microbiológica del jugo.

El recuento de coliformes para ambos tratamientos fue menor a 1 UFC/ml indicando que se utilizaron buenas prácticas de elaboración.

Tabla III.2. Evolución de la flora nativa del jugo de yacón conteniendo 20,0% m/m de xilitol sometido a dos tratamientos térmicos.

Tratamiento	Tiempo (Días)	Aerobios mesófilos (UFC/ml)	Hongos y levaduras (UFC/ml)
Control	0	6	$3,7 \cdot 10^1$
	6	$1,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^5$
A 90°C - 60 segundos	0	<1	<1
	6	<1	<1
B 80°C - 90 segundos	0	4	<1
	6	$1,1 \cdot 10^2$	<1

Con respecto al desarrollo de pardeamiento, no se observaron diferencias significativas en el IP de los jugos sometidos a los distintos tratamientos térmicos a partir de los 6 días de elaboración, como se muestra en la Figura III.1. El control presentó un mayor pardeamiento en comparación con los tratamientos térmicos desde el inicio hasta los 14 días de almacenamiento, lo que indica que ambos tratamientos térmicos fueron efectivos para inhibir el pardeamiento enzimático del jugo durante el tiempo de almacenamiento.

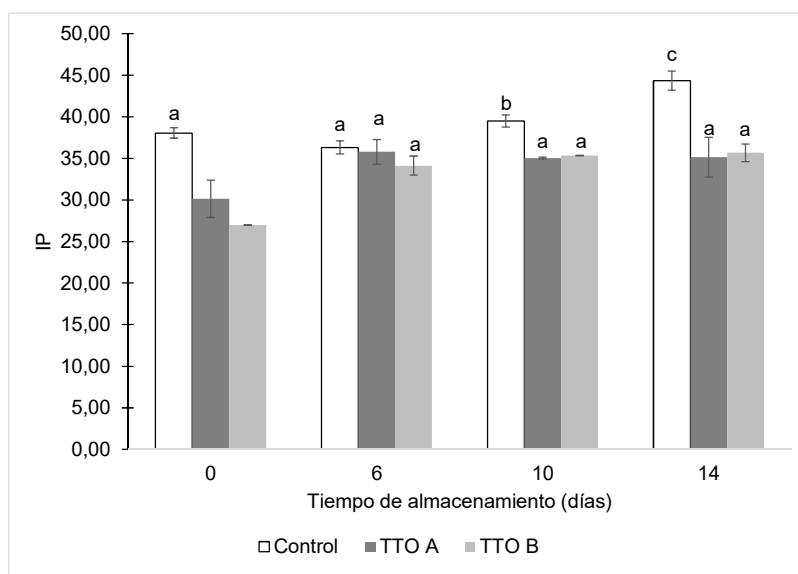


Figura III.1. Índice de pardeamiento (IP) de jugo de yacón sometido a dos tratamientos térmicos: Tratamiento A (TTO A) 90°C – 60 segundos o Tratamiento B (TTO B) 80°C - 90 segundos. El Control no recibió ningún tratamiento térmico. Las columnas seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de los promedios.

En base a estos resultados, se eligió el tratamiento A como parte del proceso de elaboración del jugo para continuar con las siguientes determinaciones.

III.2. Efecto del ácido ascórbico sobre el desarrollo de pardeamiento del jugo de yacón

Luego de seleccionar el tratamiento térmico, se estudió el efecto de la presencia de ácido ascórbico (AA) sobre el desarrollo de pardeamiento del jugo durante el almacenamiento a 25°C.

Los valores obtenidos del Índice de Pardeamiento (IP) de las muestras con y sin AA, sometidas al tratamiento térmico A, se muestran en la Figura III.2. El agregado de AA no redujo el pardeamiento de los sistemas ya que no se observaron diferencias significativas en el IP para las muestras con o sin AA.

Es conocida la capacidad del AA de reducir el pardeamiento (Sapers, 2002). Sin embargo, como ese efecto no fue observado en este ensayo, probablemente sólo el tratamiento térmico y la presencia de ácido cítrico fueron suficientes para inactivar las enzimas que provocan el pardeamiento en el jugo. En base a estos resultados, para continuar con el desarrollo de la formulación del jugo de yacón, se decidió descartar el AA como ingrediente.

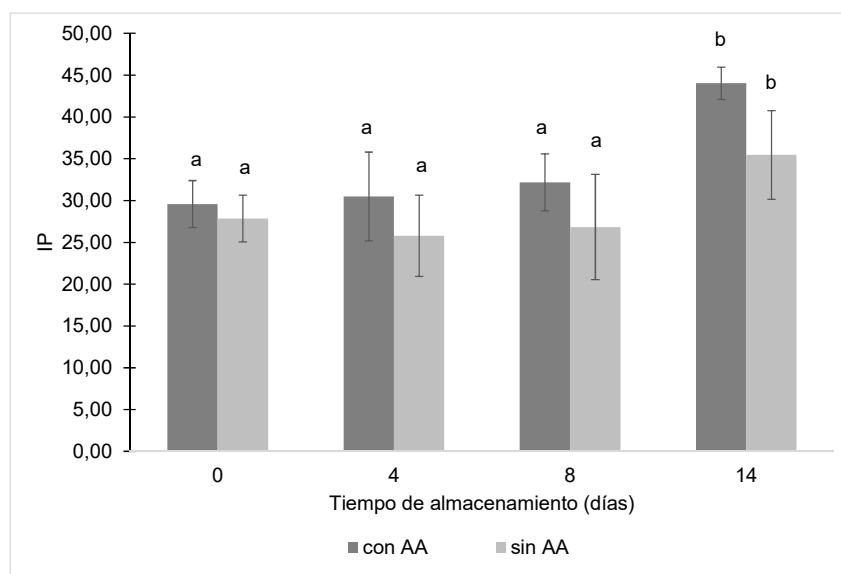


Figura III.2. Índice de pardeamiento (IP) de jugo de yacón sometido a un tratamiento térmico en presencia o en ausencia de ácido ascórbico (AA). Las columnas seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de los promedios.

III.3. Efecto del tratamiento térmico del jugo de yacón sobre la acción antimicrobiana de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y corteza de canela frente a *Z. bailii* y sobre el desarrollo de pardeamiento

Para estudiar el efecto del tratamiento térmico sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales nanoemulsionados de LG y CC, las nanoemulsiones se incorporaron al jugo antes o después del tratamiento térmico, los sistemas se inocularon con *Z. bailii*, se almacenaron y se realizó el recuento de la levadura. Estos resultados se muestran en la Figura III.3.

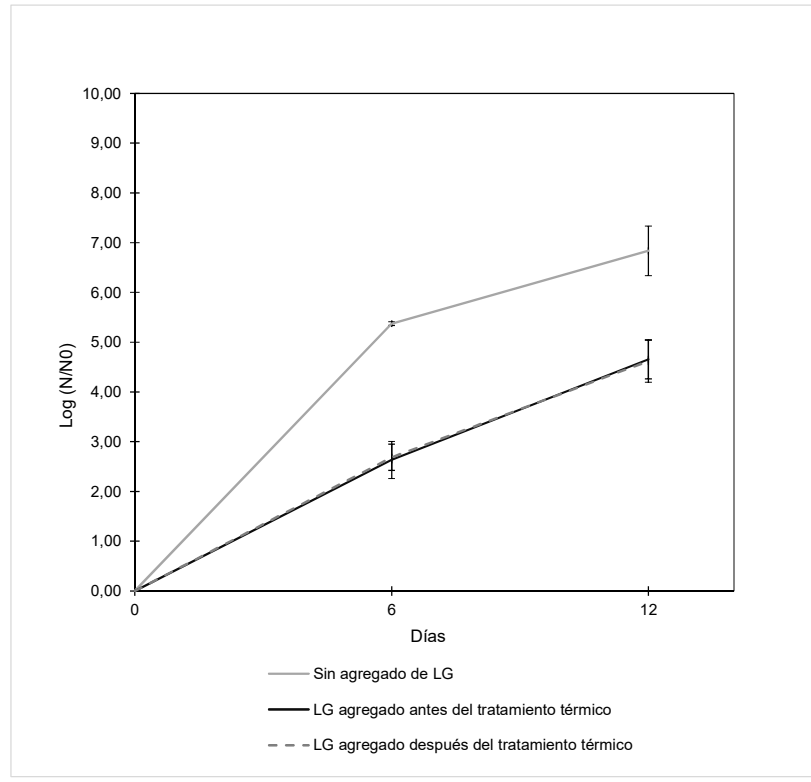
El tratamiento térmico no afectó la actividad antimicrobiana de LG, dado que no se encontraron diferencias significativas en la población de la levadura cuando se agrega la nanoemulsión de LG antes o después del tratamiento térmico (Figura III.3, Panel A). Sin embargo, el tratamiento térmico redujo la actividad antimicrobiana de CC ya que el recuento de *Z. bailii* fue 2 ciclos log mayor en los jugos tratados térmicamente que contenían dicha nanoemulsión a los 6 días de almacenamiento y 1,2 ciclos log a los 12 días (Figura III.4, Panel B).

Mishra y Dubey (1994) observaron que el aceite esencial de LG fue termoestable en el rango de temperaturas entre 5 y 100°C en concentraciones de 1000 y 1500 ppm, ya que exhibió una inhibición total del crecimiento de diversos hongos. Además, demostraron que aumentar la densidad del inóculo de *Aspergillus flavus* no altera la eficacia de la actividad antifúngica del aceite.

En base a estos resultados, cabe destacar la importancia, por un lado, del orden de agregado de las nanoemulsiones durante la elaboración del jugo, y por otro, del control de la temperatura durante el proceso de ultrasonicación para la elaboración de las nanoemulsiones ya que, en el caso de CC, un aumento de la temperatura podría afectar su actividad antimicrobiana.

Se estudió el efecto del agregado de los aceites esenciales antes o después del tratamiento térmico A sobre el desarrollo de pardeamiento del jugo durante el almacenamiento a 25°C. Los valores obtenidos del Índice de Pardeamiento (IP) se muestran en la Figura III.4. En general, no se observó efecto del agregado de AE sobre el pardeamiento del jugo, a excepción del AE de CC que presentó un ligero aumento del IP respecto del control sin AE hasta los 14 días de almacenamiento.

A



B

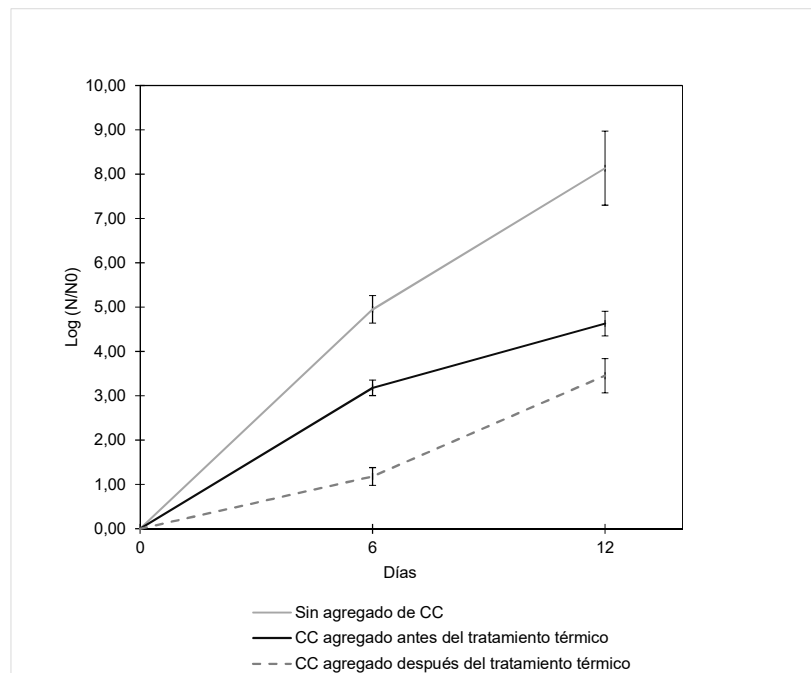
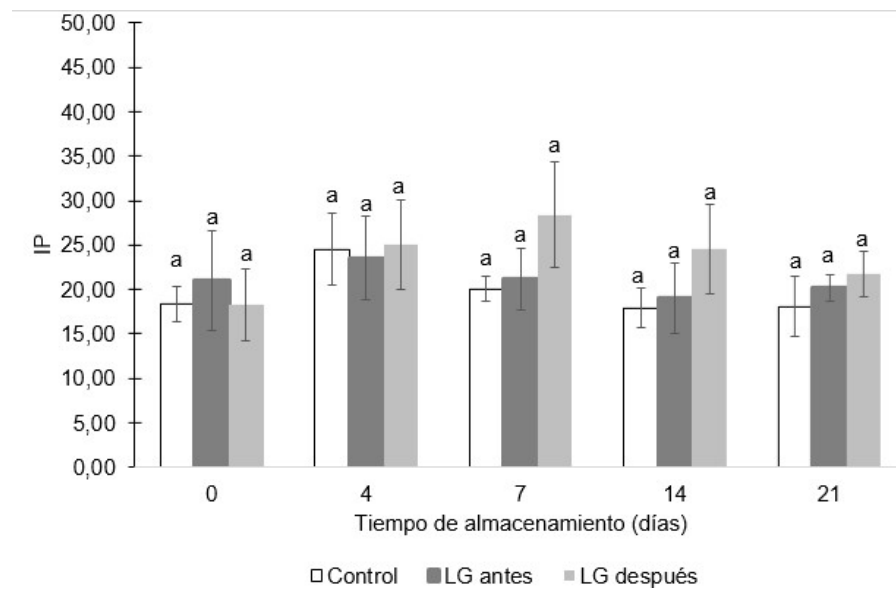


Figura III.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad de las nanoemulsiones de aceites esenciales de lemongrass (LG, Panel A) y de corteza de canela (CC, Panel B) frente al crecimiento de *Z. bailii* en jugo de yacón.

A



B

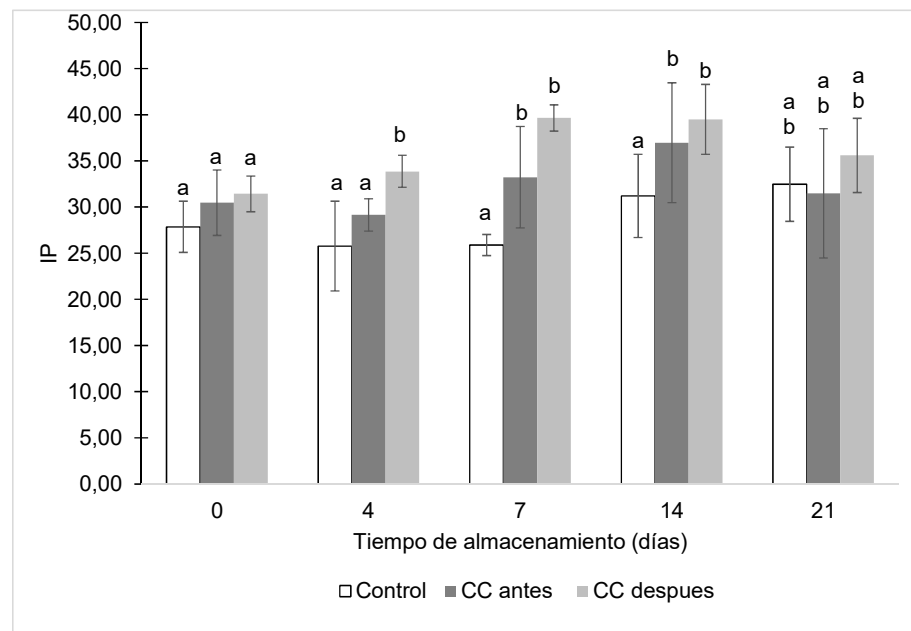


Figura III.4. Índice de pardeamiento (IP) de jugo de yacón conteniendo 468,8 ppm de nanoemulsión de lemongrass (LG) antes o después del tratamiento térmico (Panel A) y conteniendo 156,3 ppm de nanoemulsión de corteza de canela (CC) antes o después del tratamiento térmico (Panel B). Las columnas seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de los promedios.

III.4. Estudio del efecto de las nanoemulsiones de aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela y del xilitol sobre el desarrollo de *Z. bailii* en jugo de yacón

III.4.1. Mínimas concentraciones inhibitorias de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela en jugo de yacón en ausencia o presencia de xilitol

Las MCIs de las nanoemulsiones de LG y CC sobre el crecimiento de *Z. bailii* en el jugo fueron 937,5 ppm y 312,5 ppm, respectivamente, ya sea en ausencia como en presencia de xilitol. Ambos valores de MCIs en el jugo fueron mayores que sus respectivas MCIs en caldo Sabouraud (Tabla III.3). Estos resultados son consistentes con lo informado por Jo y col. (2015), quienes observaron mayor crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* O157:H7 933, *Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus aureus* ATCC 12692 en un jugo de melón que en medio acuoso en presencia de una nanoemulsión de trans-cinamaldehído. Tal como se presentó en el Capítulo 2, trans-cinamaldehído es el componente mayoritario (69,2%) del aceite esencial de corteza de canela (Tabla II.8).

Si bien los aceites esenciales funcionan como antimicrobianos, generalmente se ha encontrado que un alimento es un medio más favorable para el crecimiento de microorganismos que un caldo de cultivo, y, por lo tanto, se necesita una mayor concentración de aceite esencial para lograr el mismo efecto inhibitorio en la matriz alimentaria (Shelef, 1983; Smid y Gorris, 1999). Esto puede deberse a que al haber mayor disponibilidad de nutrientes en los alimentos en comparación con los medios de laboratorio las bacterias pueden reparar los daños celulares más rápidamente (Gill y col., 2002). Existen estudios que han registrado el efecto de los alimentos en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, aunque aún no se han cuantificado o descritos los mecanismos. Se cree que las propiedades intrínsecas del alimento como el contenido de agua, proteínas, grasas, antioxidantes, acidez y otros aditivos, así como factores extrínsecos como la temperatura de almacenamiento, las condiciones del envasado del producto (envasado al vacío o en atmósfera modificada y material de empaque) y características propias de los microorganismos pueden influir en este aspecto (Burt, 2004). Generalmente, la susceptibilidad de las bacterias al efecto antimicrobiano de los AE parece aumentar con una disminución del pH de los alimentos, la temperatura de almacenamiento y la cantidad de oxígeno dentro del envase (Skandamis y Nychas, 2000; Tsigarida y col., 2000).

Algunos autores han estudiado que la presencia de pulpa en los jugos puede afectar la actividad de los aceites esenciales. Tserennadmid y col. (2011) encontraron una mayor MCI en jugo turbio de manzana que en jugo clarificado de manzana, ya que en el primero, las partículas de un tamaño aproximado de 0,5 a 2 μm , propias de la pulpa del jugo, pueden disminuir la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de salvia, enebro, limón y mejorana frente a las levaduras *Geotrichum candidum*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, debido a que algunos componentes de los aceites podrían adherirse a las partículas de la pulpa y precipitar. Los mismos autores encontraron una menor MCI en un medio de extracto de malta que en jugo de manzana y en leche descremada. Las proteínas de la leche pueden reducir la actividad antimicrobiana de los AE ya que unen los aceites a sus restos hidrofóbicos y quedan menos disponibles para interactuar con la membrana celular de los microorganismos (Smith-Palmer y col. 2001; Cava y col. 2007). Loeffler y col. (2014) observaron la misma tendencia de una menor MCI de cinamaldehído en caldo Sabouraud que en jugo de manzana frente a dos cepas de *Z. bailii*, posiblemente debido a una interacción entre los grupos funcionales de los AE y los ingredientes del jugo. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los jugos de manzana, turbio y clarificado, lo que podría deberse a la baja concentración de jugo de manzana (2%) en las muestras.

Tal como se observó en el Capítulo 2, los resultados de las MCIs fueron independientes de la presencia de xilitol. Ello podría deberse a un balance entre los efectos que produce el descenso de la a_w en la célula: cambios en la permeabilidad celular y en la actividad y síntesis enzimática y el aumento de la resistencia, debido a la acumulación intracelular de polioles. Hay escasa información acerca del efecto de la concentración de xilitol sobre la disminución de la MCI en jugo. Como se comentó previamente, en estudios previos se observó que 11,00% m/m de xilitol redujo el crecimiento de *Z. bailii* en caldo Sabouraud a pH 3,00 ajustado con AC (Gliemmo y col., 2006).

Tabla III.3. Mínimas concentraciones inhibitorias (MCIs) de las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass (LG) y de corteza de canela (CC) en caldo Sabouraud y en jugo de yacón, tanto en ausencia y como en presencia de 20,0% m/m de xilitol.

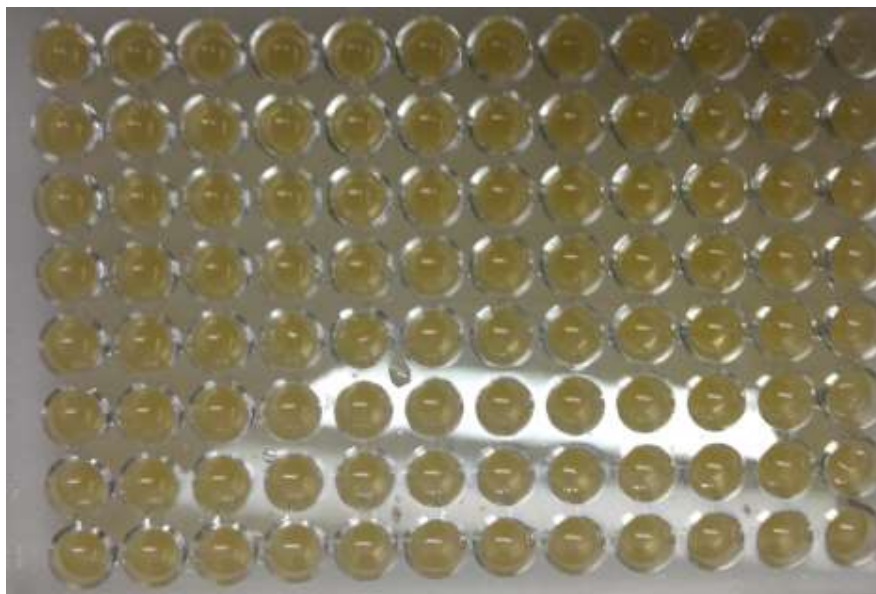
Medio	MCI (ppm)	
	LG	CC
Caldo Sabouraud	468,8	156,3
Jugo	937,5	312,5

III.4.2. Estudio de la interacción entre las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela en jugo de yacón en ausencia o presencia de xilitol

III.4.2.1. Determinación de las concentraciones fraccionarias inhibitorias de las nanoemulsiones de lemongrass y corteza de canela en jugo de yacón

El uso del indicador redox y del mediador de electrones permitió detectar el crecimiento de la levadura debido a que la turbidez propia del jugo impidió medir mediante turbidimetría (Figura III.5).

A



B

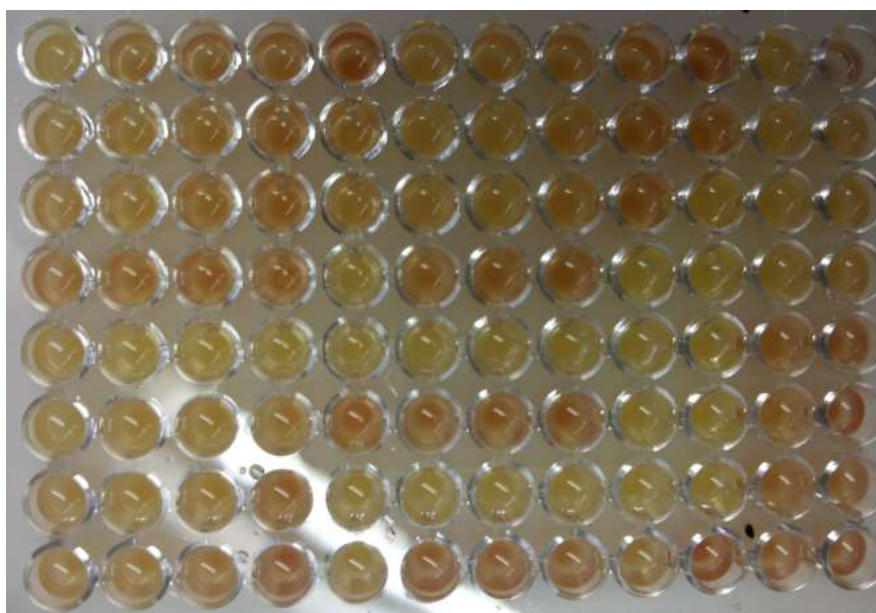


Figura III.5. Microplacas que muestran el efecto de las nanoemulsiones de aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela, solas o combinadas frente al crecimiento de *Z. bailii* en jugo de yacón antes (Panel A) y después del agregado de indicador (Panel B).

En la Figura III.6 se muestra el resultado de las microplacas luego de la incubación para el jugo conteniendo los aceites esenciales en ausencia de 20,0% de xilitol, observándose los pocillos positivos con viraje del indicador a rosado/rojo y los negativos con el color original del jugo de yacón. En las zonas delimitadas por las líneas negras no se observó viraje de color. En presencia de 20,0% de xilitol, se observó un patrón similar.

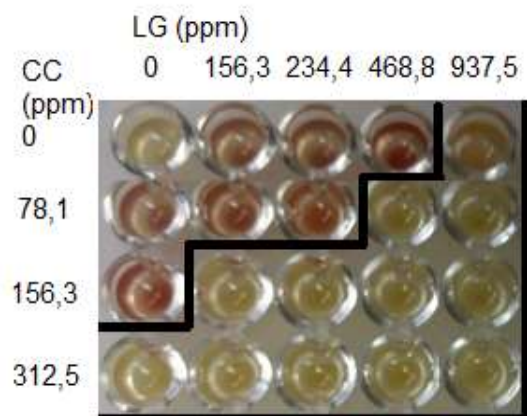


Figura III.6. Efecto de las nanoemulsiones de aceites esenciales de lemongrass (LG) y de corteza de canela (CC), solas o combinadas frente al crecimiento de *Z. baillii* en jugo de yacón en ausencia de 20,0% m/m de xilitol.

En la Tabla III.4 se muestran las concentraciones fraccionarias inhibitorias (CFI) de las nanoemulsiones LG y CC cuando se utilizaron de manera conjunta frente al crecimiento de *Z. baillii*. Independientemente de la presencia de xilitol, se obtuvieron dos combinaciones con efecto sinérgico, siendo la combinación de 156,3 ppm de LG (1/6 de MCI) y de CC (1/2 de MCI) la que mostró el mayor efecto. Con las combinaciones obtenidas se construyeron los isobogramas que se muestran en la Figura III.7. Estos resultados indican que el agregado de xilitol no potenció la actividad antimicrobiana de los aceites combinados a dichos niveles.

Tabla III.4. Concentraciones fraccionarias inhibitorias (CFI) de las nanoemulsiones de lemongrass (LG) y de corteza de canela (CC) en jugo de yacón a pH 4,00, tanto en ausencia como en presencia de 20,0% de xilitol.

LG (ppm)	LG fracción de MCI	CC (ppm)	CC fracción de MCI	CFI	Efecto
156,3	1/6	156,3	1/2	0,67	Sinérgico
468,8	1/2	78,1	1/4	0,75	Sinérgico

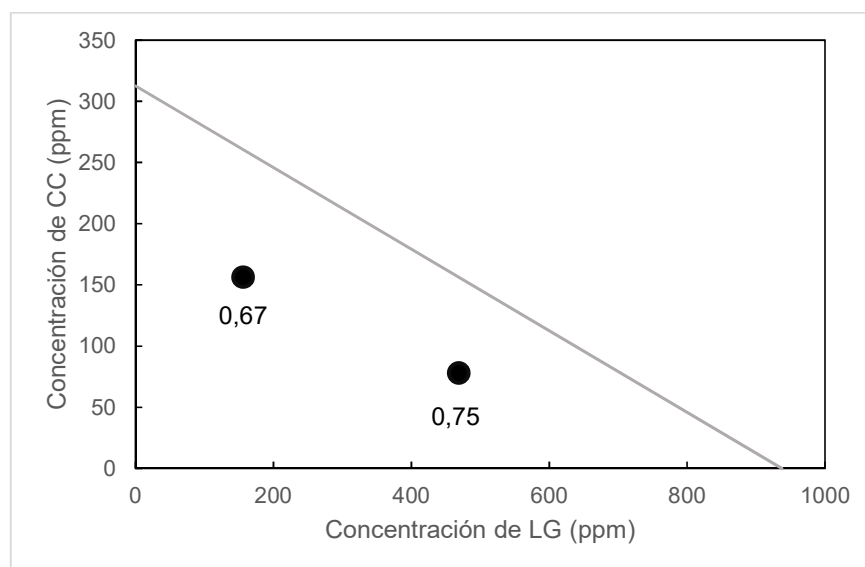


Figura III.7 Isoblograma de las concentraciones fraccionarias inhibitorias de los aceites esenciales de corteza de canela (CC) y de lemongrass (LG) frente a *Z. bailii* tanto en ausencia de xilitol como en presencia de 20,0% m/m de xilitol. Los números cercanos a los puntos experimentales representan las CFI.

Tserennadmid y col. (2011), experimentaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de salvia, enebro, limón y mejorana frente a levaduras deteriorativas de alimentos *Geotrichum candidum*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* en medio de extracto de malta y en jugo de manzana y leche. Las combinaciones de AE de enebro y salvia dieron como resultado efectos aditivos para inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* y *G. candidum* en medio acuoso,

pero todas las demás combinaciones no mostraron interacción. Además, trabajaron con combinaciones de los componentes principales de los AE: alfa-pineno (enebro) y limoneno (limón) mostraron un efecto sinérgico, mientras que alfa-pineno y linalool (salvia), un efecto aditivo similar al efecto aditivo de la combinación de aceites.

III.4.2.2 Estudio de la interacción entre las nanoemulsiones de los aceites esenciales de lemongrass y de corteza de canela sobre el desarrollo de *Z. bailii*.

En base a las combinaciones obtenidas de nanoemulsiones con efecto sinérgico frente al desarrollo de *Z. bailii* en jugo conteniendo xilitol, se seleccionó la combinación de 468,8 ppm de LG ($\frac{1}{2}$ MCI) y 78,1 ppm de CC ($\frac{1}{4}$ MCI) para estudiar la efectividad de las mismas sobre el recuento de la levadura. Para ello, se realizó un diseño factorial completo cuyas variables fueron las nanoemulsiones en dos niveles (0 y 468,8 ppm LG; 0 y 78,1 ppm CC) y se analizó, como respuesta, el recuento de viables en placa a los 6 y 12 días de almacenamiento.

Los datos de recuento de la levadura a los distintos tiempos de almacenamiento se muestran en la Tabla II.5. Estos datos pudieron ajustarse a los modelos de regresión para cada tiempo de almacenamiento dando como resultado los coeficientes de regresión y su análisis estadístico (Tabla III.6). Los coeficientes de correlación ajustados y las desviaciones promedio absolutas (AAD) obtenidos indican una buena correlación entre los valores observados y predichos de la respuesta y que el modelo proporciona una estimación razonablemente buena de la respuesta en el rango estudiado.

Tabla III.5. Variables, niveles y respuestas del diseño factorial completo.

Ensayo	Nivel de aceite esencial (ppm)		Log (N/N ₀)	
	Corteza de canela	Lemongrass	6 días	12 días
1	0	468,8	1,65	3,50
2	0	0	5,66	8,56
3	78,1	468,8	1,10	2,39
4	78,1	0	2,33	3,37
5	39,1	234,4	2,65	3,64
6	39,1	234,4	2,22	3,79
7	0	468,8	2,43	3,46
8	0	0	5,14	7,93
9	78,1	468,8	1,48	2,78
10	78,1	0	2,42	3,65
11	39,1	234,4	2,12	4,20
12	39,1	234,4	2,09	3,92

Los valores de probabilidad ($p < 0,05$) de los coeficientes del modelo de regresión indican que todos los efectos fueron significativos (Tabla III.6). Esto también puede observarse en la Figura III.8, la cual muestra la representación gráfica (Diagrama de Pareto) del tamaño del efecto de cada por separado y su interacción sobre la reducción logarítmica del recuento de *Z. bailii* a los tiempos de almacenamiento ensayados. El efecto de los aceites por separado fue significativo para reducir el crecimiento de la levadura. Sin embargo, la presencia conjunta de los aceites mostró una interacción positiva.

Estos resultados se pueden observar mejor analizando las superficies de respuesta (Figura III.9). El aumento del nivel de cada nanoemulsión de manera separada disminuyó el crecimiento de la levadura. Sin embargo, en presencia de 468 ppm de LG la adición de CC no afectó significativamente el recuento de la levadura, lo que indica que la combinación de aceites no potencia la actividad antimicrobiana de los mismos, explicando la interacción positiva observada (Figura III.8).

Considerando los coeficientes de regresión del ajuste de los datos se obtienen las siguientes ecuaciones de primer orden para el Log (N/N₀) de *Z. bailii* para 6 y 12 días de almacenamiento:

Ecuación III.1

Día 6

$$\text{Log (N/N}_0\text{)} = 5,23125 - 0,00717949*LG - 0,0387821*CC + 0,0000623219*LG*CC$$

Ecuación III.2

Día 12

$$\text{Log (N/N}_0\text{)} = 8,05771 - 0,010187*LG - 0,0607372*CC + 0,000105208*LG*CC$$

donde LG es el nivel de la nanoemulsión de lemongrass y CC, el nivel de nanoemulsion de CC.

Mediante la aplicación de las Ecuaciones III.1 y III.2 se obtiene que la combinación de factores que minimizan el recuento de la levadura es 468,8 ppm de LG y 78,1 ppm de CC, siendo el valor predicho de $\text{Log (N/N}_0\text{)} = 1,12$ y el experimental de $\text{Log (N/N}_0\text{)} = 1,29$ para 6 días; y 2,39 y 2,59; para 12 días de almacenamiento, respectivamente.

Tabla III.6 Valores-p, coeficiente de correlación (R^2), desviación promedio absoluta (AAD), coeficientes de regresión del modelo de regresión para la reducción logarítmica de *Z. bailii*. Variables independientes, X_1 : nivel de lemongrass (LG), X_2 : nivel de corteza de canela (CC). Coeficientes, α_1 : para nivel de LG, α_2 : para nivel de CC, α_{1-2} : para interacción de nivel de LG-CC combinados.

Parámetro			
Log (N/N ₀) 6 días de almacenamiento	p-valor	X_1	0,0001
		X_2	0,0001
		$X_1 * X_2$	0,0029
	Coeficientes de regresión	R^2	0,9567
		AAD	10,38
		α_0	5,23125
		α_1	- 0,00717949
		α_2	- 0,0387821
α_{1-2}	0,0000623219		
Log (N/N ₀) 12 días de almacenamiento	p-valor	X_1	0,0000
		X_2	0,0000
		$X_1 * X_2$	0,0004
	Coeficientes de regresión	R^2	0,9676
		AAD	6,83
		α_0	8,05771
		α_1	- 0,010187
		α_2	- 0,0607372
α_{1-2}	+ 0,000105208		

En la Figura III.10 se muestran los recuentos de cada sistema ensayado en función del tiempo de almacenamiento. Se puede observar el menor crecimiento de la levadura en presencia de la combinación 78,1 ppm de CC y 468,8 ppm de LG, que fue la combinación de mayores niveles de ambos aceites en el diseño estudiado, que coincide con lo predicho por ecuaciones arrojadas por el modelo. Además, la reducción logarítmica fue mayor a los 12 días en presencia de cada aceite por separado: tanto en presencia de LG (468,8 ppm LG) o en presencia de CC (78,1 ppm CC) la población cayó 3 ciclos log a los 6 días y 5 ciclos log a los 12 días de almacenamiento. Se observó una tendencia similar para las combinaciones de aceites arrojadas por el diseño.

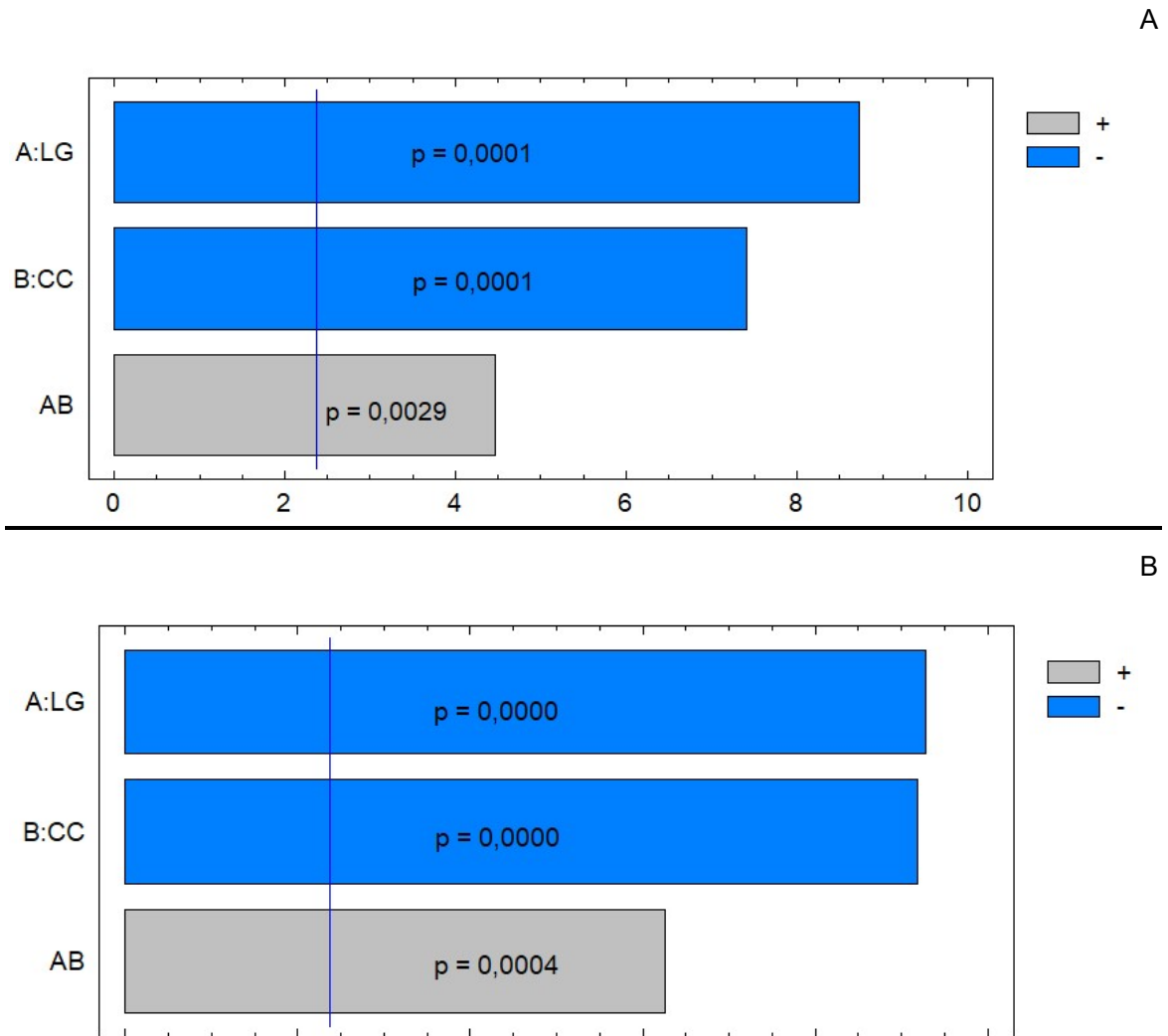
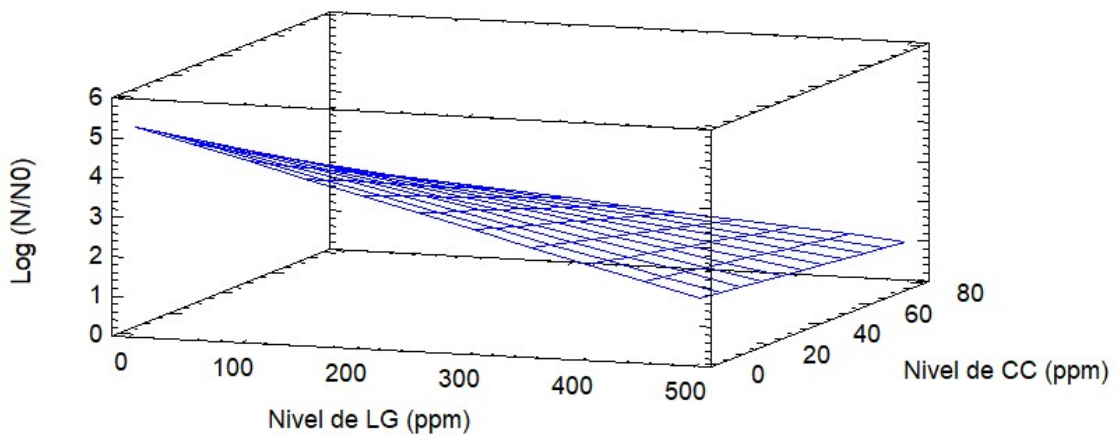


Figura III.8 Gráfico de Pareto para el log N/N_0 de *Z. bailii* en jugo de yacón conteniendo nanoemulsiones de aceites esenciales de lemongrass (LG) y de canela (CC) a los 6 (Panel A) y a los 12 (Panel B) días de almacenamiento.

A



B

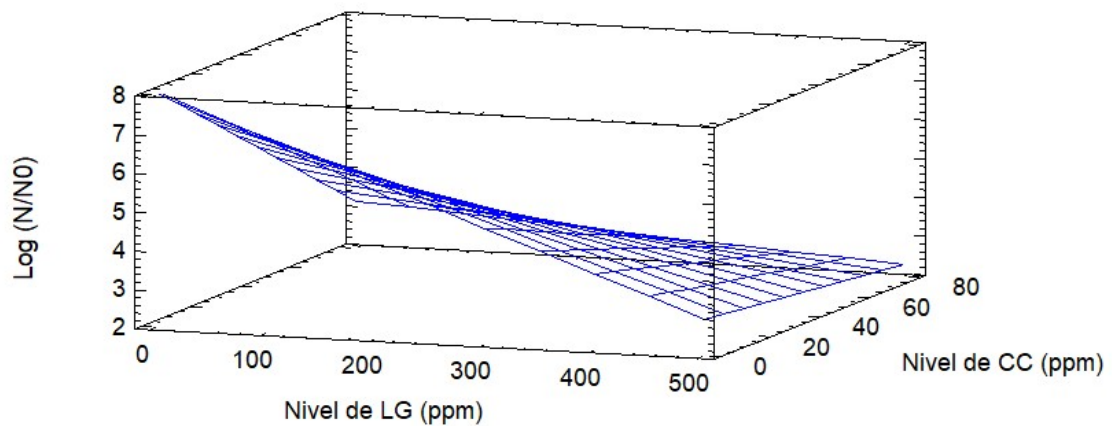


Figura III.9 Superficie de respuesta del $\log N/N_0$ de *Z. bailii* en jugo de yacón conteniendo nanoemulsiones de aceites esenciales de lemongrass (LG) y de canela (CC) a los 6 (Panel A) y a los 12 (Panel B) días de almacenamiento.

A partir de estos resultados, junto con los del análisis sensorial del jugo de manzana realizado en el Capítulo 2, en el que se observó que la nanoemulsión de CC fue menos aceptada que la de LG, se seleccionó la nanoemulsión de LG como preservador del jugo de yacón formulado.

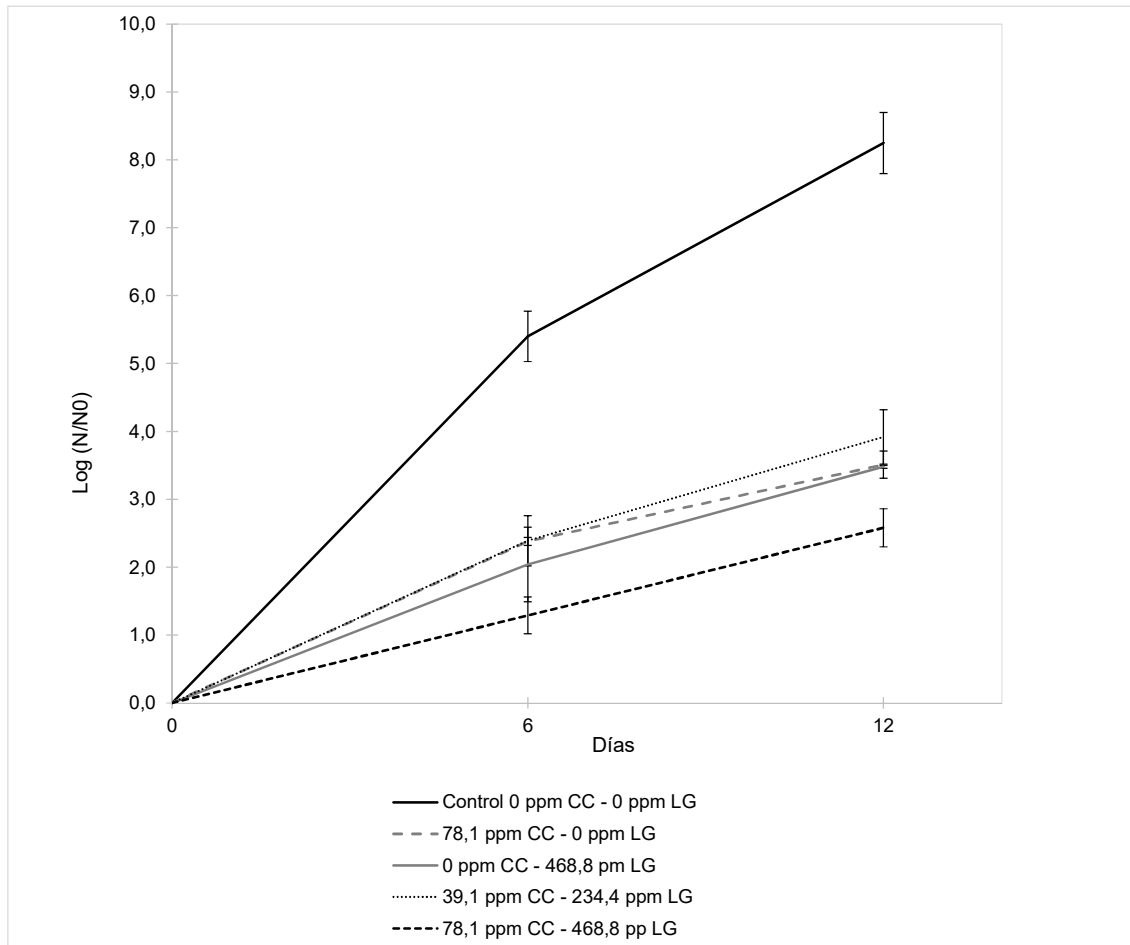


Figura III.10 Log N/N_0 de *Z. bailii* en jugo de yacón conteniendo combinaciones de nanoemulsiones de aceites esenciales de corteza de canela (CC) y de lemongrass (LG).

III.5. Evaluación sensorial de diferentes diluciones de jugo de yacón conteniendo la nanoemulsión de aceite esencial de lemongrass

La evaluación sensorial de las nanoemulsiones de LG y de CC en jugo de manzana dio como resultado que un nivel de 468,8 ppm de LG (MCI de LG en caldo) fue el más aceptado cuando fue diluido 1:4 para la elaboración del jugo de manzana comercial. Por lo tanto, este resultado fue considerado como referencia y se utilizó la MCI de LG en jugo de yacón como nivel máximo de LG a utilizar para elaborar un jugo de yacón que será diluido antes de su consumo. Por ello, se evaluó la aceptabilidad

global y la preferencia de varias diluciones del jugo de yacón conteniendo 937,5 ppm ppm de LG y 20,0% m/m de xilitol.

Los puntajes de aceptabilidad global de los jugos estuvieron en un amplio rango. En la Figura III.11 (Panel A) se muestran los valores promedio de la aceptabilidad global de las diluciones del jugo. El jugo más diluido (dilución 1/4) tuvo el puntaje más alto de aceptabilidad global (5,68) y estuvo entre la evaluación "no me gusta ni me disgusta" y "me gusta ligeramente", lo sigue la dilución intermedia (dilución 1/3) con una puntuación promedio de 5,45 y por último, el jugo diluido al medio con la menor puntuación de 4,66. No hubo diferencias significativas entre las dos diluciones mayores ($p < 0,05$), las cuales fueron diferentes a la menor dilución. Estos resultados están en concordancia con los del test de preferencia (Figura III.11, Panel B), el cual mostró que el 46,3% de los consumidores prefirió el jugo más diluido, seguido por el jugo diluido en 1/3 (28,8%) y el menos diluido (25,0%). Algunos jueces comentaron que las muestras con mayor concentración de aceite presentaban un sabor amargo y algo picante o astringente, con un aroma muy intenso. También, comentaron haber elegido el orden de preferencia según el dulzor de las muestras. A pesar de la intensidad del sabor, en general, se percibió el sabor cítrico o alimonado como agradable.

Por otra parte, se determinó el índice de aceptación de las muestras a través del cálculo del porcentaje de consumidores que evaluaron los jugos con una puntuación mayor o igual a 6. Al respecto se obtuvo el mayor porcentaje de los consumidores para las diluciones 1/3 y 1/4, es decir, que el 52,5% y el 57,5% de los consumidores calificaron el jugo diluido en un 1/3 y en 1/4, respectivamente, con 6 o más, mientras que sólo el 35,0% para la menor dilución (Figura III.11, Panel C).

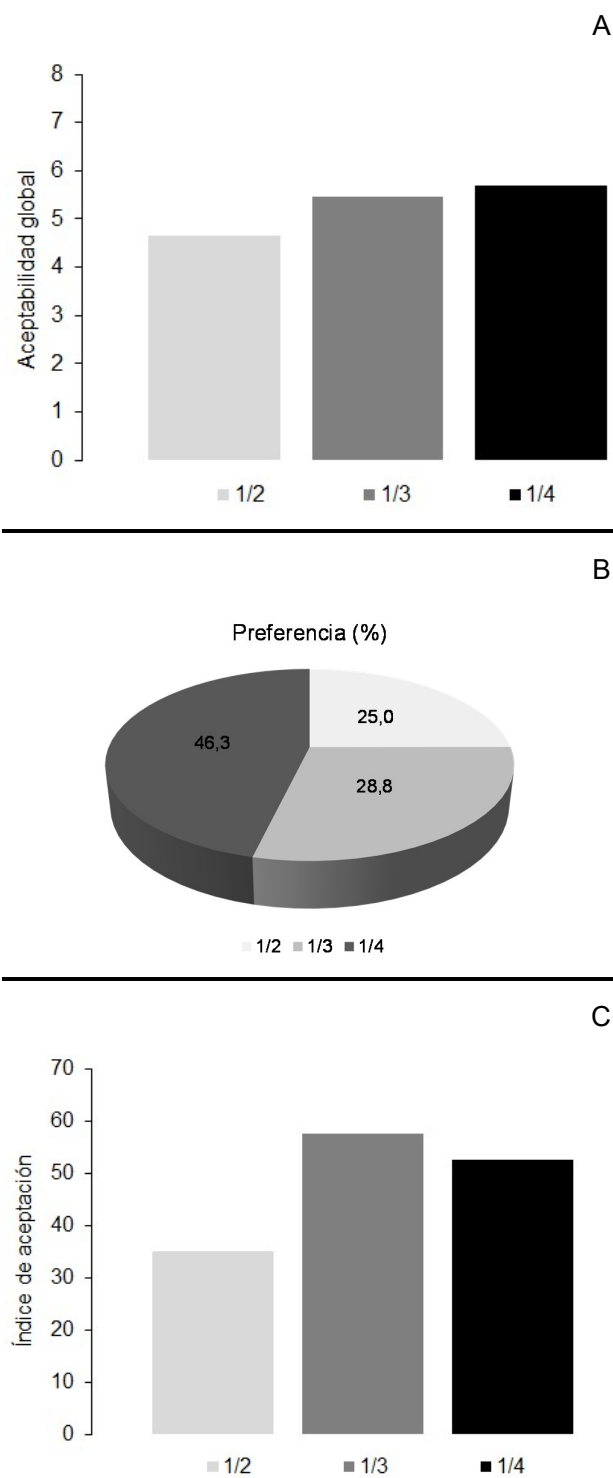


Figura III.11 Evaluación sensorial de muestras jugo de yacón conteniendo 937,5 ppm de nanomeulsión de LG y 20,0% de xilitol, diluidas al 1/4, al 1.3 y al 1/4. Panel A: Aceptabilidad global. Panel B: Test de Preferencia. Panel C: Índice de aceptación de los jugos con puntuaciones maoyor a 6 (“me gusta ligeramente”).

Al igual que se observó en el análisis sensorial del jugo de manzana (Sección II.5), la dilución del jugo, que contiene un nivel de nanoemulsión de LG efectivo desde el punto de vista microbiológico, es necesaria para reducir su impacto sensorial. En la evaluación sensorial de jugo de ananá conteniendo 0,1; 0,2 y 0,3 % v/v de LG, Celina y col. (2018) observaron valores decrecientes del gusto, el retrogusto y la aceptación global del jugo a medida que aumentaba la concentración de LG. Al igual que observamos en el presente trabajo, obtuvieron comentarios de varios jueces describiendo que la adición de LG aporta sabor picante y amargo al jugo.

Cuando se utilizó una nanoemulsión de LG al 1,25% m/m en un recubrimiento para peras para prolongar su vida útil, Gago y col. (2020) observaron, después de seis meses de almacenamiento en frío, que las peras tuvieron una vida útil de 7 días (22°C y 70% HR) y que la apariencia (primer atributo para la decisión de compra de los consumidores) fue superior a la del control. Las peras recubiertas con la nanoemulsión de LG obtuvieron una puntuación más alta en el gusto general y las peras sin recubrimiento fueron menos apreciadas en textura, dulzura y acidez. Además, el aroma no fue afectado por los recubrimientos, siendo el tratamiento con 1,25% de LG algo mejor apreciado que los otros tratamientos (2,5% de LG y 1 y 2% de citral).

Si bien el objetivo inicial del trabajo era formular un jugo de yacón conteniendo aceites esenciales en niveles con actividad antimicrobiana, los resultados indicaron que el nivel de LG como preservador supera el aceptado por los consumidores. Es por ello que se planteó la formulación del jugo con la finalidad de diluirlo antes de su consumo, formando así un “agua de yacón”. Sin embargo, para asegurar la estabilidad microbiológica del jugo formulado, se estudió el almacenamiento a baja temperatura, además de la presencia de LG, como barrera adicional, según se muestra en la siguiente sección.

III.6. Efecto de la temperatura de almacenamiento y de la presencia de la nanoemulsión de lemongrass sobre el desarrollo de *Z. bailii* en jugo de yacón

Para lograr una formulación de un jugo de yacón sensorialmente aceptable y microbiológicamente estable, se decidió continuar sólo con el LG trabajando con la MCI. Sin embargo, como se observó que sensorialmente no fue aceptable a ese nivel de LG, se agregó otra barrera más para su conservación que fue la temperatura de

almacenamiento. Para ellos se seleccionaron dos temperaturas: una de refrigeración a 5°C y una temperatura de 15 °C, simulando una contaminación posterior al proceso o un almacenamiento a una refrigeración inadecuada.

En ausencia de LG y a 15°C, el desarrollo de la levadura fue significativo, observándose un crecimiento exponencial de hasta 6 ciclos log al final del almacenamiento (Figura III.12). Cuando se utilizó la temperatura de refrigeración de 5°C como única barrera de conservación, se observó un bajo y estable crecimiento de la levadura, que podría deberse al efecto bacteriostático de la temperatura de refrigeración. A ambas temperaturas de almacenamiento, la adición de LG redujo la población inicial de la levadura hasta los 14 días de almacenamiento a 15°C y hasta los 28 días a 5°C. La presencia de LG y la refrigeración a 5°C fue la combinación que más redujo el crecimiento de la levadura alcanzando una reducción de 1,3 ciclos log respecto del inóculo inicial.

Estos resultados permiten concluir que un jugo de yacón conteniendo 937,5 ppm de la nanoemulsión de LG y 20,0% m/m de xilitol tendría una vida útil de hasta 28 días si se almacena a 5°C. Además, una preparación de un agua de este jugo (“agua de yacón”) mediante una dilución acuosa de 1/3 o 1/4, podría consumirse si se elabora en el momento ya que tuvo una aceptabilidad de alrededor de 55% de los consumidores. En la Figura III.13 se muestra el jugo de yacón formulado.

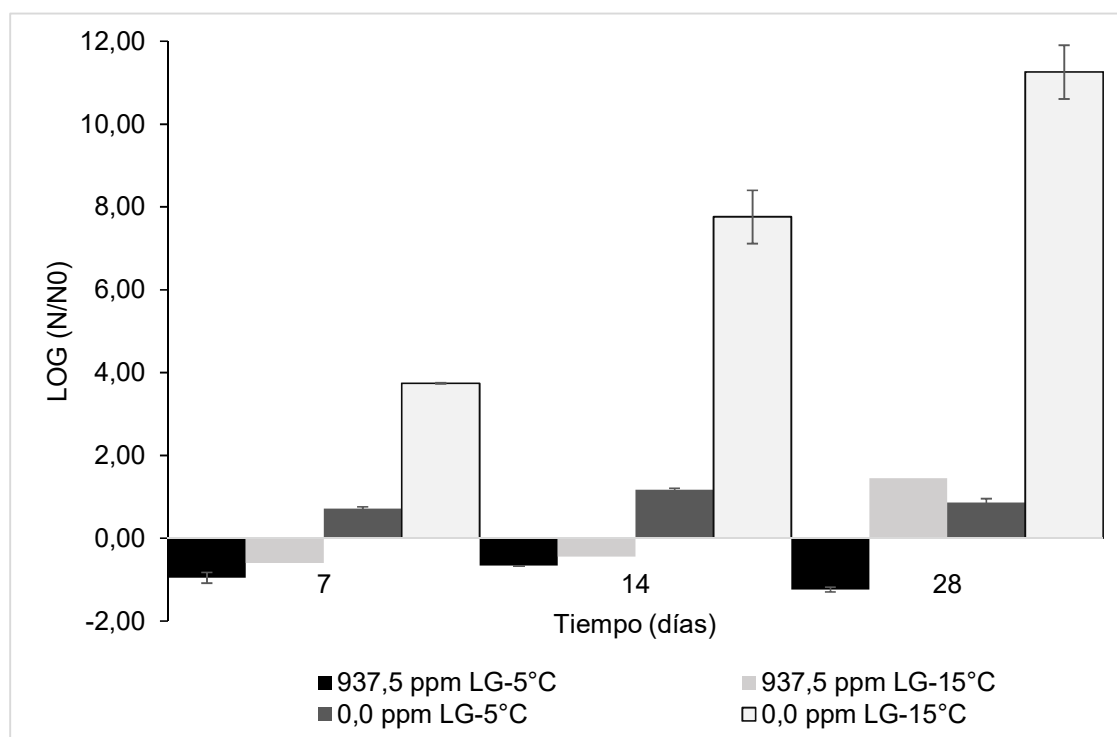


Figura III.12 Efecto de la temperatura de almacenamiento y de la presencia de 937,5 ppm de la nanoemulsión de lemongrass (LG) sobre el crecimiento de *Z. bailii* a dos temperaturas de almacenamiento: 5 y 15°C (5, 15). Las barras verticales representan la desviación estándar de los promedios.



Figura III.13 Jugo de yacón conteniendo 937,5 ppm de nanoemulsión de lemongrass y 20,0% de xilitol.

III.7. Aprovechamiento del residuo de la elaboración del jugo de yacón como crioprotector de cepas de interés industrial

Como se mencionó en la Introducción, las raíces de yacón tienen una larga historia de uso en Sudamérica y en otros lugares, y tienen propiedades potencialmente benéficas para la salud, incluidos efectos prebióticos, antidiabéticos, antioxidantes y antimicrobianos (Ojansivu y col., 2011). La mayoría de estos efectos se han atribuido a su contenido de compuestos fenólicos, antioxidantes y su alto contenido en fructooligosacáridos que funcionan como prebióticos (FOS). El bagazo de yacón es el subproducto de la extracción del jugo que posee altos niveles de FOS y de fibra incluso después de la deshidratación. Estos compuestos resultan de interés en procedimientos de secado spray y liofilización de células microbianas en los que se utilizan como sustancias protectoras (Foerst y Santivarangkna, 2014).

Con el fin de realizar un aprovechamiento integral del yacón, en este trabajo se evaluó la factibilidad de uso del bagazo liofilizado de yacón, residuo obtenido de la elaboración del jugo, como sustancia crioprotectora para la liofilización de la cepa funcional *Lactobacillus sakei* ACU-16. Tanto para su uso como cultivo protector en productos alimenticios o como cultivo adjunto en la producción de otros alimentos, *Lb sakei* ACU-16 debe ser conservado adecuadamente a fin de asegurar el suministro a la industria.

El análisis del diseño mostró una influencia significativa del medio de liofilización sobre la TS, mientras que el tiempo de almacenamiento y la interacción de los factores no afectaron la respuesta (Tabla III.7).

Tabla III.7. Análisis del diseño factorial ensayado. Factores: medio de liofilización y tiempo de almacenamiento.

<i>Fuente de variación</i>	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F	<i>p</i> -valor
Efectos principales	1315,20	2	657,60	51,21	0,0002
Medio de liofilización tiempo	47,40	1	47,40	3,69	0,1031
Interacción Medio x Tiempo	46,48	2	23,23	1,81	0,2426
Residuos	77,04	6	12,41		
Total	1486,14	11			

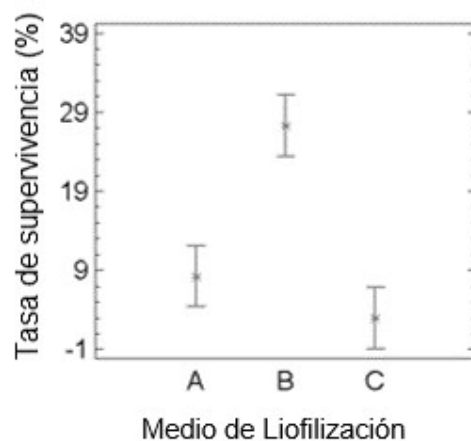


Figura III.14. Tasa de supervivencia (%) de *Lactobacillus sakei* en función del medio de liofilización a base de yacón (A, B o C). Para la preparación de los medios se partió de suspensión acuosa de bagazo (10% m/v). Medio A: porción de suspensión esterilizada a 121°C durante 15 minutos; Medio B: sobrenadante libre de sólidos obtenido luego de la centrifugación de una porción de suspensión esterilizada por filtración. Medio C: agua destilada.

La TS fue significativamente más alta en presencia en los medios A ($8,23 \pm 2,47$ %) y B ($27,3 \pm 7,0$ %) que en agua destilada ($2,92 \pm 0,76$ %) evidenciando un efecto protector de las sustancias presentes en los residuos de yacón (Figura III.14). Sin embargo, la presencia de residuos sólidos en el medio de liofilización afectó negativamente el efecto protector.

No se detectaron variaciones significativas en la TS después de 45 días de almacenamiento sugiriendo una buena estabilidad del liofilizado en el tiempo (efecto no significativo del tiempo ni de la de la interacción con el medio de liofilización). Por ende, tanto el estudio como el aprovechamiento del bagazo generado merecen ser abordados en pos de una futura industrialización.

Campos y col. (2012) descubrieron que la de harina de yacón como alimento de ratas promovió el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos y estimularon el sistema inmunológico intestinal. Parra y col. (2012) elaboraron un yogur adicionado con un concentrado de yacón, que arrojó mayores valores de fibra dietaria total que el yogur control en el análisis nutricional. Castro y col. (2013) hallaron un mayor valor de lignina (fibra insoluble) en yacón que en zanahoria: 1,1g/100g de materia seca y 0,90% base seca, respectivamente. Si bien sólo la fibra dietaria soluble resulta fermentable por la microbiota (microbios que habitan en los intestinos), activando el crecimiento de

microorganismos como *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* (baterias probióticas) (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006), la fibra insoluble presente retiene el agua en su matriz estructural, produciendo una aceleración el tránsito intestinal. Esto contribuye a disminuir la concentración y el contacto con potenciales carcinógenos por parte de la mucosa del colon; además, es utilizada en tratamientos y prevención de constipación crónica (Kim, 2000).

Los resultados de este trabajo demuestran que este subproducto de yacón posee características adecuadas para su aplicación en los procesos de crioconservación de cepas de bacterias lácticas de interés industrial.

III.8. Determinación de la composición nutricional, polifenoles totales y capacidad antioxidante del jugo de yacón

III.8.1. Propiedades nutricionales

La composición nutricional del jugo de yacón formulado se muestra en la Tabla III.8. Los valores obtenidos de humedad concuerdan con lo informado en bibliografía ya que, en general, el porcentaje de agua en el tubérculo excede el 70% (Lachman y col., 2003) y en jugo se encontraron valores en el rango de 78-80% (Manrique y col., 2003) y de 87,55% (Dionisio y col., 2013).

El bajo contenido de proteínas y lípidos obtenidos para el jugo está en concordancia con los valores informados para productos derivados de yacón. Rivera y Manrique (2005) reportaron entre 0,5-0,6g de proteínas y 0 g de grasas cada 100 ml de jugo de yacón, valores similares a los encontrados por Dionisio y col. (2013) siendo 0,22% para proteínas y 0,03% para lípidos en jugo de yacón. Gomes da Silva y col. (2017) caracterizaron un jarabe de yacón para adicionar a un yogur y los valores obtenidos de proteínas y de lípidos fueron de 1,61 g y 0,07 g cada 100 g de jarabe, respectivamente.

Tabla III.8. Composición nutricional del jugo de yacón conteniendo 20,0% m/m de xilitol y 937,5 ppm de nanoemulsión de lemongrass.

Composición	Jugo
Proteínas (%)	0,26 ± 0,10
Lípidos (%)	0,27 ± 0,05
Humedad (%)	70,34 ± 0,01
Cenizas (%)	0,30 ± 0,01
Fibra dietaria total (%)	18,03 ± 0,01
FOS	16,93 ± 0,03
Fibra dietaria insoluble	1,10 ± 0,03
Hidratos de carbono (%)	10,80 ± 0,01
Polifenoles Totales (mg de ácido gálico/g de jugo)	1,31 ± 0,03
Capacidad antioxidante (%de inhibición de DPPH)	78,24 ± 0,86

La fibra dietaria total, que incluye la fibra soluble (FOS) y la insoluble, está constituida principalmente por la fibra soluble, ya que en la elaboración del jugo se eliminó toda la cáscara del tubérculo. Los FOS son el principal compuesto bioactivo de las raíces de yacón, siendo reconocido en la literatura científica por sus propiedades funcionales, como lo son sus efectos prebióticos (Dionisio y col., 2015). El valor de FOS del jugo formulado se encuentra en concordancia con los valores reportados en bibliografía. Rivera y Manrique (2005) encontraron valores de oligofructosa (fibra soluble) entre 10 y 13 g cada 100 g de jugo. Los valores obtenidos de FOS para un jarabe de yacón fueron cercanos a 22% (Silva y col., 2017). Con respecto al contenido de hidratos de carbono, el valor obtenido es coincidente con lo reportado por Rivera y Manrique (2005) para jugo de yacón (entre 7 y 10 g de azúcares simples en 100ml de jugo).

En general, la composición nutricional del jugo puede variar mucho, dependiendo del cultivar de yacón usado como materia prima y del tiempo de poscosecha de las raíces.

III.8.2. Polifenoles totales y capacidad antioxidante

El contenido de polifenoles totales del jugo formulado tuvo un valor promedio de 1,31 mg de gálico/g jugo y la capacidad antioxidante fue de 78,24%.

Los valores de polifenoles totales ensayados en distintas variedades de yacón por Campos y col. (2012), estuvieron en el rango de 0,9 a 3,3 mg de equivalentes de ácido clorogénico (EAC)/g de raíz seca. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que muestran que el contenido de polifenoles totales para las raíces de yacón está alrededor de 38 mg de ácido clorogénico/g raíz seca (Yan y col., 1999), y 5,7-3,5 mg de equivalente de ácido gálico / g raíz seca (Simonovska y col., 2003). En general, encontraron una alta correlación entre capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales lo que podría indicar que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la capacidad antioxidante de las raíces de yacón (Campos y col., 2006).

Campos y col. (2012), reportaron valores de capacidad antioxidante para 35 variedades de yacón que oscilaron entre 23 y 136 μmol equivalente trolox/g de raíz seca. Estudios previos reportaron valores de capacidad antioxidante 1,25 μmol equivalente trolox/g de raíz fresca para raíces de yacón cuantificada mediante el ensayo DPPH (Mikami y col., 2009). Resulta difícil comparar numéricamente los resultados encontrados en este trabajo con los de bibliografía ya que la determinación realizada sólo permite comparar entre muestras que se analizaron con la misma metodología.

La capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales obtenidos en el jugo puede ser mayor que en el jugo recién elaborado sin el agregado de LG ya que este aceite contiene compuestos antioxidantes (Anggraeni y col., 2018). Sánchez-Rubio y col. (2016) observaron un cambio de color (de marrón claro a rojo) del jugo de granada conteniendo AE de hojas de canela que podría deberse a la actividad antioxidante del aceite aportada por la presencia de sus compuestos fenólicos, entre ellos, el eugenol.

III. Conclusiones

El tratamiento térmico de 90°C por 60 segundos fue efectivo para asegurar la estabilidad microbiológica del jugo de yacón, sin afectar significativamente sus propiedades fisicoquímicas.

El tratamiento térmico y el envasado al vacío fueron suficientes para evitar el desarrollo de pardeamiento en el jugo mientras que el agregado de ácido ascórbico no fue determinante.

El tratamiento térmico afectó la actividad antimicrobiana de la nanoemulsión de CC y no afectó a la de LG. Esto resulta de interés a la hora de pensar, por un lado, el orden de agregado de las nanoemulsiones como conservantes naturales durante la elaboración del jugo para facilitar su industrialización, y por otro, el control de la temperatura durante el proceso de ultrasonificación para la elaboración de las nanoemulsiones ya que, en el caso de CC, un aumento de la temperatura podría afectar su actividad antimicrobiana.

Las MCIs de las nanoemulsiones de LG y CC en el jugo fueron mayores que en caldo y no se vieron afectadas por el agregado de 20,0% de xilitol, al igual que se observó en caldo.

Se encontraron dos combinaciones sinérgicas de la combinación de las nanoemulsiones de ambos aceites sobre la inhibición del crecimiento de *Z. bailii* en el jugo de yacón, las cuales fueron independientes de la presencia de xilitol. Sin embargo, la adición de CC no afectó la reducción del crecimiento producida por la presencia de 468 ppm de LG.

El jugo de yacón conteniendo la nanoemulsión de LG en un nivel efectivo desde el punto de vista microbiológico (937,5 ppm), debió ser diluido en 1/3 ó 1/4 para que sea sensorialmente aceptable.

Para asegurar la estabilidad microbiológica del jugo formulado, se estudió el factor temperatura como barrera adicional al agregado de la nanoemulsión de LG. La temperatura de almacenamiento a 5°C y la presencia de 937,5 ppm de nanoemulsión de LG fueron suficientes para reducir la contaminación por *Z. bailii* del jugo por al menos 28 días. En presencia de LG y a una temperatura de 15°C, el recuento inicial de la levadura se redujo hasta los 14 días de almacenamiento, por lo tanto la presencia de LG podría ser útil para conservar el jugo si la cadena de refrigeración se viese alterada o si el equipo utilizado para la refrigeración tuviera un mal funcionamiento.

Si bien el jugo de yacón se presume como un alimento funcional y de amplia aplicación en la industria alimenticia, su extracción es de un rendimiento promedio de 57,24%. Por ende, tanto el estudio como el aprovechamiento del bagazo generado merecen ser abordados en pos de una futura industrialización. El subproducto de yacón obtenido posee características adecuadas para su aplicación en los procesos de crioconservación de cepas de bacterias lácticas de interés industrial.

La capacidad antioxidante, el contenido de polifenoles y el alto contenido de fibra soluble del jugo de yacón formulado resultan de interés ya que aportan beneficios nutricionales a la hora de consumir el jugo con aceite esencial de lemongrass como conservante.

Estos resultados permiten concluir que un jugo de yacón conteniendo 937,5 ppm de la nanoemulsión de LG y 20,0% m/m de xilitol tendría una vida útil de hasta 28 días si se almacena a 5°C. Una preparación de un agua de este jugo ("agua de yacón") mediante una dilución acuosa de 1/3 ó 1/4, podría consumirse ya que fue aceptado por alrededor del 55% de los consumidores.

Conclusiones generales

En el presente trabajo se evaluó la optimización microbiológica y sensorial del uso de aceites esenciales en la formulación de un jugo de yacón.

Los aceites de LG, CC, CH y M mostraron la mayor actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Z. bailii*, levadura deteriorativa de jugos. Por ello fueron seleccionados para elaborar nanoemulsiones y ensayarlas como soluciones madre de antimicrobianos.

Como emulsionante se utilizó Tween®80 en una proporción 1:3 (aceite: Tween®80) ya que fue el factor que determinó la mayor disminución en el tamaño de gota de las mismas.

La metodología utilizada para la elaboración de nanoemulsiones influyó en el tamaño de gota cuando se utilizan distintos equipos para su fabricación. Se lograron obtener nanoemulsiones estables sólo para CH con el homogeneizador de alta velocidad. Una ultrasonicación de 5,0 minutos fue suficiente para obtener nanoemulsiones de CC y LG y fueron necesarios 25,0 minutos de ultrasonicación para obtener una nanoemulsión estable de M. El aumento del tiempo de ultrasonicación no fue determinante para disminuir el tamaño de gota de las emulsiones.

Con el objetivo de lograr una formulación final de un jugo de yacón estable desde el punto de vista microbiológico, se estudiaron los ácidos cítrico y málico como acidulantes y el xilitol como depresor de la a_w y edulcorante. Se observó que ambos ácidos afectaron el crecimiento de *Z. bailii* en caldo. El ácido cítrico fue el que mostró mayor efectividad. El xilitol redujo la velocidad de crecimiento de la levadura, ya sea en ausencia como en presencia de ácidos, pero incrementó la población de la fase estacionaria. Probablemente, esto se deba a que se incremente la resistencia de la célula por su adaptación al descenso de la a_w durante la fase de crecimiento.

Las nanoemulsiones mostraron una acción antimicrobiana frente al crecimiento de *Z. bailii* en caldo Sabouraud a pH 4,00 ajustado con cítrico, mostrando MCIs entre 156,3 y 1250,0 ppm, dependiendo del aceite esencial. El aumento en el tiempo de ultrasonicación produjo un ligero aumento del crecimiento. Se observó una interacción aditiva entre las nanoemulsiones de LG y CC frente al crecimiento de *Z. bailii* en ausencia de xilitol e interacciones sinérgicas en presencia del polirol. La actividad antifúngica de las nanoemulsiones de LG, CC y CH se atribuyó a la presencia de citral, trans-cinamaldehído y eugenol por ser sus componentes principales, respectivamente. Estos aceites produjeron cambios en la hidrofobicidad de la membrana celular.

Estos resultados permitieron realizar una preselección de los aditivos para la formulación del jugo de yacón. Por lo tanto, se seleccionó el ácido cítrico como acidulante

para disminuir el pH a 4,00, una concentración de 20,0% de xilitol como edulcorante y reductor de la a_w y las nanoemulsiones de CC y de LG como preservadores.

Se elaboró el jugo de yacón y se observó que el tratamiento térmico a 90°C por 60 segundos fue efectivo para asegurar la estabilidad microbiológica del jugo de yacón.

El agregado de ácido ascórbico no fue determinante para inhibir el pardeamiento enzimático del jugo siendo suficientes la aplicación del tratamiento térmico, el envasado al vacío y la reducción del pH a 4,00 para inhibir el desarrollo de pigmentos pardos.

El tratamiento térmico afectó la actividad antimicrobiana de la nanoemulsión de CC y no afectó a la de LG. Esto resulta de interés a la hora de pensar en, por un lado, el orden de agregado de las nanoemulsiones en la elaboración del jugo, y por otro, el control de la temperatura durante el proceso de ultrasonicación para la elaboración de las nanoemulsiones.

Las MCIs de las nanoemulsiones de LG y de CC en jugo de yacón fueron el doble de las observadas en caldo y no se vieron afectadas por el agregado de 20,0% de xilitol. Se encontraron dos combinaciones sinérgicas de las nanoemulsiones sobre la inhibición del crecimiento de *Z. bailii* en el jugo de yacón, las cuales fueron independientes de la presencia de xilitol. Sin embargo, la adición de CC no afectó la reducción del crecimiento producida por la presencia de 468 ppm de LG. Por otra parte, se observó que jugos de manzana conteniendo la nanoemulsión de CC o mezcla de ambas nanoemulsiones fueron sensorialmente menos aceptables que el jugo conteniendo nanoemulsión de LG. Estos resultados permitieron seleccionar sólo la nanoemulsión de LG como preservador en la formulación final del jugo.

El jugo de yacón conteniendo la nanoemulsión de LG en un nivel efectivo desde el punto de vista microbiológico (937,5 ppm), debió ser diluido en 1/3 ó 1/4 para que sea sensorialmente aceptable.

El almacenamiento a 5°C y la presencia de 937,5 ppm de nanoemulsion de LG fueron suficientes para reducir la contaminación por *Z. bailii* del jugo por al menos 28 días.

El bagazo de yacón, resultante de la elaboración del jugo posee características adecuadas para su aplicación en los procesos de crioconservación de cepas de bacterias lácticas de interés industrial.

Por lo tanto, se elaboró una nanoemulsión de LG estable que puede utilizarse como preservador en la formulación del jugo de yacón en un nivel de 937,5 ppm. Además, el jugo

formulado contiene 20,0% m/m de xilitol y pH 4,0 ajustado con ácido cítrico. Este jugo tendría una vida útil de hasta 28 días si se almacena a 5°C y podría diluirse en el momento de su consumo (“agua de yacón”) para ser sensorialmente aceptable. La capacidad antioxidante, el contenido de polifenoles y el alto contenido de fibra soluble del jugo de yacón formulado resultan de interés ya que aportan beneficios nutricionales a la hora de su consumo.

En general, los resultados obtenidos destacan la importancia de considerar los diferentes efectos que los ingredientes pueden ejercer sobre el crecimiento de *Z. bailli* y sobre la estabilidad de jugo de yacón. La composición del sistema, el emulsificante utilizado para elaborar las nanoemulsiones, la presencia de estabilizantes, de humectantes, de antimicrobianos y la interacción entre ellos, son factores que deben estudiarse a fin de lograr nanoemulsiones estables para agregar a jugos. El estudio del efecto de diversos ingredientes y aditivos sobre la estabilidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial de jugos contribuye con la optimización de sus formulaciones, con la factibilidad de la incorporación de aditivos naturales o de combinaciones adecuadas de aditivos, buscando en todos los casos mejorar la calidad de estos alimentos.

Referencias

- Abbas S, Hayat K, Karangwa E, Bashari M y Zhang X. (2013). An overview of ultrasound-assisted food-grade klangnanoemulsions. *Food Engineering Reviews* 5(3): 139–157.
- Abdulazeez, M.A., Abdullahi, A.S y James, B. (2016). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, San Diego, Estados Unidos.
- AOAC International: *Official Methods of Analysis*. (2000). 17ª edición. Gaithersburg, Estados Unidos.
- Aken, G.A.V. (2004). Coalescence Mechanisms in Protein Stabilized Emulsions. *Food Emulsions*. 8, 299-325. Marcel Dekker Inc., Nueva York, Estados Unidos.
- Akoh, C.C. y Min, D.B. (2008). *Food lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, CRC Press, Estados Unidos.
- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A. y Ramos, J. (2000). Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 191–197.
- Alzamora, S.M., Guerrero, S., Raffellini, S., Ferrario, M. y Schenk, M. (2015). Hurdle technology in fruit processing. *Advances in Postharvest Biology and Technology of Horticultural Crops*. Apple Academic Press, Canadá y CRC Press, Florida, Estados Unidos.
- Anggraeni, N. I., Hidayat, I. W. y Rachman, S. D. (2018). Bioactivity of essential oil from lemongrass (*Cymbopogon citratus Stapf*) as antioxidant agent. *AIP Conference Proceedings* 1927, 030007.
- Anton, M., Beaumal, V., Brossard, C., Llamas, G. y LeDenmat, M. (2002). Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. *Food emulsions and dispersions*. Anton, M. Kerala, India: Research Singpost, 15-28.
- Arias, C., Burns, J., Friedrich, L., Goodrich, R., y Parish, M. (2002). Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1955–1961.
- Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.H.A., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R. y Elaissari, A. (2015). Essential oils: from extraction to encapsulation. *International Journal Pharmaceutical*, 483: 220–243.
- Augustin, J.C., Rosso, L. y Carlier, V. (1999). Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of microbiological methods*, 38(1), 137-146.
- Bas, D y Boyaci IH. (2007). Modeling and optimization Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78: 836–845.
- Baranyi, J. y Pin, C. (1999). Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 732-736
- Bassolé, I. H. N. y Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- Baty, F. y Delignette-Müller, M.L. (2004). Estimating the bacterial lag time: which model, which precision?. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 261-227.

- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J.D., Labadie, J.C. y Lebert, A. (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 25(3), 225-232.
- Besse, N.G., Audinet, N., Barre, L., Cauquil, A., Cornu, M. y Colin, P. (2006). Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. *International Journal of Food Microbiology*, 110(1), 43-51.
- Biesta, Peters E.G., Reij, M.W., Joosten, H., Gorris, L.G.M. y Zwietering, M.H. (2010). Comparison of two optical-density-based methods and a plate count method for estimation of growth parameters of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:1399–1405.
- Blocher, J.C. y Busta, F.F. (1985). Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate. *Journal of Applied Bacteriology*, 59, 467-478.
- Bracey, D., Holyoak, C.D. y Coote, P.J. (1998). Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH. *Journal of Applied Microbiology*, 85(6), 1056-1066.
- Braga, P., Sasso, M., Culici, M., Alfieri, M., (2007). Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoterapia* 78, 396–400.
- Buchanan, R.L. y Cygnarowicz, M.L. (1990). A mathematical approach towards defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiology*, 7, 237-240.
- Buranasuksombat U, Kwon YJ, Turner M, Bhandari B. (2011). Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. *Food Science Biotechnology*, 20: 793–800.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Campos, D., Betalleluz-Pallardel, I., Chirinos, R., Aguilar-Galvez, A., Noratto, G. y Pedreschi, R. (2012). Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135(3), 1592–1599.
- Campos, D., Betalleluz, I., Tauquino, R., Chirinos, R. y Pedreschi, R. (2009). Nutritional and functional characterisation of Andean chicuru (*Stangea rhizanta*). *Food Chemistry*, 112, 63–70.
- Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., Arbizu, C., Roca, W. y Cisneros-Zevallos, L. (2006). Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum sp.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavon*), oca (*Oxalis tuberosa Molina*) and ulluco (*Ullucus tuberosus Caldas*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1481–1488.
- Casal, M., Paiva, S., Queirós, O., y Soares-Silva, I. (2008). Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS microbiology reviews*, 32(6), 974-994.
- Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., y Campos, C. A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat science*, 87(4), 321-329.

- Castro A., Vilaplana F. y Nilsson. L. (2017). Characterization of a water soluble, hyperbranched arabinogalactan from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots. *Food Chemistry*, 223, 76-81.
- Cava, R., Nowak, E., Taboada, A. y Marin-Iñiesta, F. (2007). Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of Food Protection* 70, 2757–2763.
- Celina A., Rahmawatia D. y Permana T. (2018). Application of Lemongrass Essential Oil as a Natural Preservative Agent for Pineapple Juice. *Proceeding of the International Conference on Innovation, Entrepreneurship and Technology*, ISSN: 2477-1538.
- Chanamai, R. y McClements, D. J. (2001). Depletion flocculation of beverage emulsions by gum arabic and modified starch. *Journal of Food Science*, 66(3), 457-463.
- Chang Y., McLandsborough, L. y McClements, D. J. (2012). Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: Influence of ripening inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(48), 12056-12063.
- Conner, D. y Beuchat, L. R. (1984). Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, 49(2), 429-434.
- Dalgaard, P. (1995). Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), 305-317.
- Dalgaard, P. y Koutsoumanis. K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43:183-196.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K. y McMeekin, T.A. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 391-404.
- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70(3), 54-66.
- Deak, T. (2008). Yeasts in Specific Types of Foods. Deak T y Beuchat LR (Eds.). *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. Boca Ratón: CRC Press, 117–201.
- Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A. C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., Cates M.E. y Bibette, J. (2011). How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir*, 27(5), 1683-1692.
- Dickinson, E. (1992). *An Introduction to Food Colloids*, Oxford University Press, Editorial Oxford-Reino Unido.
- Dickinson, E. (2006). Colloid science of mixed ingredients. *Soft Matter*, 2, 642–652.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23, 1473–1482.
- Dima C y Dima S. (2015). Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5: 29–35.
- Dionisio A.P., Wurlitzer N.J., Vieira N. M., Goes T. S., Girao Modesto A. L. y Araújo I.M. (2013). Raiz Tuberosa de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): Obtenção de Extrato com Manutenção das suas Propriedades Nutricionais e Inativação de Enzimas de Escurecimento. *Comunicado Técnico* 206. Embrapa.

- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. y Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2745-2749.
- Donsi, F. (2018). Application of nanoemulsions in foods. *Nanoemulsions. Formulation, Applications, and Characterization*. Academic Press, San Diego, Estados Unidos.
- Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M. y Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1908-1914.
- Donsi F, Annunziata M, Vincenzi M, Ferrari G. (2012). Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology*, 159: 342-350.
- Doores, S. (2005). Organic acids. *Food Science and Technology. Antimicrobials in Food*, Third Edition.
- Eklund, T. (1989). Organic acids and esters. Mechanisms of action of food preservation procedures. Elsevier Applied Science. New York, Estados Unidos.
- Espinel-Ingroff, A. (1998). Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *Journal Clinical Microbiology*, 36:2950–2956.
- Espinosa Manfugás, J. (2007). Evaluación Sensorial. Editorial Universitaria, Ciudad de La Habana, Cuba.
- Evans, D.F. y Wennerstrom, H. (1994). The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet. VCH Publishers. New York, Estados Unidos.
- FAO Agricultural Services Bulletin (2001). Unit operations applied to juice. En Principles and practices of small - and medium - scale fruit juice processing. R.P. Bates, J.R. Morris y P.G. Crandall (Eds.). Florida, EEUU.
- Famworth, E.R., Lagacé, M. Couture, R., Yaylayan, V., y Stewart, B. (2000). Thermal processing, storage conditions, and the composition and physical properties of orange juice. *Food Research International*, 34, 25–30.
- FDA, 2006. Code of Federal Regulation 21,169-150. Available at <http://www.gpoaccess.gov/cfr/retrieve.html>
- Ford, L., Borwankar, R., Martin Jr., R.W y Holcomb, D.N. (1997). Dressing and sauces en Food Emulsions: Third edition, revised and expanded. Friberg, S.E y Larsson, K. New York: Marcel Dekker, Inc. 361-412.
- Francis, F. J.y Clydesdale, F. M. (1975). Food colorimetry: Theory and Applications. AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut.
- Freese, E., Sheu, C.W. y Galliers, E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, 321-325.
- Friedman, M., Kozukue, N. y Harden, L. A. (2000). Cinnamaldehyde content in foods determined by gas chromatography– mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5702-5709.

- Gago C., Antao R., Dores C., Guerreiro A., Miguel M.G., Fareiro M.L., Figueiredo A.C. y Antunes M.D., (2020). The Effect of Nanocoatings Enriched with Essential Oils on 'Rocha' Pear Long Storage. *MDPI Journal Foods* 9, 240.
- Ghosh, V., Mukherjee, A. y Chandrasekaran, N. (2013a). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 338-344.
- Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A. y Chandrasekaran, N. (2013b). Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(1), 114-122.
- Gliemmo, M.F. (2006). Estudio de las interacciones entre edulcorantes, preservadores e hidrocoloides: incidencia sobre la calidad de alimentos dietéticos. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Gliemmo, M.F., Campos, C.A. y Gerschenson, L.N. (2006). Effect of several humectants and potassium sorbate on the growth of *Zygosaccharomyces bailii* in model aqueous systems resembling low sugar products. *Journal of Food Engineering*, 77, 761-770.
- Gliemmo, M.F.; Latorre, M.E.; Gerschenson, L.N. y Campos, C.A. (2010). Effect of sweet solutes on the quality of a Pumpkin puree (*Cucurbita moschata Duchesne ex Poiret*) preserved by the hurdle technology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20(1):71-80.
- Gliemmo, M.F., Montagnani, M.A., Schelegueda, L.I., González, M.M. y Campos, C.A. (2015). Effect of xanthan gum, steviosides, clove, and cinnamon essential oils on the sensory and microbiological quality of a low sugar tomato jam. *Food Science and Technology International*.
- Gliemmo M.F., Schelegueda L.I., Gerschenson L.N. y Campos, C.A. (2013). Effect of aspartame and other additives on the growth and thermal inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in acidified aqueous systems. *Food Research International*, 53, 209-217.
- Goñi P., López P., Sánchez C., Gómez-Lus R., Becerril R. y Nerín C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116: 982-989.
- Gould, G.W., y Jones, M.V. (1989). Combination and synergistic effects. G.W. Gould (Ed.). *Mechanisms of action of food preservation procedures*, Elsevier Science Publishers Ltd, Essex, Gran Bretaña, pp. 401-421.
- Guerra-Rosas, M. I., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L. A., Salvia-Trujillo, L. y Martín-Belloso, O. (2016). Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 438-446.
- Hashtjin, A. M. y Abbasi, S. (2015). Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. *Food Hydrocolloids*, 44, 40-48.
- Hatcher, W.S., Weihe, J.L., Splittstoesser, D.F., Hill, E.C., and Parish, M.E. (1992). Fruit beverages. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, C. Vanderzant and D.F., American Public Health Association Washington, D.C., Estados Unidos.
- Helms, E. (2014). *Welcome to the juice generation. The juice generation. 100 recipies for fresh juices and superfood smoothies*. Simon and Schuster, Estados Unidos.
- Hiemenz, P.C. (1986). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker, New York, Estados Unidos.

- Hili, P., Evans, C. S. y Veness, R. G. (1997). Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in applied microbiology*, 24(4), 269-275.
- Holyoak, C.D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M.B., Crimmins, K., Brown, A.J.P. y Coote, P. (1996). Activity of the plasma-membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth in the presence of the weak acid preservative sorbic acid. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 3158-3164.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. y Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12.
- Hunt, R. W. (1975). A brief look back. *Color Research & Application* 16(1): 57-60.
- Israelachvili, J. N. (1992). *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Jenkins, P., Poulos, P.G., Cole, M.B., Vandeven, M.H. y Legan, J.D. (2000). The boundary for growth of *Zygosaccharomyces bailii* in acidified products described by models for time to growth and probability of growth. *Journal of Food Protection*, 63 (2), 222–230.
- Jo, Yeon-Ji, Chun, Ji-Yeon, Kwon, Yun-Joong, Min, Sang-Gi, Hong, Geun-Pyo y Choi, Mi-Jung. (2015). Physical and antimicrobial properties of *trans*-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. *LWT Food Science and Technology*, 60, 444-451.
- Jones, A.A. (2000). Ambient-stable sauces and pickles. En: Man, C. M. D. and Jones, A. A. (Eds.). *Shelf-life evaluation of foods*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 211226.
- Karlberg, M., Thuresson, K. y Lindman, B. (2005). Hydrophobically modifiedethyl(hydroxyethyl)cellulose as stabilizer and emulsifying agent in macroemulsions. *Colloids and surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 262, 158-167.
- King, A. D., Jr. y L. C. Whitehand. 1990. Alteration of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heating media composition. *Journal of Food Science*. 55:830-832, 836.
- Klang, V., Matsko, N. B., Valenta, C. y Hofer, F. (2012). Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron*, 43(2-3), 85-103.
- Krebs, H.A., Wiggins, D., Sole, S. y Bedoya F. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemistry Journal* 214, 657-663.
- Lachman J, Fernández EC, Orsák M. (2003). Yacon (*Smallanthus sonchifolia*) chemical composition and use – A review. *Plant Soil Environ*. 2003; 49 (6): 283-290.
- Lawless, H. y Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food. Principles and practices*. Springer, New York, USA.
- Li J., L.A McLandsborough, The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. (1999). *International Journal of Food Microbiology*, 53, 2–3, 185-193.
- Lindsay, R.C. (1993). Aditivos alimentarios. En: O.R. Fennema. (Ed). *Química de los Alimentos*. Acribia. Zaragoza, España.
- Leistner, L. (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25, 151-158.

- Lenovich, L.M., Buchanan, R.L., Worley, N.J. y Restaino, L. (1988). Effect of solute type on sorbate resistance in *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Food Science*, 53(3), 914–916.
- Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C. F., Li, Y., Zhong, F. y Huang, Q. (2012). Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30), 7548e7555.
- Loeffler, M., Beiser, S., Suriyarak, S., Gibis, M. y Weiss, J. (2014). Antimicrobial Efficacy of Emulsified Essential Oil Components against Weak Acid–Adapted Spoilage Yeasts in Clear and Cloudy Apple Juice. *Journal of food protection*, 77(8), 1325-1335.
- Lopez Malo Vigil A, Palou E, Parish ME and Davidson PM. (2005). Methods for activity assay and evaluation of results. *Antimicrobials in Foods*. Boca Ratón: CRC Press, Estados Unidos.
- Loureiro V y Querol A. (2000). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology* 10: 356–365.
- Lu, W. C., Huang, D. W., Wang, C. C., Yeh, C. H., Tsai, J. C., Huang, Y. T. y Li, P. H. (2018). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *Journal of food and drug analysis*, 26(1), 82-89.
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. y Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), 3057-3064.
- Mahungu, S.M. y Artz, W.E., (2001). Emulsifiers. En: Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. y Thorngate III, J.H. Marcel Dekker, (Eds.). *Food Additives*, 2da Edición. New York, Estados Unidos.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms*. (Vol. 11). Upper Saddle River, N.J: prentice hall. Pág., 177.
- Martins, P., Sbaite, P., Benites, C.y Maciel, M. (2010). Thermal Characterization of Orange, Lemongrass, and Basil Essential Oils. *Chemical Engineering Transactions*, 24, 463-468.
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B. y Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: condensed matter*, 18(41), R635.
- Mattison, K., Morfesis, A., y Kaszuba, M. (2003). A primer on particle sizing using dynamic light scattering. Application Note, Malvern Instruments www.malvern.co.uk, 1-3.
- McClements, D.J. (1999). *Emulsion Stability. Food Emulsions. Principles, Practice, and Technics*. CRC Press, Boca Ratón, Estados Unidos.
- McClements, D.J. (2004a). *Food emulsions: Principles, practice and techniques*. CRC Press, Boca Ratón, Estados Unidos.
- McClements, D.J. (2004b). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 305-313.
- McClements, D.J. (2007). Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47,611–649.

- McClements, D.J. y Decker, E.A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogenous food systems. *Journal of Food Science*, 65, 1270-1282.
- McMeekin, T.A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D.S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D.A., Ross, T., Salter, M y Soontranon, S. (1997). Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerg. Infect. Dis.*, 3, 541-549
- Mikami, I., Yamaguchi, M., Shinmoto, H. y Tsushida, T. (2009). Development and validation of a microplate-based beta-carotene bleaching assay and comparison of antioxidant activity (AOA) in several crops measured by beta-carotene bleaching, DPPH and ORAC assays. *Food Science and Technology Research*, 15, 171–178.
- Miller, F., y Silva, C. (2012). Thermal treatment effects in fruit juices. *Advances in fruit processing technologies*. CRC Press, Florida, Estados Unidos.
- Ming, X., Daeschel, M.A., (1993). Nisin resistance of food-borne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 56, 944–948.
- Mirhosseini, H., Tan, C. P., Hamid, N. S. y Yusof, S. (2008a). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315(1-3), 47-56.
- Mirhosseini, H., Tan, C. P., Hamid, N. S. y Yusof, S. (2008b). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil on flavor release from diluted orange beverage emulsion. *Food Chemistry*, 107(3), 1161-1172.
- Mishra, A. K., Dubey, N. K. y Hindu, B. (1994). Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Applied and environmental microbiology*. 60 (4), 1101–1105.
- Molyneux P., 2004 The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. *Warasan Songkhla Nakharin*; 26 (2): 211-219.
- Monu, E. A., Techathuvanan, C., Wallis, A., Critzer, F. J. y Davidson, P. M. (2016). Plant essential oils and components on growth of spoilage yeasts in microbiological media and a model salad dressing. *Food Control*, 65, 73-77.
- Myers, D., (1988). *Surfactant Science Technology*. VCH Publishers, Weinheim.Alemania.
- Namiki, M. (1990). Antioxidant/antimutagens in food. *Food Science and Nutrition*, 29, 273–300.
- Neumann, S. M., Wittstock, N., van der Schaaf, U. S. y Karbstein, H. P. (2018). Interactions in water in oil in water double emulsions: Systematical investigations on the interfacial properties and emulsion structure of the outer oil in water emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 537, 524-531.
- O'Brien Nabors, L. (2002). Sweet choices: sugar replacements for foods and beverages. *Food technology*, 56 (7), 28–34, 45.
- Organización Panamericana de la Salud, 2020. Clasificación de los alimentos y sus implicaciones en la salud. Basado en el documento “Una nueva clasificación de los alimentos”, de Carlos Monteiro y Geoffrey Cannon, y col. Núcleo de Estudios Epidemiológicos

en Nutrición y Salud. Escuela de Salud Pública, Universidad de Sao Paulo, Brasil. Sintetizado y modificado por Manuel Peña, Representante de la OPS/OMS, Ecuador.

Ojansivu, I., Ferreira, C. L. y Salminen, S. (2011). Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(1), 40–46.

Organización Mundial de la Salud. (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO. En: <http://www.fao.org/3/a-ac911s.pdf>

Owen, R. J. y Palombo, E. A. (2007). Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. *Food Control*, 18(5), 387-390.

Piper, P., Calderon, C. O., Hatzixanthis, K. y Mollapour, M. (2001). Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, 147(10), 2635-2642.

Piper, P. W. (2011). Resistance of yeasts to weak organic acid food preservatives. *Advances in applied microbiology*, 77, 97-113.

Pitt, J.J., (1974). Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives. *Food Technology*. 26, 238-241.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic and Professional, Cambridge, Reino Unido.

Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D. (1999). *Microbiología*. McGraw-Hill, Interamericana, 500.

Presser, K.A., Ross, T., Ratkowsky, D.A., (1998). Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid and water activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 1773–1779.

Prior R.L, Wu X, Schaich K., (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agriculture and Food Chemistry*; 53(10): 4290-4302.

Pszczola, D.E. (2001). Salad Days Not for these dressings. *Food Technology*. 55, (4), 78-84.

Rajashekhara, E., Suresh, E. R. y Ethiraj, S. (1998). Thermal death rate of ascospores of *Neosartorya fischeri* ATCC 200957 in the presence of organic acids and preservatives in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 61(10), 1358-1362.

Rao, J., y McClements, D. J. (2011). Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 5026-5035.

Rasch, M. (2004). Experimental design and data collection. *Modelling Microbial Responses in Food*. CRC Series in Contemporary Food Science. CRC Press. 520-599.

Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B.K., Noci, F., y Koutchma, T. y Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactivecontent of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44, 1875–1887.

- Relkin, P. y Sourdlet, S. (2005). Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19, 503-511.
- Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P. y Barat, J. M. (2017). Application of cinnamon bark emulsions to protect strawberry jam from fungi. *LWT-Food Science and Technology*, 78, 265-272.
- Root, W., y Barrett, D (2005). Apples and apples processing. *Processing fruits. Science and Technology*, CRC Press, Florida, Estados Unidos.
- Rosenberg M., D. Gutnick, E. Rosenberg. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity, *FEMS Microbiology Letters*, 9, 1, 29–33.
- Russell NJ y Gould GW. (1991). *Food Preservatives*. Blackie y Son Ltd, Estados Unidos.
- Russell, A. D. (2005). Mechanisms of Action, Resistance, and Stress Adaptation, (1), 633–657.
- Saayman, M. y Viljoen-Bloom, M. (2006). The biochemistry of malic acid metabolism by wine yeasts—a review. *South african journal of enology and viticulture*, 27(2): 113-122.
- Salvia Trujillo, L., Rojas Graü, M.A., Soliva Fortuny R. y Martín Belloso O. (2013). Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of micro fluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 30, 401-407.
- Salvia Trujillo L, Rojas Grau MA, Soliva Fortuny R, Martín-Belloso O. (2014). Impact of micro fluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control*, 37:292-297.
- Sandrou, D.K. y Arvanitoyannis, I.S. (2000). Application of hazard analysis critical control point (HACCP) system to the cheese-making industry: a review. *Food Reviews International*, 16(3), 327-368.
- Sapers, G. M., Hicks, K. B y Miller, R. L. (2002). Antibrowning Agents, 543–561.
- Schelegueda, L. I., Gliemmo, M. F., y Campos, C. A. (2012). Antimicrobial synergic effect of chitosan with sodium lactate, nisin or potassium sorbate against the bacterial flora of fish. *Journal of Food Research*, 1(3), 272.
- Seow YX, Yeo CR, Chung HL, Yuk HG. 2014. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 54: 625–644.
- Sessa M., Ferrari G., Donsi F., 2015, Novel Edible Coating Containing Essential Oil Nanoemulsions to Prolong the Shelf Life of Vegetable Products, *Chemical Engineering Transactions*, 43, 55-60
- Shah, B., Davidson, P.M., Zhong, Q., 2013. Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk. *International Journal of Food Microbiology*. 161, 53–59
- Simonovska, B., Vovk, I., Andrenšek, S., Valentová, K. y Ulrichová, J. (2003). Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A*, 1016, 89–98.
- Singleton VL, Rossi JA., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144-158.

- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology* 18, 463–470.
- Sofos, J.N. y Busta, F.F. (1981). Antimicrobial activity of sorbate. *Journal of Food Protection*. 44, 614-622.
- Sofos, J.N., Pierson, M.D., Blocher, J.C. y Busta, F.F. (1986). Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology*.
- Stratford, M. y Rose, A.H., 1986. Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Genetic. Microbiology*, 132, 1-6.
- Stone, H., y Sidel, J. (1993). *Sensory Evaluation Practices*. Elsevier, San Diego, USA.
- Stratford, M., Hofman, P., y Cole, M. (2000). *Fruit juices, fruit drinks, and soft drinks. Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Estados Unidos.
- Sugumar, S., Ghosh, V., Nirmala, M. J., Mukherjee, A. y Chandrasekaran, N. (2014). Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 1044–1049.
- Sugumar S, Ghosh V, Mukherjee A y Chandrasekaran N. (2016). Essential oil-based nanoemulsion formation by low- and high-energy methods and their application in food preservation against food spoilage microorganisms. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, Elsevier, Londres, Reino Unido.
- Sullivan, D. J., Azlin-Hasim, S., Cruz-Romero, M., Cummins, E., Kerry, J. P. y Morris, M. A. (2020). Antimicrobial effect of benzoic and sorbic acid salts and nano-solubilisates against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* and chicken microbiota biofilms. *Food Control*, 107, 106786.
- Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J., Geeraerd, A.H. y Van Impe, J.F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(2), 137-159.
- Taherian, A. R., Fustier, P. y Ramaswamy, H. S. (2006). Effect of added oil and modified starch on rheological properties, droplet size distribution, opacity and stability of beverage cloud emulsions. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 687-696.
- Tassou, C. C., Drosinos, E. H. y Nychas, G. J. E. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10 C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(6), 593-600.
- Thevelein, J.M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast*, 10, 1753-1790.
- Thomas D.S. y Davenport R.R. (1985). *Zygosaccharomyces bailii* – a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology*, 2: 157-169.
- Tilbury, R.H., (1980a). Xerotolerant yeasts at high sugar concentrations. *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*. Society for Applied Bacteriology Technical Series. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Tilbury, R.H., (1980b). Xerotolerant (osmophilic) yeasts. *Biology and Activity of Yeasts*. Society for Applied Bacteriology, Symposium Series. Academic Press, Londres, Reino Unido.

- Tornberg, E., y Ediriweera, N. (1988). Factors that influence the coalescence stability of protein-stabilized emulsion from the proportion of oil extracted by hexane. *Journal of Science and Food Agriculture*, 46, 93-113.
- Tornberg, E. y Hermansson, A.M. (1977). Functional characterization of protein stabilized emulsions. Effect of processing. *Journal of Food Science*, 42, 468.
- Tyagi, A. K., Gottardi, D., Malik, A. y Guerzoni, M. E. (2014). Chemical composition, in vitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 731-737.
- Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Garcia-Gimeno, R.M. y Zurera, G. (2006). Modeling the growth rate of *Listeria monocytogenes* using absorbance measurements and calibration curves. *Journal of Food Science*, 71, M257–M264.
- Valdez, B. (2012). Food industrial processes-methods and equipment. Croatia: InTechnology.
- Vasavada, P.C. (2003). Microbiology of fruit juice and beverages. CRC Press, Estados Unidos.
- Velez, G., Munoz, J., Williams, P.A., and English, R.J. (2003). Role of Hydrocolloids in the Creaming of Oil in Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 265-269.
- Waginaire, L. (1997). Place of lipids as emulsifiers in the future. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides*, 44, 271.
- Walstra, P. (1983) Formation of emulsions. *Encyclopedia of emulsion technology*. Nueva York, Estados Unidos.
- Walstra P. (2000). Capítulo 3: Sistemas dispersos: Consideraciones Básicas. En: Fennema O.R. (Eds). *Química de Alimentos*. Editorial Acribia. 112-171.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., David, C.R., Fleet, G.H. y Lee, T.H., (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36: 302–313.
- Worobo, R. W. y Splittstoesser, D. F. (2005). *Processing Fruits Science and Technology* Second Edition.
- Xue, J., Michael Davidson, P. y Zhong, Q. (2015). Antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. *International Journal of Food Microbiology* 210, 1–8,
- Yan, X. J., Suzuki, M., Ohnishi-Kameyama, M., Sada, Y., Nakanishi, T. y Nagata, T. (1999). Extraction and identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4711–4713.
- Ye, A. y Singh, H. (2001). Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. *Food Hydrocolloids*, 15, 195-207.
- Yúfera, E.P. (1998). *Química de los alimentos*. Ed. E.P. Yúfera. Editorial Síntesis S.A., Madrid, España.
- Zalazar, A. L., González, M.M, Gliemmo M.F. y Campos, C. A. (2018). A colorimetric assay using tetrazolium salts with an electron mediator to evaluate yeast growth in opaque dispersed systems. *Journal of Food Science and Technology*, 233–240.

Zalazar, A. L., Gliemmo M.F., Soria M y Campos, C. A. (2019). Modelling growth/no growth interface of *Zygosaccharomyces bailii* in simulated acid sauces as a function of natamycin, xanthan gum and sodium chloride concentrations. *Food Research International*, Volume 116, February 2019, Pages 916-924.

Zhang, S., Zhang, M., Fang, Z. y Liu, Y. (2017). Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 316-322.

Zuleta A. y Sambucetti M.E (2001). Fructanos: inulin determination for food labeling. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4570-72.

Zwietering, M.H, Jongenburger, I., Rombouts, F.M., y van't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875-1881.