

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA Y SUS  
CONCENTRADOS MEDIANTE EMULSIONES E INCLUSIÓN MOLECULAR  
PARA LA ESTABILIZACIÓN Y PRESERVACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE

Por

CYNTHIA TORRES ALVAREZ

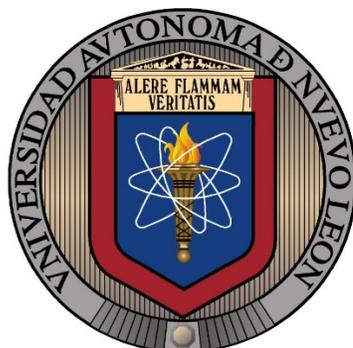
Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN  
EN ALIMENTOS

Marzo 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA Y SUS  
CONCENTRADOS MEDIANTE EMULSIONES E INCLUSIÓN MOLECULAR  
PARA LA ESTABILIZACIÓN Y PRESERVACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE

Por

CYNTHIA TORRES ALVAREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACION EN ALIMENTOS

Marzo 2018

MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA Y SUS  
CONCENTRADOS MEDIANTE EMULSIONES E INCLUSIÓN MOLECULAR  
PARA LA ESTABILIZACIÓN Y PRESERVACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE

**Comité de Tesis**

---

Dra. María Adriana Núñez González  
Presidente

---

Dra. Catalina Leos Rivas  
Secretaria

---

Dr. Juan Gabriel Báez González  
Vocal

---

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra  
Vocal

---

Dr. Sergio Moreno Limón  
Vocal

Marzo 2018

MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA Y SUS  
CONCENTRADOS MEDIANTE EMULSIONES E INCLUSIÓN MOLECULAR  
PARA LA ESTABILIZACIÓN Y PRESERVACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE

**Por**

**CYNTHIA TORRES ALVAREZ**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ALIMENTOS**

---

Dra. María Adriana Núñez González

Director

---

Dr. José Rodríguez Rodríguez

Director externo

Marzo 2018

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a **Dios** por permitirme soñar, realizar y vivir cada idea y etapa de mi vida, todo por Él y para Él.

A **CONACyT** por el apoyo a través de la beca **269983** y al programa "Becas Mixtas 2015-Mzo 2016 Movilidad en el Extranjero" (**290936**) para la realización de una estancia de investigación.

A la **Dra. Adriana Nuñez** por aceptarme como alumna de doctorado, por todo su apoyo, consejos, sugerencias, por ser mi guía no solo durante este periodo, sino desde mi formación académica en licenciatura, siendo mi inspiración de trabajo, paciencia y lealtad, representando para mí uno de los mejores docentes. Gracias por todo, Dios la bendiga.

A **Frutech Internacional** (N.L. México) por proporcionarme muestras de los aceites, **Juan José Ledezma** y **Alejandro Muris** por el apoyo en conocimiento de los aceites, por su paciencia, asesoría y facilidades en el laboratorio.

**Wacker Mexicana S. A. de C. V.** al Ing. Víctor Vega, por las facilidades en el otorgamiento de la muestra de  $\beta$ -ciclodextrina.

A mis asesores, el **Dr. Juan Gabriel Báez**, por sus consejos, sugerencias y apoyo durante la realización de la investigación en su laboratorio. Al **Dr. Sergio Moreno**, por su apoyo en la parte estadística y sus observaciones. Al **Dr. Carlos Amaya** por evaluarme y escucharme cada semestre durante la investigación. A la **Dra. Catalina Leos**, por las facilidades otorgadas en su laboratorio. Al **Dr. José Rodríguez** por su apoyo, conocimiento y paciencia en los análisis de cromatografía realizados a los aceites. A la **Dra. Sandra Castillo**, siendo para mí una de las investigadoras más pacientes y optimistas, gracias por toda su asesoría en la parte microbiológica y al escribir el artículo.

Al **Dr. José Antonio Gabaldón Hernández** por su apoyo durante la estancia realizada en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición de la Universidad Católica San Antonio de Murcia en España.

A la **LCA Alma Mora** por todos sus consejos y asesorías, por ser una persona especial en mi vida profesional estando desde mis inicios. A **Alejandra** (Equipin), **Edith**, **Irasema**, **Jenny** y **Vero**, por su apoyo durante esta investigación, por tantos momentos que vivimos, de alegría, felicidad, diversión y dudas también. Gracias por ser parte de mi vida. A mis compañeras de laboratorio **Minerva**, **Ana** y **Analía**.

A todos mis familiares, amigos, maestros y compañeros de distintos laboratorios que labore por el apoyo durante esta investigación.

## DEDICATORIA

Con todo mi amor a **Dios**, quien me permitió llegar hasta aquí, por darme salud y bendición en alcanzar mis sueños y metas, confió total y plenamente en el camino creado para mí, porque Él es mi guía, todo por Él y para Él.

A mis papas **Lázaro Torres** y **Margarita Álvarez**, quien con su amor, apoyo y paciencia me impulsan en continuar, por permitirme realizar cada idea que tenga. A mis hermanos **Ricardo** y **Carlos**, aun no conociendo del tema, me apoyaron de alguna manera, mi sobrina **Walkyria**, deseo de todo corazón que disfrutes mucho de tu vida y ames realmente lo que hagas. A mi abuelita **Guadalupe Garza**, quien ya goza de la hermosa presencia de Dios, fuiste testigo del inicio de esta etapa, mas ya no está presente, sé que me bendice enormemente. ¡Gracias Familia!

A **Antonio Ramírez**, mi amigo, mi esposo, mi compañero de vida, gracias cariño por siempre apoyándome, por escucharme en tantas pláticas y por todos los momentos que me brindaste consejos, sugerencias o simplemente estuviste para mí en momentos de alegría, incertidumbre, tristeza, felicidad y toda la mezcla de sentimientos que genere durante esta investigación y cuando realice la estancia; por ser el primero en quien pienso cuando algo me sucede. Gracias por amarme



*Dichoso el hombre que ha puesto su confianza en el Señor*

Salmo 1. RT

## **ÁREA DE TRABAJO**

La realización del trabajo práctico se llevó a cabo en el Laboratorio de Alimentos y Laboratorio de Química analítica, de los departamentos de Alimentos y Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Además, se realizó una estancia académica en Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición en la Universidad Católica de Murcia, en Murcia, España.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 Naranja	3
2.2 Aceites esenciales	4
2.2.1 Aceite esencial de naranja	5
2.2.1.1 Aceites concentrados de naranja	6
2.3 Actividad biológica	7
2.3.1 Actividad antimicrobiana	7
2.3.2 Actividad antioxidante	10
2.4 Microencapsulación	13
2.4.1 Proceso para la obtención de microcápsulas	15
2.4.1.1 Secado por atomización	15
2.4.1.2 Liofilización	15
2.4.1.3 Extrusión	16
2.4.1.4 Polimerización interfacial	16
2.4.1.5 Coacervación simple y compleja	16
2.4.1.6 Atrapamiento en liposomas	17
2.4.1.7 Emulsiones	18
2.4.1.7.1 Material de pared	19
2.4.1.7.2 Estabilidad de emulsiones	22
2.4.1.8 Inclusión molecular	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>4. HIPÓTESIS</b>	30
<b>5. OBJETIVO</b>	31
Objetivo general	31
Objetivos particulares	31
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	32
6.1 Material	32
6.2 Métodos	32
6.2.1 Caracterización del aceite esencial de naranja y sus concentrados	32
6.2.2 Análisis cromatográfico del aceite esencial de naranja y sus concentrados	32
6.2.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	33
6.2.4 Determinación de la actividad antimicrobiana	33
6.2.5 Determinación de la concentración mínima (CMI) y bactericida (CMB)	34
6.2.6 Determinación de la actividad antioxidante	34
6.2.7 Desarrollo de emulsiones utilizando $\beta$ -ciclodextrinas y biopolímeros	35
6.2.7.1 Análisis de tamaño de partícula	36
6.2.7.2 Análisis del índice de cremado	36
6.2.7.3 Determinación de tasa de coalescencia	36
6.2.7.4 Determinación de actividad antioxidante	37
6.2.8 Formación y caracterización de los complejos de inclusión	37
6.2.8.1 Preparación de los complejos de inclusión	37

6.2.8.2	Determinación del rendimiento (%)	37
6.2.8.3	Determinación de la eficiencia de encapsulación (%EE) y cuantificación del aceite encapsulado	38
6.2.8.4	Análisis del tamaño de partícula	39
6.2.8.5	Análisis por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	39
6.2.8.6	Análisis morfológico	39
6.2.9	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	39
6.2.10	Determinación de la actividad biológica	40
6.2.10.1	Preparación de la solución stock	40
6.2.10.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB)	40
6.2.10.3	Determinación de la actividad antifúngica: Inhibición micelial	40
6.2.10.4	Determinación de la concentración mínima fungicida (CFI)	41
6.2.10.5	Determinación de la actividad antioxidante	41
6.3	Análisis estadístico	41
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	42
7.1	Caracterización del aceite esencial de naranja y sus concentrados	42
7.2	Perfil cromatográfico del aceite esencial de naranja y sus concentrados	42
7.3	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de naranja y sus concentrados	45
7.4	Actividad antioxidante del aceite esencial de naranja y sus concentrados	46
7.5	Obtención de emulsiones utilizando $\beta$ -ciclodextrinas y biopolímeros	47
7.5.1	Estabilidad física de las emulsiones con AN	48
7.6	Evaluación de la cinética de la actividad antioxidante de los aceites concentrados de naranja en emulsiones almacenada a diferentes temperaturas	49
7.7	Caracterización de los complejos de inclusión	52
7.7.1	Rendimiento (%)	52
7.7.2	Cuantificación del aceite encapsulado y eficiencia de encapsulación (%EE)	53
7.7.3	Tamaño de partícula	54
7.7.4	Caracterización por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	55
7.7.5	Análisis morfológico	56
7.7.6	Actividad biológica	57
7.7.6.1	Actividad antioxidante	57
7.7.6.2	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB)	57
7.7.6.3	Concentración inhibitoria fungicida (CFI)	59
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	62
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	80
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	81
<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	82
<b>12.</b>	<b>ANEXO</b>	98
<b>13.</b>	<b>RESUMEN BIOGRÁFICO</b>	101

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1	Propiedades fisicoquímicas de los aceites	42
2	Perfil cromatográfico del AN, 5x, 10x y 20x	44
3	Actividad antimicrobiana del AN, DL, 5x, 10x y 20x por el método de difusión en disco	45
4	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida de AN, DL, 5x, 10x y 20x	46
5	Actividad antioxidante de AN, DL, 5x, 10x y 20x	47
6	Concentración inhibitoria (CI <sub>50</sub> ) de AN, DL, 5x, 10x y 20x	47
7	Formulaciones (%) desarrolladas para emulsiones con AN	48
8	Estabilidad física de emulsiones con AN	49
9	Estabilidad física de emulsiones con 5x, 10x y 20x durante 93 días	50
10	Aceite encapsulado (mg/g $\beta$ -CD) y eficiencia de encapsulación (%) de los complejos de inclusión.	54
11	Tamaño de partícula ( $\mu$ m) de los complejos de inclusión	55
12	Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) para los complejos de inclusión	59
13	Crecimiento micelial de <i>A. niger</i> en presencia de complejos de inclusión en relación 12:88	60
14	Crecimiento micelial de <i>A. niger</i> en presencia de complejos de inclusión en relación 16:84	60
15	Crecimiento micelial de <i>A. flavus</i> en presencia de complejos de inclusión en relación 12:88	61
16	Crecimiento micelial de <i>A. flavus</i> en presencia de complejos de inclusión en relación 16:84	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1	Procesos para la obtención de microcápsulas	15
2	Tipos de emulsiones (O/W; W/O)	18
3	Mecanismos que contribuyen a la inestabilidad de las emulsiones	22
4	Estructura de la $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ -CD	24
5	Fotografías de emulsiones con AN por microscopio óptico y de índice de cremado	50
6	Gráfica de la cinética de la actividad antioxidante (ABTS) de emulsiones de aceites concentrados de naranja almacenadas a diferentes temperaturas durante 93 días	51
7	Gráfica de la cinética de la actividad antioxidante (DPPH) de emulsiones de aceites concentrados de naranja almacenadas a diferentes temperaturas durante 93 días	52
8	Gráfica del rendimiento (%) de los complejos de inclusión	53
9	Espectro FTIR de (a) aceite 20x, (b) $\beta$ -CD, (c) relación 12:88	56
10	Microfotografía en microscopio electrónico de barrido de (a) $\beta$ -CD pura; (b) 5x12:88; (c) 10x,12:88; (d) 20x,12:88	56
11	Gráfica de la actividad antioxidante de los complejos de inclusión de los aceites concentrados con $\beta$ -CD en diferentes relaciones	57
12	Gráfica del crecimiento (%) de <i>Salmonella typhi</i> a diferentes concentraciones de complejos de inclusión 5x en relación 12:88 y 16:84	58
13	Gráfica del crecimiento (%) de <i>Listeria monocytogenes</i> a diferentes concentraciones de complejos de inclusión 20x en relaciones 12:88 y 16:84	59
14	Espectro FTIR de (a) aceite 5x, (b) $\beta$ -CD, (c), (1) relación 4:96; (2) relación 12:88; (3) relación 16:84	98
15	Espectro FTIR de (a) aceite 10x, (b) $\beta$ -CD, (c), (1) relación 4:96; (2) relación 12:88; (3) relación 16:84	99
16	Espectro FTIR de (a) aceite 20x, (b) $\beta$ -CD, (c), (1) relación 4:96; (2) relación 16:84	100

## RESUMEN

Recientemente se ha presentado interés en la industria alimenticia, en la medicina preventiva y consumidores por la búsqueda de ingredientes naturales, principalmente de extractos de plantas, que puedan sustituir a los tradicionalmente utilizados. La presencia de algunos compuestos en extractos de plantas han sido estudiados por sus diferentes actividades biológicas como antioxidante y antimicrobiana. Actualmente en la industria de alimentos se puede disponer de un extracto natural como es el aceite esencial de naranja extraído de la cáscara del fruto, el cual se utilizan como aromatizante y es uno de los ingredientes básicos en las industrias de perfumería, alimentos, cosmética y farmacéutica; sin embargo, es muy inestable a factores ambientales como luz, oxígeno, humedad, pH, etc. Por esta razón, se han utilizando nuevas técnicas de protección de estos compuestos activos, como la microencapsulación, que se ha empleado para proteger las sustancias que son sensibles a factores que los deterioran. En esta investigación, se estudio la composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de naranja, el compuesto principal de este aceite, el D-limoneno y aceites concentrados 5x, 10x y 20x, además se realizó la microencapsulación mediante emulsiones e inclusión molecular para su preservación y estabilidad en la actividad antioxidante y antimicrobiana. En relación a la actividad biológica, los aceites concentrados sin encapsular, fueron significativamente diferentes al aceite esencial de naranja y D-limoneno, además presentaron una composición química diferente posiblemente debido a la disminución de compuestos volátiles potencializando otros compuestos minoritarios. En las emulsiones sencillas con los aceites concentrados, la formulación 1 mostró mejor estabilidad física, manteniendo su actividad antioxidante almacenada a temperaturas de 4 y 25 °C a más de 90 días. Los complejos de inclusión con  $\beta$ -CD, la relación 12:88 con los aceites concentrados de naranja, mostraron mayor eficiencia de encapsulación, concentración de aceite, actividad antioxidante y antimicrobiana. Pocos estudios se han realizado para los aceites concentrados de cítricos, en especial para los obtenidos del aceite esencial de naranja, pudiendo ser una alternativa potencial en alimentos, como ingrediente con efecto antioxidante y antimicrobiano.

## ABSTRACT

Recently, there has been interest in the food industry, in preventive medicine and consumers for the search for natural ingredients, mainly plant extracts, which can replace those traditionally used. The presence of some compounds in plant extracts has been studied for their different biological activities as antioxidant and antimicrobial. Currently in the food industry you can have a natural extract such as the orange essential oil extracted from the skin of the fruit, which is used as a flavoring and is one of the basic ingredients in the perfumery, food, cosmetics and pharmaceutical; however, it is very unstable to environmental factors such as light, oxygen, humidity, pH, etc. For this reason, new techniques have been used to protect these active compounds, such as microencapsulation, which has been used to protect substances that are sensitive to factors that impair them. In this research, the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of orange, the main compound of this oil, the D-limonene and 5x, 10x and 20x concentrated oils were studied, as well as microencapsulation by means of emulsions and molecular inclusion. for its preservation and stability in the antioxidant and antimicrobial activity. In relation to the biological activity, the unencapsulated concentrated oils were significantly different to the essential oil of orange and D-limonene, in addition they presented a different chemical composition possibly due to the decrease of volatile compounds potentizing other minority compounds. In simple emulsions with concentrated oils, formulation 1 showed better physical stability, keeping its antioxidant activity stored at temperatures of 4 and 25 °C to more than 90 days. The con  $\beta$ -CD inclusion complexes, the 12:88 ratio with concentrated orange oils, showed higher encapsulation efficiency, oil concentration, antioxidant and antimicrobial activity. Few studies have been conducted for citrus oil concentrates, especially those obtained from the essential oil of orange, and may be a potential alternative in foods, as an ingredient with antioxidant and antimicrobial effect.

## 1. INTRODUCCIÓN

La conservación de los alimentos ha estado relacionanda con muchos factores, principalmente químicos y biológicos. Por ello para aumentar el tiempo de conservación de los alimentos se han utilizado aditivos químicos sintéticos que puedan cumplir un papel como agentes antioxidantes/antimicrobianos en combinación con métodos físicos, tales como la refrigeración. Tradicionalmente se han empleado antioxidantes sintéticos, que están siendo utilizados en la industria de alimentos, con una gran demanda por contar con características de efectividad, bajo costo y alta estabilidad como son el Butilhidroxianiso (BHA)<sup>®</sup> y el Butilhidroxitolueno (BHT)<sup>®</sup>, pero en los últimos años su uso se ha visto disminuido debido a la sospecha de ser carcinogénicos y a su posible mutagenicidad (Miron et al. 2010). Recientemente se ha presentado un gran interés en la industria alimenticia, medicina preventiva y la tendencia de los consumidores por adquirir productos naturales que sustituyan los tradicionalmente utilizados. Entre los productos naturales se encuentran los aceites esenciales que derivan de las plantas, así como de algunos frutos. Las plantas aromáticas y sus extractos han sido examinados para determinar su eficacia para la seguridad y conservación de alimentos. La mayor parte de sus propiedades es debido a sus aceites esenciales (AE) y otros metabolitos secundarios que poseen actividad antimicrobiana (Velázquez et al. 2013). Estos compuestos son reconocidos generalmente como seguros (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) de la EE.UU. (Fisher y Phillips, 2008b), por lo que se consideran como alternativas prometedoras dentro de la industria alimentaria y farmacéutica. Desde hace siglos, las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales han sido reconocidas, además de tener una creciente demanda gracias a las tendencias de consumo. La legislación y el aislamiento cada vez mayor de agentes patógenos resistentes a diversos antibióticos, ha conllevado a la investigación y desarrollo de productos que puedan contener este tipo de compuestos fungiendo como aditivos, y a su vez antimicrobianos para alargar la vida de anaquel. Los aceites de cítricos pueden tener diferentes usos, se ha encontrado que pueden inhibir tanto de manera directa como en su forma volátil, una gran gama de bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas como *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* entre otras; así como algunos géneros de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* entre otras (Jing et al. 2014). Los

fungicidas sintéticos son considerados como uno de los principales aditivos en la industria para controlar la proliferación de hongos en los alimentos (Ismail y Zhang 2004). El uso de fungicidas genera residuos tóxicos que están siendo relacionado con cáncer, además de que su degradación suele ser prolongada por lo que genera una contaminación ambiental (Tripathi y Dubey 2003). A pesar de su alta efectividad, su uso continuo puede llegar a crear resistencia fúngica, lo que incrementa la dificultad del manejo del problema (Mercier y Smilanick, 2005).

Los aceites cítricos se utilizan como aromatizantes en diferentes industrias, siendo ingredientes básicos en las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica. Contiene D-limoneno, componente mayoritario en su composición normal, además, en menor proporción poseen una gran cantidad de terpenos (Yáñez et al. 2007); pero a la vez son muy inestables a ciertos factores ambientales como luz, oxígeno, humedad, pH, etc.; por esta razón se han investigado nuevas técnicas que permitan darle protección a muchas sustancias que pueden verse afectadas por factores a los que se suelen exponer. Estas técnicas como la alta presión, la nanotecnología, la irradiación, la microencapsulación, etc., se utilizan cada vez más para maximizar las propiedades nutricionales de los alimentos, mientras que los nuevos ingredientes con propiedades funcionales contribuyen a la mejora de la salud (Viuda-Martos et al. 2008). Para prevenir la degradación de muchos compuestos se utilizan polímeros naturales o sintéticos que ya han sido utilizados como aditivos en la industria alimentaria, como lo son los almidones, maltodextrinas, ciclodextrinas, lípidos, proteína natural y vegetal, goma arábica, quitosano, etc. (Desai y Park, 2005).

Por lo anterior, esta investigación tiene como objetivo evaluar la eficiencia de encapsulación mediante el desarrollo de emulsiones sencillas, además por el método de inclusión molecular, para la conservación de la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de naranja y sus concentrados. Esto aportaría información relevante para el futuro desarrollo de aditivos alimentarios naturales que puedan aportar actividad antioxidante además de incrementar la vida de anaquel del producto.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Naranja

La naranja, entre sus principales características está su delicioso sabor y versatilidad en la cocina, sin dejar de mencionar las prodigiosas propiedades que tiene para la salud, contienen sustancias esenciales para el organismo como vitaminas sobre todo vitamina C, y minerales, entre los que destacan hierro, fósforo, calcio y magnesio. Esta fruta tiene una producción de 70 millones de toneladas en todo el mundo, constituyen el fruto más consumido y representan el tercer fruto en extensión de cultivo después del plátano y las uvas, hoy en día se encuentran cultivadas en todos los continentes, en zonas donde se tenga un clima propicio, es decir abundancia de sol, agua y poca humedad ambiental.

La naranja Valencia del grupo Blancas tiene un doble uso, para el consumo en fresco y para jugo; por ello es la variedad líder en cuanto a su amplia distribución a nivel mundial. Sin embargo, su consumo en fresco se reduce a los propios países productores; por la dificultad que presenta el retirar la cascara, se utiliza preferentemente para jugo en fresco, que se prepara en casa o en estancillos de las grandes urbes de dichos países (ASERCA-SAGARPA, 2009). La naranja, producto del árbol del naranjo dulce, es una de las frutas más populares, siendo México uno de los primeros productores a nivel mundial (SAGARPA, 2010), ocupando entre los primeros 5 lugares de producción, siendo principales productores Brasil, E.U.A., China e India (FAO, 2011).

La naranja dulce pertenece a la familia de las Rutáceas, una familia muy amplia que contiene unas 1700 especies de plantas que crecen en países de clima cálido y templado. Las plantas más conocidas son los cítricos, especies que están incluidas en el género de *Citrus*, al cual pertenecen la naranja común (*Citrus sinensis*), la naranja amarga (*Citrus japonica*), la naranja amarga (*Citrus aurantium*) entre otras (Yáñez et al. 2007).

De la naranja, no solamente se aprovecha el jugo, de la cascara se pueden obtener aceites que se utilizan como aromatizantes en diferentes industrias. Su aceite esencial es uno de los ingredientes básicos en la industria de perfumería, alimentos, agronomía y farmacéutica (Yáñez et al. 2007).

## 2.2 Aceites esenciales

Aceite esencial (AE) término utilizado para sustancias líquidas concentradas, de carácter hidrófobo y contiene una gran variedad de compuestos volátiles aromáticos. Son sustancias sintetizadas por las plantas como metabolitos secundarios como papel importante en la protección de las plantas actuando como agentes antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas. Los AE pueden presentar un aroma diferente a la planta de origen y poseen una composición química compleja incluyendo una mezcla de sustancias orgánicas como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc., de peso molecular menor de 400 Da y presión de vapor suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente. Los AE son comúnmente extraídos mediante métodos físicos como la destilación a vapor o hidrodestilación, sin embargo, existen otros métodos de extracción como la maceración, prensado en frío o extracción con disolventes (Bauer et al. 1985). Se requiere considerar, que el producto de la extracción puede variar en varios aspectos como es la calidad, cantidad y composición, generado por diversos factores como las características de cultivo, la parte de la planta que se realiza la extracción, edad y estado del ciclo vegetativo, tipo de extracción elegida, entre otros, generando interés en la importancia de controlar el material y las condiciones en que se realiza la extracción para obtener un AE de características homogéneas (Masotti et al. 2003; Angioni et al. 2006). Usualmente la composición química de los AE suele ser caracterizada por cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS).

La mezcla de compuestos que contienen los AE otorgan a estas sustancias una diversidad de propiedades funcionales importantes para muchas aplicaciones en la ciencia y tecnología de los alimentos. Sin embargo, la configuración química de los componentes, la cantidad presente y la interacción entre ellos, pueden afectar las propiedades bioactivas de cada aceite (Fisher y Phillips, 2008b). Pueden contener hasta 60 compuestos diferentes, en determinadas concentraciones, atribuyendo sus propiedades a dos o tres componentes mayoritarios (20-70%), que son los que determinan la actividad biológica de los mismos (Croteau et al. 2000).

Los aceites esenciales (AE) han sido utilizados desde hace tiempo por sus propiedades antisépticas, terapéuticas y por su característico aroma, creando un gran interés en la conservación de diversos alimentos. Por su propiedades antimicrobianas, actualmente se ha generado el uso de estos compuestos en la industria alimentaria y farmacéutica, estrechando el uso de productos sintéticos y protegiendo el equilibrio ecológico, aumentando la importancia en la industria sobre todo alimentaria, farmacéutica, sanitaria y cosmética. Los aceites esenciales de cítricos se han aplicado industrialmente en muchos productos, incluidos alimentos y bebidas, cosméticos y medicamentos (Setanni et al. 2012).

### **2.2.1 Aceite esencial de naranja**

Los aceites esenciales de cítricos (AEC) son generados principalmente de frutos cítricos principalmente naranja, limón, mandarina, toronja; que contienen en su estructura una cubierta de protección para el exterior denominada cáscara, la cual está conformada por un flavedo, glándulas de aceite, albedo y sacos donde se encuentra el jugo. Se encuentra la epidermis que consiste de plaquetas de una capa de cera epicuticular, el flavedo en la región subepidermal el cual contiene los cromoplastos que proporcionan el color característico a la naranja de acuerdo a su variedad, de igual manera, se encuentran numerosos sacos que contienen el aceite esencial aromático (Kealey y Kinsella, 1979).

Cada parte de la naranja está compuesta por sustancias volátiles, enzimas, ácidos, proteínas, lípidos, azúcares, pigmentos y vitaminas, al igual, contiene pequeñas cantidades de volátiles en la atmósfera, lo que le confiere ese aroma distintivo de fruto cítrico, por su lanzamiento continuo de estas sustancias. Los AEC son mezclas complejas que contienen compuestos volátiles (85-99%) y no volátiles (1-15%), procedentes principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, incluyendo aldehídos, cetonas, ácidos, alcoholes, y ésteres. El limoneno es uno de los principales componentes de los AEC (25 - 97 %) y su contenido varía significativamente entre especies y/o variedades de los mismos (Njoroge et al. 2005; Fisher y Phillips, 2008b; Jing et al. 2014). El residuo no volátil del aceite, puede contener hidrocarburos, esteroides, ácidos grasos, ceras, carotenoides, cumarinas, psoralenos y flavonoides, estos últimos compuestos son útiles

para la diferenciación entre especies (Tranchida et al. 2012). A pesar de su alto contenido en los AEC, los hidrocarburos terpénicos (incluyendo el limoneno) son muy sensibles a las reacciones de degradación por oxidación, dando como resultado sustancias como los hidroperóxidos. Estas reacciones de oxidación se deben a que el D-limoneno presenta enlaces dobles entre los carbonos C1-C2 y C8-C9, aumentando las probabilidades de oxidación (hidroxilación) en los carbonos alílicos (C3, C6) y la epoxidación en los dobles enlaces debido a su estabilidad y reactividad química, sin embargo, pueden oxidarse en otros carbonos menos reactivos, además de la posible formación de malos sabores, perdiendo el olor característico (Castellanos, 2007; Djordjevic et al. 2007a). Además estos compuestos, no contribuyen mucho al sabor y fragancia del aceite, debido a que son inestables al calor, luz, además de disminuir la solubilidad del aceite; es por esto que deben ser removidos para estabilizar el producto final. Por otro lado, la fracción oxigenada, proporciona gran parte de sabor intenso, característico de los aceites de cítricos y se compone principalmente de alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres (Lopes et al, 2003). Industrialmente, es conveniente elaborar un producto con mayor estabilidad, obteniendo así los aceites concentrados de naranja.

### **2.2.1.1 Aceites concentrados de naranja**

Industrialmente, el aceite esencial de naranja se produce a partir de la cáscara del fruto por el método de prensado en frío, posteriormente se pueden realizar diferentes métodos para la disminución de compuestos no deseados como son los hidrocarburos terpénicos (incluyendo el limoneno) los cuales se pueden eliminar convencionalmente por destilación al vacío (O'Bryan et al. 2008), extracción con disolvente y cromatografía de adsorción. Durante la destilación al vacío, es difícil indicar límites generales para la obtención de propiedades físico-químicas definidas de las fracciones concentradas, debido a que estas propiedades dependen del grado de concentración, condiciones de operación, tecnología aplicada, proporciones relativas de los componentes oxigenados de origen y de factores económicos (Lopes et al. 2003).

Los aceites concentrados se preparan por lo general por técnicas de extracción tales como la destilación, prensado en frío o por extracción (Burt, 2004). Por lo general, son mezclas muy complejas de cientos de compuestos aromáticos individuales. Hierbas y especias

usadas comúnmente en los alimentos han proporcionado la mayor parte de los concentrados que han sido estudiados por su actividad antimicrobiana. Estos posibles atributos y una creciente demanda de opciones de aditivos alimentarios naturales han dado lugar a un gran interés en el uso de AE y sus concentrados como posibles agentes antimicrobianos alternativos (Ruiz y Flotats, 2014).

La reproducción de la fragancia natural en un extracto concentrado es una tarea compleja; la presencia de compuestos termolábiles, la posibilidad de hidrólisis y de hidrosolubilización son serios obstáculos para la reproducción de las fragancias. Por lo general, el aceite esencial de naranja se compone de una mezcla compleja de terpenos, sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados, además de los componentes ya antes mencionados del aceite de naranja, a diferentes concentraciones (Silvestre et al. 2016). Los aceites concentrados también pueden contener diterpenos y algunos compuestos específicos que no pueden ser clasificados como pertenecientes a cualquiera de las familias de compuestos anteriormente mencionados. Otros compuestos que se pueden extraer de vegetales son: ácidos grasos y metílicos de ácidos grasos ésteres, las materias colorantes, cumarinas, esteroides y flavonoides, que en conjunto proporcionan las características de interés de determinado aceite (Beneti et al. 2011). Actualmente, los aceites concentrados se pueden obtener por proveedores quienes ya cuentan con fracciones estandarizadas de cada uno de los concentrados como son el 5x, 10x, y 20x del aceite esencial de naranja.

## **2.3 Actividad biológica**

### **2.3.1 Actividad antimicrobiana**

Los AE son reconocidos por ser agentes antimicrobianos naturales, poseen un amplio espectro de actividad biológica, que puede abarcar diferentes tipos de microorganismos como bacterias y hongos. Esta característica puede ser de gran importancia en varias áreas, desde la química de los alimentos, cosmética, farmacología y farmacéutica. Una de las principales ventajas de algunos aceites esenciales es que pueden ser utilizados en cualquier alimento debido a que se consideran sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS) (Kabara, 1991; Kim et al. 1995), sin embargo, se requiere su evaluación para que

logre un efecto mínimo en los cambios de las propiedades organolépticas de los alimentos, por lo tanto, podrían usarse para prevenir el crecimiento de muchos patógenos y microorganismos causantes de deterioro en los alimentos (Velázquez et al. 2013). Dicha actividad se debe a la presencia de sustancias bioactivas tales como los flavonoides, terpenos, cumarinas y carotenos (Viuda-Martos et al. 2008).

Viuda-Martos et al. (2008), estudiaron el efecto de los aceites de limón, mandarina, pomelo y naranja sobre el crecimiento de mohos asociados al deterioro de alimentos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium verrucosum*; estos mostraron actividad antifúngica, dependiendo del tipo de aceite y el tipo de moho, considerando esto como alternativa a los aditivos químicos para la industria alimentaria. Fisher y Phillips (2006a), investigaron la efectividad de aceites de limón, naranja dulce y bergamota y sus componentes contra varios patógenos en alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli O157* y *Campylobacter jejuni*. Los resultados indicaron que la bergamota fue el aceite esencial más inhibitorio seguido por citral y linalool, y la cepa *Staphylococcus aureus* fue el menos susceptible; sugiriendo la posibilidad de utilizar aceites esenciales de cítricos y sus componentes como una forma de combatir el crecimiento de causas de intoxicación alimentaria. Estudios en la determinación de la concentración mínima inhibitoria se realizó en el aceite esencial obtenido de la cascada de naranja dulce Bingtang (*Citrus sinensis* Osbeck) mostraron que el aceite esencial tenía un amplio espectro de actividades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Penicillium chrysogenum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, sugiriendo que este aceite sería una alternativa natural para productos en la conservación de alimentos (Neng-guo et al. 2009).

Para el estudio de actividad antibacteriana realizada en distintos aceites esenciales de naranja amarga, naranja dulce, limón y mandarina frente a diez cepas de géneros de *Xanthomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter* realizada por Frassinetti et al. (2011), reportando que todos los aceites mostraron una buena actividad antibacteriana, confirmando que adicionar los aceites puede ser utilizado como potenciales agentes antimicrobianos en la industria de alimentos.

Espina et al. (2011), examinaron la actividad antimicrobiana de tres aceites esenciales de cítricos (naranja, limón y mandarina) contra microorganismos patógenos y en

descomposición (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Pseudomonas aeruginosa*), obteniendo como resultados que el aceite de mandarina fue el mejor inhibidor de crecimiento. Sin embargo, bajas concentraciones de los aceites en combinación con un tratamiento térmico suave mostraron efectos letales sinérgicos, mostrando un potencial diseño en tratamientos combinados para la conservación de alimentos.

En la actualidad, existen pocas investigaciones de aceites concentrados, es decir aquellos a los que disminuyen considerablemente los compuestos volátiles, de tal manera que compuestos que se encuentran en mínima concentración de forma natural, después de un proceso aumentan considerablemente convirtiéndose en compuestos mayoritarios. Los aceites concentrados procedentes de aceite esencial de naranja pueden ser diferentes dependiendo del tiempo de proceso que conlleve, en esta investigación fue de 5x, 10x y 20x. Nannapaneni et al. (2009), analizaron 7 fracciones de aceite esencial de naranja para inhibir el crecimiento de bacterias de los generos *Campylobacter* y *Arcobacter spp*; obteniendo que las bacterias del género *Campylobacter* fueron más sensibles a las fracciones probadas principalmente al aceite de naranja sin terpenos, aceite 5x y D-limoneno, sin embargo *Arcobacter* no se obtuvieron inhibiciones en el crecimiento por ninguna fracción a excepción del aceite de naranja sin terpenos, concluyendo que las fracciones de aceite de naranja puedan servir como antimicrobianos naturales. De igual manera, O'Bryan et al. (2008), realizaron un estudio utilizando 7 fracciones obtenidas del aceite esencial de naranja (incluyendo el aceite 5x) en su actividad antibacteriana frente a 11 cepas de *Salmonella*; reportando que los terpenos, D-limoneno y los terpenos de esencia de naranja exhibieron actividad inhibitoria contra las cepas mediante el ensayo de difusión de disco, concluyendo que estos tipos de compuestos ofrecen la posibilidad de utilizar como antimicrobianos naturales para mejorar la seguridad de los alimentos.

Una de las principales razones de pérdidas económicas en la industria alimentaria son los ocasionados por hongos, con la subsecuente la reducción del valor nutricional del alimento (Magro et al. 2008). Los químicos sintéticos como los fungicidas son usualmente utilizados para la inhibición de esporas, las cuales son altamente tóxicas y peligrosas para el medio ambiente y la salud. Diversos problemas surgen, siendo la resistencia que llegan

a desarrollar estos microorganismos a distintos tratamientos, causando problemas en la salud (Jacometti et al. 2010). Varios estudios han demostrado que los aceites esenciales de diversas fuentes tienen una actividad potente contra los microorganismos. Debido al gran contenido de componentes presentes en el aceite esencial de naranja y muchos cítricos, se ha logrado detectar una significativa actividad antimicrobiana tanto en bacterias como en hongos (Chanthaphon et al. 2008).

Los aceites esenciales de naranja, limón, mandarina y pomelo muestran actividad antifúngica contra los hongos *A. niger*, *A. flavus*, *P. chrysogenum* y *P. verrucosum* por el método de dilución en agar; resultando el aceite esencial de naranja como el más eficaz contra *A. niger*, mientras que la mandarina es el mejor inhibidor de *A. flavus*. En el caso de *P. chrysogenum* y *P. verrucosum*, el aceite esencial de pomelo fue más efectivo para reducir el crecimiento. Los aceites esenciales de cítricos podrían considerarse alternativas adecuadas a los aditivos químicos para su uso en la industria alimentaria, considerando las necesidades de seguridad y los requerimientos de los componentes naturales por los consumidores (Viuda-Martos et al. 2008). Singh et al. (2011), estudiaron la actividad antifúngica de aceites esenciales de naranja de *Citrus maxima* y *Citrus sinensis*, reportando que los aceites solos y en combinación lograron inhibir completamente la producción de aflatoxinas B1 (AFB1), mientras que el principal compuesto en ambos aceites de forma individual mostró una mejor eficacia antiaflatoxigénica. Considerando que estos aceites podrían recomendarse como antimicrobianos naturales para controlar el crecimiento de hongos y la producción de aflatoxinas.

Por lo antes mencionado, los AE son por excelencia agentes antimicrobianos (Matiz et al. 2012). Sin embargo, el aceite esencial de naranja y en general, los aceites esenciales son muy inestables y se degradan muy fácilmente por factores medioambientales (luz, oxígeno, temperatura etc.), una manera de proteger la degradación es por medio de microencapsulación (Velázquez, 2008).

### **2.3.2 Actividad antioxidante**

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un

agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena (Botsoglou et al. 2009). Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos. Como resultado, los antioxidantes a menudo son agentes reductores, como los tioles o polifenoles (Alfaro, 2012). Los antioxidantes se usaron por primera vez para preservar los alimentos antes de la segunda guerra mundial. Los primeros en ser utilizados fueron sustancias naturales, pero fueron reemplazados rápidamente por sustancias sintéticas, más baratas de pureza controlada y poseedoras de una capacidad antioxidante más uniforme. Se valoró su toxicidad por métodos muy variados a concentraciones 100-200 veces mayores que su nivel real de consumo. Pero el aumento del uso de aditivos sintéticos puso en tela de juicio su utilización por parte de los consumidores creándose la necesidad de reemplazar estas sustancias por otras de origen natural (Pokorny et al. 2005).

A menudo son clasificados en dos amplias divisiones, dependiendo de su solubilidad en agua (hidrofílicos) o en lípidos (hidrofóbicos), la capacidad de acción antioxidante, por otro lado, dependerá de la función de otros miembros del sistema antioxidante, la protección que aporta dependerá de su concentración, y de su reactividad en particular a especies oxígeno reactivas (Alfaro, 2012). Una alternativa como fuente de antioxidantes naturales pueden ser el uso de aceites esenciales con actividad antioxidante (Madsen y Bertelsen, 1995).

La actividad antioxidante se puede evaluar mediante numerosos métodos (Prior et al. 2005). Los métodos de determinación antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido por la presencia de un antioxidante. Estas técnicas son muy variadas y proporcionan una gran variedad de parámetros (Fernández-Pachón et al. 2006). El DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl), es una de estas técnicas, en la cual el reactivo que se utiliza es de bajo costo, se utiliza en pequeña cantidad, y sólo se requiere un espectrofotómetro para realizar las lecturas (García-Becerra et al. 2010), así mismo existen otras como el ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Un estudio de la actividad antioxidante del residuo no volátil del aceite esencial de naranja contra la oxidación del aceite de oliva

de recién extracción, mediante la medición del valor de peróxidos producidos a 70 °C durante 48 h, reportando actividad antioxidante e identificaron mediante HPLC compuestos como  $\alpha$ -tocoferol y tres flavonas metoxiladas, confirmando que la fracción no volátil contiene antioxidantes naturales (Vargas-Arispuro et al. 1998).

Guddadarangavvanahally et al. (2008), evaluaron la actividad antioxidante de naranjas de pomelo y ombligo mediante la extracción de diferentes solventes, utilizando métodos como ABTS, DPPH y ORAC, reportando que si obtuvieron actividad antioxidante de los extractos con diferentes solventes pero que la actividad dependía del tipo de solvente utilizado, tipo de naranja y la técnica de estudio utilizada, incluso encontraron diferencia significativa entre los valores obtenidos por el mismo método en diferentes solventes. Atribuyendo que la actividad antioxidante de cada extracto pudo deberse a la cantidad de carotenoides, compuestos fenólicos y vitamina C presentes en los extractos.

Zia-ur-Rehman (2006), valoró el extracto de cáscara de cítricos como fuente natural antioxidante durante 6 meses de almacenamiento en aceite de maíz a 25 y 45 °C. Los extractos se obtuvieron con diferentes solventes, obteniendo como resultados que el extracto metanólico exhibió una actividad antioxidante muy fuerte, casi comparable con antioxidantes sintéticos como BHA y BHT, recomendando el uso de extracto como un antioxidante natural para suprimir el desarrollo de la rancidez en aceites y grasas.

Di Vaio et al. (2010), realizaron un estudio sobre la actividad antioxidante de extractos etanólicos de cáscara de 18 cultivares de limón en regiones de Italia, obteniendo resultados con alto poder captador de radicales sugiriendo que el aceite esencial de limón y sus componentes pueden contribuir a la prevención de la oxidación en alimentos e inhibir la oxidación de lípidos, sin embargo mencionan el interés de determinar las concentraciones de los metabolitos bioactivos y su posible correlación con la actividad antioxidante.

Hyang-Sook et al. (2000), estudiaron la actividad antioxidante de 34 tipos de aceites esenciales de cítricos y sus componentes mediante el radical DPPH, obteniendo que la actividad de 31 tipos de aceites fue comparables o más fuertes que las de Trolox (antioxidante de referencia), concluyendo que estos son altamente biodisponibles y pueden ser activos en el cuerpo como antioxidantes y eliminadores de radicales libres. Mahmud et al. (2009), evaluaron la actividad antioxidante del aceite esencial de *Citrus*

*acida*, obteniendo como resultados que el aceite era capaz de reducir el DPPH hasta un 91.7 % en comparación con la referencia del ácido ascórbico, como potencial antioxidante e ingrediente en la industria de alimentos.

## **2.4 Microencapsulación**

La encapsulación y/o microencapsulación es una tecnología que permite envolver físicamente en una matriz protectora o material denominado “tipo pared”, a aquellos ingredientes considerados sensibles, como una manera de protegerlos o cubrirlos, de diversas reacciones adversas, pérdidas volátiles, deterioro nutricional (Hogan et al. 2001), de la humedad, calor o condiciones extremas y así desarrollar o mejorar su estabilidad y mantener la viabilidad del producto, la técnica posee un alto potencial para generar nuevos productos y procesos. En las aplicaciones para alimentos, son típicamente empleados para resolver problemas de formulación que puedan surgir de la estabilidad química o física limitada del ingrediente activo, una incompatibilidad entre el ingrediente activo y la matriz, control de liberación del compuesto o biodisponibilidad de un nutriente (Alfaro, 2012). Actualmente, la microencapsulación se utiliza para mejorar la estabilidad y controlar la liberación de ingredientes alimenticios secos activos tales como aromas, enzimas, probióticos y aceites sensibles a la oxidación; también provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escalas microscópicas para su liberación posterior bajo condiciones controladas (Chávez-Páez et al. 2012; Jyothi et al. 2010).

Los procesos de encapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por la *National Cash Register* para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante mediante un proceso de coacervación (Lopretti et al. 2007; Filardo y Sánchez, 2010). Después de la primera utilización comercial de microencapsulación en 1954 para crear un papel de copia sin carbón; diferentes técnicas de encapsulación fueron desarrolladas y aceptadas dentro de la industria farmacéutica, química, cosmética y alimentaria (Seid et al. 2008). La microencapsulación de compuestos de actividad biológica (ADN, fármacos, proteínas, probióticos, enzimas, etc.), desde el punto de vista tecnológico, podría definirse como el proceso de recubrimiento de dichos compuestos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, como materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométricos. El producto

resultante de este proceso tecnológico recibe la denominación de “microesfera” ó “microcápsula”, dependiendo de cuál sea su morfología y estructura interna.

La microcápsula se diferencia de las microesferas principalmente por el tipo de estructura interna. En el primer caso, el principio activo, que puede ser de naturaleza líquida o sólida, se encuentra incluido en una especie de reservorio recubierto por una fina película de material. En el caso de las microesferas, el principio activo se encuentra altamente disperso bajo la forma de diminutas partículas o de moléculas en una matriz de material que puede ser lo mismo del recubrimiento. La obtención de un tipo de estructura u otro, depende de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y del material de recubrimiento, así como del proceso tecnológico elegido (Lopretti et al. 2007).

El tamaño de las partículas formadas a través de encapsulación puede ser clasificado en: macro ( $> 5000 \mu\text{m}$ ): micro (1,0 a 5,000  $\mu\text{m}$ ); y nano ( $<1,0 \mu\text{m}$ ). Cápsulas debajo de 1,0  $\mu\text{m}$  de tamaño son frecuentemente referidas como nanocápsulas, que a menudo se hacen por métodos de nanoencapsulación muy especializados (Seid et al. 2008). La producción de microcápsulas, involucra procesos de distinta naturaleza según sea el objetivo. Diversos métodos han sido propuestos para la producción de microcápsulas; en general, estos métodos pueden ser divididos en tres grupos: físicos, químicos o fisicoquímicos, presentado en la Figura 1, donde se mencionan algunos ejemplos, siendo uno de los más importante el secado por aspersión, ya que es un método efectivo y económico para la protección de materiales y que está siendo ampliamente utilizado en la industria de alimentos (Lopretti et al. 2007). La selección del proceso de encapsulación para una aplicación se considera el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Yáñez et al, 2005).

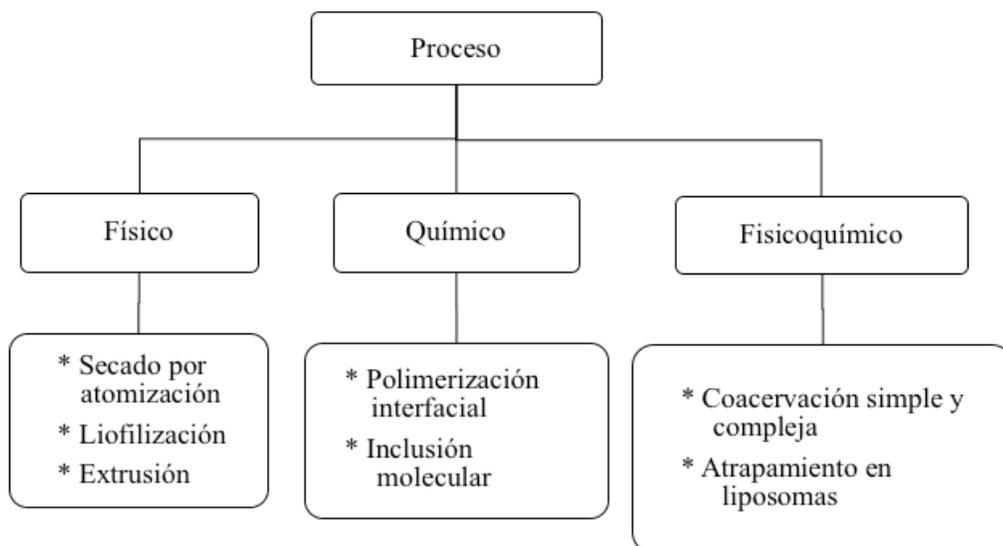


Figura 1. Procesos para la obtención de microcápsulas.

## 2.4.1 Proceso para la obtención de microcápsulas

### 2.4.1.1 Secado por atomización

Recientemente, se ha extendido un gran interés hacia el desarrollo de productos preformulados utilizando el secado por aspersión, conocido también como secado por atomización, pulverización, spray, rocío o "spray drying". Este método se ha utilizado desde principios del siglo XX, aunque existen patentes sobre equipos para el secado por aspersión de huevos y leche desde 1850, su aplicación en la industria de alimentos surgió en 1913 en un proceso desarrollado para la leche (López, 2010). El proceso de secado por atomización es una operación básica que consiste en la transformación de una suspensión o disolución en un material seco particulado, mediante la atomización del primero en un medio caliente y seco. El secado por atomización de gotas es utilizado en muchas aplicaciones industriales de los sectores cerámico, químico, alimentario, farmacéutico (Mondragón et al. 2013).

### 2.4.1.2 Liofilización

Una de las técnicas de secado utilizada para retardar en altas proporciones la calidad nutricional, el sabor y las propiedades físicas de los productos es la liofilización. Este proceso de secado se basa fundamentalmente en la sublimación del agua, abarca tres etapas: el congelamiento del producto, el secado primario y el secado secundario (Salazar

et al. 2016). Permite reducir las pérdidas de los compuestos volátiles o termosensibles, considerado como uno de los más nobles procesos de conservación de productos biológicos, sin el uso de conservantes y productos químicos, siendo adecuado para preservar células, enzimas, vacunas, virus, levaduras, sueros, derivados sanguíneos, algas, así como frutas, vegetales, carnes, pescado y alimentos en general (Ramírez, 2006).

#### **2.4.1.3 Extrusión**

En esta técnica, la emulsión del material activo y del recubrimiento generan gotas al pasar por un dispositivo extrusor a alta presión. Comúnmente, un material utilizado como recubrimiento es el alginato de calcio. Esta técnica ha sido aplicada para encapsular microorganismos, enzimas, ácidos grasos y prebióticos, generando microcápsulas menos porosas que otras técnicas como secado por aspersión. Consideraciones del proceso es que se duplica el costo y el empleo de extrusores de tornillos a alta presión, que ocasionan grandes fuerzas de cizallamiento, que no son benéficos a la estabilidad de materiales sensibles como el aceite omega-3 (Nava et al. 2015).

#### **2.4.1.4 Polimerización interfacial**

Esta técnica consiste en disolver un monómero hidrofóbico polimerizable en un material activo hidrofóbico, que ocasiona que la mezcla sea dispersa en una fase polar mientras un catalizador genera la polimerización del monómero, haciendo insoluble el polímero en la sustancia activa hidrofóbica y se sitúa como cubierta de la sustancia activa. Los materiales de recubrimiento son principalmente polímeros como poliamidas, poliuretanos y nylon; siendo utilizados ampliamente para realizar microcápsulas de proteínas, farmacéuticos, entre otros (Yáñez et al. 2005). Jiang et al. (2012), obtuvieron microesferas de ácidos carboxílicos por polimerización interfacial, exhibiendo superparamagnetismo y magnetización de alta saturación, generando interés por su aplicación para bioseparación, liberación de fármacos y biocatálisis.

#### **2.4.1.5 Coacervación simple y compleja**

Es un método que consiste en la separación de fases, en el cual el soluto polimérico es separado en gotas pequeñas que constituye el coacervado y la otra fase sin polímero es

llamada solución de equilibrio. En la coacervación simple esta presente solo un polímero, mientras que en la compleja interactúan dos coloides opuestamente cargados. Las microcápsulas finales son formadas por la gelificación de las cápsulas que previamente se generaron cuando el coacervado se deposita alrededor de partículas insolubles dispersas en un líquido. La coacervación fue introducida en 1929 para detallar el fenómeno de separación de fases líquidas (dos fases líquidas, un coacervado y un sobrenadante), que tenía lugar en un sistema coloidal (Maji et al. 2007). El uso de este método se ha usado para realizar microcápsulas de enzimas, ácidos grasos, aminoácidos, entre otros utilizando diversos polímeros como polivinílico (Yáñez et al. 2005).

#### **2.4.1.6 Atrapamiento en liposomas**

Para la protección de ingredientes se utilizan liposomas como material recubriente, el cual es utilizado comúnmente para aplicaciones farmacéuticas, con la finalidad de controlar la liberación de ingredientes encapsulados, pero ha generado tal interés que en años recientes ha iniciado su uso en alimentos. Los fosfolípidos son los agentes encapsulantes más utilizados debido a que una vez mezclados con el agua sufren un rearrreglo (Yáñez et al. 2005). Compuestos solubles en agua y solubles en lípidos pueden ser encapsulados por esta técnica al mismo tiempo, debido a que los solubles en agua pueden ser envueltos dentro de las gotas y los solubles en lípidos en el material de recubrimiento. Los ingredientes encapsulados exhiben una alta actividad acuosa comparada con otras técnicas como secado por atomización, extrusión, siendo una de las ventajas que presenta esta técnica, sin embargo, los altos costos y la baja estabilidad fisicoquímica durante el proceso limitan su uso en la encapsulación principalmente de compuestos como aceites ricos en omega-3 (Barrow et al. 2013).

Para generar algunas microcápsulas se requiere desarrollar la encapsulación en emulsiones y posteriormente realizar el secado para el cambio de estado líquido a sólido y prolongar la vida de anaquel.

### 2.4.1.7 Emulsiones

Existen dos principales técnicas de emulsión que permiten llevar a cabo los diferentes procesos de microencapsulación siendo la emulsión aceite en agua (Oil/Water: O/W) y agua en aceite (Water/Oil: W/O) (Lopretti et al. 2007).

Una emulsión simple se obtiene cuando dos líquidos inmiscibles, como aceite y agua, se agitan y forman gotas de un líquido en otro. Estas gotas de un líquido en otro es lo que se conoce como una emulsión. Las emulsiones pueden ser entonces de dos tipos: una en la cual las gotas (fase dispersa) son de agua o solución acuosa y la fase en donde están inmersas las gotas (fase continua) es aceite, el otro tipo de emulsión es la inversa; gotas de aceite en una fase continua acuosa. Las primeras se denotan como emulsiones agua en aceite (W/O), ejemplos de estas son mantequilla, margarina y algunos *spreads* y las aceite en agua (O/W), siendo ejemplos la leche, cremas, helado, *dressings*, mayonesas, bebidas, sopas, *dips* y salsas (Alfaro, 2012). En la Figura 2, se muestran los dos tipos de emulsiones mencionadas (Cárdenas, 2003).

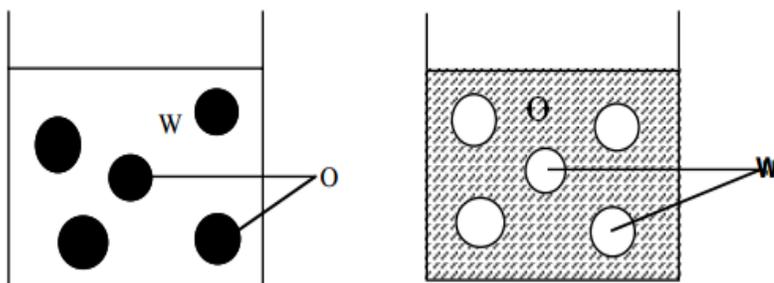


Figura 2. Tipos de emulsiones (W/O; O/W)

En la industria de los alimentos, usualmente estos líquidos son aceite y agua, sin embargo no siempre es así. El tamaño del diámetro de las gotas esféricas en el producto emulsificado alimenticio puede variar entre el rango de 0.1 a 100  $\mu\text{m}$  (Alfaro, 2012). Es necesario evitar que al cesar la agitación las gotas se unan de una vez. Para lograr la estabilidad de las emulsiones se necesita entonces un tercer componente conocido como “surfactante”. Este componente se ubica en la superficie de las gotas de la emulsión y evita o retarda la coalescencia de las gotas, haciendo de esta forma la emulsión “estable” (Cárdenas, 2003). El término “surfactante” se utiliza para referirse relativamente a

aquellas pequeñas moléculas tensoactivas que constan de una “cabeza” grupo hidrófilo, que tiene una alta afinidad por el agua que se adjunta a una “cola” grupo lipófilo, que tiene una alta afinidad por el aceite. El principal papel de los surfactantes en una emulsión es mejorar la formación de la emulsión y su estabilidad. Una amplia variedad de tensoactivos están disponibles para uso en productos alimenticios. Por otro lado, un agente estabilizante es un compuesto químico (o mezcla) que confiere estabilidad a la emulsión a largo plazo, posiblemente por un mecanismo de adsorción, pero no necesariamente. Los estabilizantes son generalmente biopolímeros como proteínas y polisacáridos (McClements, 2005; Ruiz, 2004). El mecanismo por el que estabilizan los polisacáridos es vía modificación de las propiedades reológicas del medio de dispersión (viscosidad o gelación de la fase acuosa continua) (Dickinson, 2003), es decir tiene la capacidad de aumentar la viscosidad o la formación de una red de gel en fase continua (Mey-Chuah et al. 2008); mientras que en el caso de las proteínas, la estabilización se debe a que tienen una fuerte tendencia a adsorberse en las interfases aceite-agua y formando capas estabilizadoras alrededor de las gotas de aceite.

#### **2.4.1.7.1 Material de pared**

Los principales materiales encapsulantes utilizados son carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, sacarosa, dextrana, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa); gomas (arábiga, mezquite, guar, xantana, carragenina); lípidos (ceras, parafinas, grasas, ácido esteárico, tristearina, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, zeína, gluten, caseína). Estos encapsulantes deben de tener la capacidad de proporcionar una emulsión estable durante el proceso de secado por aspersion y tener muy buenas propiedades de formación de película para proveer una capa que proteja al ingrediente activo de la oxidación (Desai y Park 2005).

Hay un número de recubrimientos disponibles y aprobados comercialmente para producir diversos alimentos microencapsulados. No todos los materiales de protección satisfacen todas las propiedades, es necesario utilizar a menudo en combinación con otros materiales de revestimiento con otras propiedades modificadoras tales como eliminadores de oxígeno, antioxidantes, agentes quelantes y tensoactivos (Ré, 1998). Las proteínas y los

polisacáridos son dos de los biopolímeros funcionales más importantes añadidos en los productos alimenticios basados en la emulsión para controlar la estabilidad, la textura, tiempo de conservación, y la apariencia general de emulsiones de alimentos. La proteína de suero (WPI por sus siglas en inglés) es un excelente emulsionante y ampliamente utilizado en las emulsiones de alimentos debido a sus propiedades de superficie activa. WPI es adsorbida en la interface aceite-agua para formar una película protectora y proporcionar soporte estructural para las gotitas de aceite a través de una combinación de interacciones electrostáticas y estéricas (Changhui y Gunasekaran, 2010). La selección de las combinaciones de materiales de pared puede afectar las propiedades de la emulsión, tales como estabilidad, viscosidad, tamaño de las gotas, por consecuencia las características de las partículas después del secado y durante el almacenamiento como las propiedades del polvo tales como aceite superficial, tamaño de partícula, densidad, morfología y estabilidad oxidativa, siendo influenciadas por el tipo de agente de encapsulación utilizado (Carneiro et al. 2013). Existen diversos autores que han realizado estudios sobre la estabilidad de aceites, particularmente de aceite esencial de naranja e incluso de sus componentes de forma individual. Sin embargo, existen muy pocos estudios en relación a aceites concentrados encapsulados.

Tsung-Shi et al. (2011), evaluaron el efecto de la lecitina y pectina sobre la oxidación fotosensibilizada de riboflavina con aceite de naranja en la estabilidad de la emulsión mediante tamaño de partícula, viscosidad y potencial Z. Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de lecitina y pectina tiene efectos significativos sobre la estabilidad oxidativa del aceite de naranja durante la oxidación fotosensibilizada, y no se encontró efecto interactivo entre los contenidos de los compuestos, sugiriendo una proporción para el contenido de lecitina y pectina de 14.1 y 19 respectivamente.

Li et al. (2011), investigaron los efectos de la maltosa sobre la estabilidad y las propiedades reológicas de la emulsión de naranja (aceite en agua: O/W) desarrollada con almidón de maíz modificado con anhídrido octenil succínico, evaluando el índice de cremado, tamaño de partícula y propiedades reológicas durante el almacenamiento. La emulsión sin maltosa durante un almacenamiento de un mes mostró inestabilidad, contrario a la que contenía maltosa que es más estable, siendo el almidón modificado

importante en la estabilización adsorbiendo en la interfaz de la emulsión, sin embargo, al aumentar el contenido de maltosa, los resultados de las características reológicas aumentaban sus propiedades viscoelásticas, mejorando la estructura elástica de la emulsión.

Djordjevic et al. (2007a), realizaron estudios sobre la encapsulación de componentes de sabor de los aceites cítricos como citral y limoneno, ambos pueden generar degradación química que produce una pérdida de sabor y la posible formación de sabores desagradables, considerando que en emulsión pueda inhibir las reacciones químicas y estabilidad de los compuestos, utilizando como materiales de pared dos opciones dodecilsulfato de sodio (SDS) con quitosano y solo goma arábica. Reportando que el citral se degrada menos utilizando goma arábica, sin embargo, las emulsiones utilizando SDS-quitosano fueron más efectivas para retardar la formación de compuestos de oxidación, para el limoneno estabilizado con SDS-quitosano fue menor la formación de productos de oxidación que la goma arábica, considerando que la capacidad de un sistema emulsionante de SDS-quitosano puede disminuir las interacciones prooxidantes de los compuestos. Otra investigación utilizando aislado de proteína de suero de leche (WPI, por sus siglas en inglés), menciona que es más efectiva que la goma arábica, reportando que la WPI generó menor degradación del limoneno que utilizando goma arábica, en dos pH (3 y 7) sugiriendo que la WPI podría ser capaz de inhibir el deterioro oxidativo del limoneno en emulsiones de aceite en agua (Djordjevic et al. 2008b).

Hye-Sook et al. (2011), realizaron la preparación de emulsiones con aceite de pescado utilizando  $\beta$  y  $\gamma$ -ciclodextrinas y concentrado de proteína de suero de leche en varias proporciones; siendo la  $\gamma$ -ciclodextrina más eficiente que la  $\beta$ -ciclodextrina para este aceite, mejorando la estabilidad de la emulsión y la eficacia de la encapsulación con un 80%; reportando que con una cantidad mayor de ciclodextrina y menor cantidad de concentrado de proteína de suero de leche se generaron partículas más pequeñas, además de reducir un 30% del olor del aceite de pescado encapsulado.

Mirhosseini et al. (2008), realizaron una emulsión para una bebida de naranja diluida, utilizando aceite de naranja y como materiales de pared goma xantana y goma arábica,

evaluando la liberación del sabor en la bebida, con 13 compuesto de sabor volátiles incluidos el mirceno, limoneno, octanal linalool entre otros. Concluyendo que la emulsión de bebida de naranja que contenía 15.87 % de goma arábica, 0.5% de goma xantana y 10% de aceite de naranja proporciona la liberación de aroma.

Rao y McClements (2012), estudiaron la influencia de formación y propiedades de emulsiones (aceite en agua) utilizando aceite concentrado de limón (1x, 3x, 5x y 10x). Los resultados de la densidad, tensión interfacial, viscosidad e índice de refracción de los aceites aumentaba a medida que era más concentrada (es decir,  $1 < 3 < 5 < 10$ ), de igual manera, la estabilidad estuvo influenciada según el aceite concentrado, siendo los aceites más inestables el 1x, 3x y 5x, atribuyendo a la maduración de Ostwald, difusión del aceite de limón de pequeñas gotas a grandes, el aceite concentrado 10x fue estable al crecimiento de gotas.

#### 2.4.1.7.2 Estabilidad de emulsiones

El proceso de ruptura de las emulsiones puede ocurrir mediante cuatro mecanismos de inestabilidad diferentes. La Figura 3, muestra una representación gráfica de cada uno de los procesos (Aranberri et al. 2006).

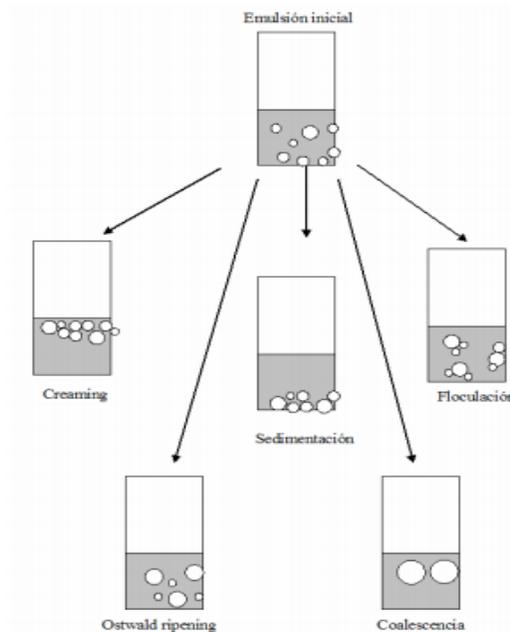


Figura 3. Mecanismos que contribuyen a la inestabilidad de las emulsiones.

- “*Creaming*” o sedimentación. Se trata de un proceso causado por la acción de la gravedad y produce un gradiente vertical de concentración de las gotas sin variar la distribución del tamaño de las mismas (Aranberri et al. 2006).
- Floculación. Es la adhesión de las gotas sin fusionarse y una vez más no existe una variación en la distribución de tamaño de gotas. El proceso de la floculación está controlado por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción electrostáticas de van der Waals, y repulsivas de tipo estéricas y de hidratación (Aranberri et al. 2006).
- Coalescencia. Es la fusión de gotas para crear unas gotas más grandes con la eliminación de parte de la interfase líquido/líquido. Este cambio irreversible requeriría un aporte extra de energía para restablecer la distribución de tamaño de partícula original. El proceso de inestabilidad debido a la coalescencia está relacionado con la curvatura preferida y con la rigidez de la capa del tensoactivo que estabiliza la emulsión (Aranberri et al. 2006).
- Engrosamiento de gotas (*Ostwald ripening*). Se debe al crecimiento de las gotas más grandes a costa de las más pequeñas hasta que éstas últimas prácticamente desaparecen. Este proceso ocurre a una velocidad que es función de la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua y se debe a que la presión interna de las gotas (presión de Laplace) es mayor en las gotas más pequeñas (Aranberri et al. 2006).

El complejo proceso de la inestabilidad de las emulsiones suele ocurrir mediante la combinación de los cuatro posibles procesos de inestabilidad que pueden suceder simultáneamente a diferentes velocidades. Dos de los procesos anteriormente citados se suelen acoplar. Por ejemplo, las velocidades de flotación en las emulsiones diluidas son más rápidas en sistemas floculados que en los no-floculados debido al aumento del tamaño de partícula flotante en el primer caso (Aranberri et al. 2006).

Para ello se utilizan los emulsificantes, que son moléculas superficialmente activas que se absorben en la superficie de las gotas, formando una membrana protectora que retarda la aproximación de las gotas y su agregación, fomenta la formación de la emulsión y estabilización a corto plazo por acción interfacial. Los emulsionantes más utilizados en la

industria alimentaria son pequeñas moléculas surfactantes, biopolímeros anfífilicos y la materia particulada de superficie activa.

#### 2.4.1.8 Inclusión molecular

Las ciclodextrinas (CDs) se obtienen durante la degradación del almidón ocasionada por la enzima ciclodextrina glucotransferasa (CGTasa) de *Bacillus macerans*. Consisten en una serie de oligosacáridos cíclicos formados por seis ( $\alpha$ -CD), siete ( $\beta$ -CD) u ocho ( $\gamma$ -CD) unidades de glucosa, unidas entre sí por enlaces  $\alpha$ -D (1-4), dando lugar a una estructura molecular toroidal, rígida y con una cavidad interior de volumen específico, se describe como una forma de cono truncado, mostrada en la Figura 4 (De Garcia et al. 2008). Los grupos hidroxilo primarios en posición 6 están localizados en el lado más estrecho del toroide, mientras que los grupos hidroxilo secundarios se ubican en el lado más ancho del mismo (Martínez y Gómez 2007).

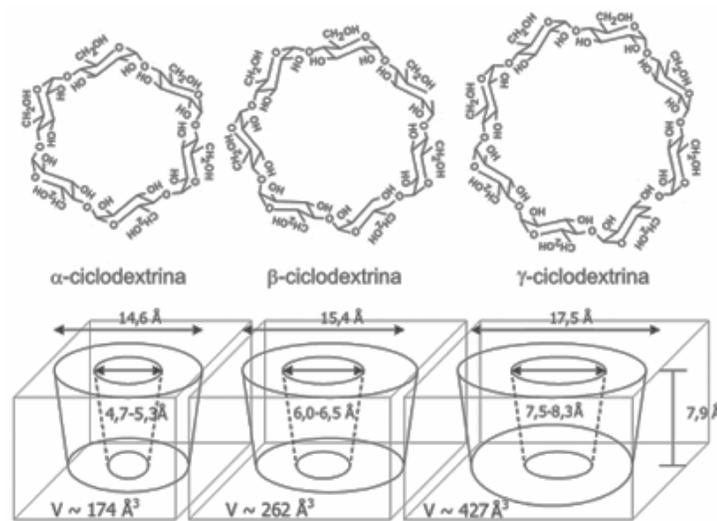


Figura 4. Estructura de la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CD

Independientemente de los detalles de la estructura, la característica más importante de CDs es su cavidad, porque esto permite formar complejos de inclusión con pequeños invitados moleculares de un tamaño adecuado, forma y polaridad (de naturaleza orgánica o inorgánica) (Astray et al. 2010). En los últimos años, varias revisiones han sido publicadas describiendo el uso de CDs en aplicaciones de alimentos. Las CDs han sido recomendadas para aplicaciones en el procesamiento de alimentos como aditivos

alimentarios con una variedad de objetivos: (I) para proteger los componentes lipofílicos de alimentos que son sensibles al oxígeno y a la degradación inducida por la luz o el calor; (II) para disolver colorantes y vitaminas; (III) para estabilizar fragancias, sabores, vitaminas y aceites esenciales contra cambios no deseados; (IV) para suprimir olores o sabores desagradable; y (V) para lograr una liberación controlada de ciertos constituyentes de los alimentos. Dentro de la producción de alimentos, el sabor juega un importante papel en la satisfacción de los consumidores e influye en el consumo adicional, debido a que durante el proceso de elaboración, de almacenamiento, uso de ingredientes y material de empaque pueden causar modificaciones en el sabor (reducir la intensidad de aroma o producir un mal sabor); la encapsulación de ingredientes volátiles, permite limitar la degradación de aroma o pérdida durante el procesamiento o almacenamiento de alimentos y/o bebidas (Astray et al. 2010).  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) es el tipo más común de ciclodextrina, aunque la cavidad es básicamente lipófila y su superficie exterior hidrófila, las moléculas de agua son huéspedes que llenan el espacio de la cavidad de la ciclodextrina. Sin embargo, la cavidad lipófila de  $\beta$ -CD proporciona un microambiente en el que el tamaño apropiado de las fracciones apolares puede entrar a formar complejos de inclusión (Madene et al. 2005).

Para lograr un complejo de inclusión exitoso, se deben producir interacciones entre la molécula huésped y la CD, es decir, que exista una interacción hidrofóbica, acompañada de varios factores entre ambas como lo es la entalpía y entropía, además se pueden generar diferentes interacciones entre ellas como lo son la formación de puentes de hidrógeno entre ambas moléculas (huésped y grupos hidroxilo de la CD); puede haber pérdida de energía ocasionada por las moléculas de agua que hay en el interior de la cavidad de la CD. La unión entre la CD y la molécula huésped no es fija o permanente, sino que es un equilibrio dinámico gobernado por una constante, cuya fuerza depende del tamaño relativo de la molécula complejada y de las interacciones establecidas entre la CDs y la molécula complejada (Schneiderman y Stalcup, 2000). Esta propiedad ha sido ampliamente utilizada en las industrias de alimentos, farmacéutica y cosmética encapsulando componentes activos (antioxidantes, vitaminas, aceites esenciales, colorantes) para mejorar su estabilidad, solubilidad y eficacia (Fang et al. 2013).

Recientemente, se ha incrementado el interés por la microencapsulación de aceites esenciales (Dos Passos et al. 2016; Haloci et al. 2014; Kfoury et al. 2015; Petrovič et al. 2010) e incluso de compuesto de forma individual (Duarte et al. 2015; Ferreira et al. 2013) utilizando ciclodextrinas naturales o modificadas, por diferentes métodos de obtención, evaluando las propiedades fisicoquímicas de los complejos de inclusión mediante diversas técnicas como espectrometría infrarroja con transformada de Fourier, permitiendo el estudio de los cambios en las características espectrales de las moléculas huésped (Calabro et al. 2004; Manthey 2006).

Galvão et al. (2015), desarrollaron complejos de inclusión con  $\beta$ -CD con aceite esencial de *Citrus sinensis* por el método de pasta y co-precipitación con la finalidad de aumentar la solubilidad acuosa del aceite y estudiaron la actividad biológica contra larvas de *Aedes aegypti* Linn. Evaluaron las propiedades fisicoquímicas de los complejos mediante análisis térmico, difracción de rayos X, espectrometría infrarroja con transformada de Fourier y microscopía electrónica de barrido, además el contenido de aceite y la solubilidad de los complejos. El estudio demostró que el aceite esencial de naranja formo efectiva en inclusión molecular con  $\beta$ -CD, siendo eficaz contra las larvas, la evaluación de las propiedades fisicoquímicas sugirió la formación de los complejos, obteniendo que el mejor método era el de pasta, con el mayor contenido de inclusión (78.5%). Concluyendo que el producto se convierte en una alternativa ambientalmente segura (biodegradable, no tóxica y económicamente viable) para controlar las larvas de *A. aegypti*.

Kringel et al. (2016), realizaron estudios en complejos de inclusión con aceite esencial de naranja Valencia utilizando el método de precipitación; realizaron la caracterización a través del análisis por microscopía electrónica de barrido y calometría diferencial de barrido. Mostrando resultados que fue posible producir un complejo de inclusión entre el aceite esencial de naranja.

Zhu et al. (2014), consideraron que el sabor juega un importante papel en los alimentos siendo la encapsulación un método para evitar la pérdida de ingredientes aromáticos volátiles proporcionando protección y mejorar la estabilidad. Por lo cual, desarrollaron complejos de inclusión por método de precipitación con  $\beta$ -CD y sabor de naranja dulce;

logrando la formación de los complejos dando conocimiento en la interacción de la  $\beta$ -CD con las moléculas huésped, considerando que las ciclodextrinas son un buen material de pared para la generación de microcápsulas.

Fang et al. 2013, estudiaron el efecto de la encapsulación de D-limoneno en diferentes concentraciones (0, 3, 7.5, 9.68 g/ 100g) sobre la propiedad de adsorción de humedad de la  $\beta$ -CD; obteniendo que al incrementar el contenido de limoneno reducía significativamente la capacidad de adsorción de humedad de  $\beta$ -CD, causada por la disminución de los sitios de adsorción, siendo importante debido a que la  $\beta$ -CD es un material de pared comúnmente utilizado para la encapsulación de bioactivas, su propiedad de adsorción de humedad es importante para la estabilidad de los componentes encapsulados, considerando relevante para la predicción de la estabilidad de almacenamiento del limoneno encapsulado en  $\beta$ -CD.

Menezes et al. (2014), investigaron el desarrollo y caracterización de complejos de inclusión del  $\beta$ -CD con linalool, que es un compuesto presente en los aceites esenciales de varias plantas aromáticas incluyendo las cítricas, que han hecho referencia que tiene propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, en modelos de animales. Para la obtención utilizaron tres métodos, mezcla física, pasta y de suspensión, caracterizándolos por colorimetría de barrido diferencial, análisis termogravimétrico, espectroscopía FTIR entre otros. Los resultados mostrados indican que hubo una complejación principalmente en el método de pasta, siendo de gran importancia para la preservación y uso de este compuesto para la incorporación en la industria.

Abarca et al. (2016), consideraron importante utilizar diversas aplicaciones para el desarrollo de materiales de envasado con activos antimicrobianos, considerando que la mayoría de los compuestos antimicrobianos son volátiles y requieren protección. Estudiaron los complejos de inclusión con 2-nonanona con  $\beta$ -CD en relaciones 1:0.5, 1:1 y 1:2 mediante el método de co-precipitado, evaluaron la eficiencia de atrapamiento, análisis térmico, difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y la actividad antifúngica. Obteniendo que la mayor eficiencia de atrapamiento

fue de 34.8%, para la relación 1:0.5, los análisis realizados a los complejos sugerían una complejación entre los compuestos; en las pruebas antimicrobianas para la reducción del crecimiento micelial mostraron comportamiento fungistático contra *Botrytis cinerea*.

Por su estructura, las ciclodextrinas (CD) pueden formar complejos de inclusión sobre una base molecular con compuestos lipófilos (por su cavidad), mejorando la solubilidad, dispersabilidad y absorción acuosa. Estudios realizados en compuestos como la curcumina (compuesto lipofílico) con beneficios para la salud óptimos, sin embargo, con baja solubilidad en agua y una absorción intestinal deficiente. Purpura et al. (2016), investigaron la biodisponibilidad de una fórmula de curcumina con  $\gamma$ -ciclodextrina, siendo comparada con un extracto sin encapsular y 2 formulaciones comerciales disponibles con un supuesto incremento en la disponibilidad. Utilizaron doce voluntarios humanos sanos, determinando al inicio y diversos intervalos en las concentraciones de plasma de los curcuminoides que están presentes en la cúrcuma, administradas oralmente durante un periodo de 12 h. Los resultados mostraron que la formulación utilizando  $\gamma$ -CD, mostraba mayores concentraciones plasmáticas de curcumina, demetoxicurcumina y curcuminoides totales, generando un incremento (39 veces) biodisponibilidad relativa en comparación de formulaciones sin encapsular; sugiriendo que las formulaciones de curcumina con  $\gamma$ -CD mejora significativamente la adsorción de curcuminoides en humanos sanos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se busca cada día más en la industria de alimentos el uso de más ingredientes naturales que puedan proveer de beneficios a la salud, sin que estos puedan ser perjudiciales. El aceite esencial de naranja es extraído de su cáscara brindando beneficios en la medicina preventiva e industria de alimentos como ingrediente con actividades antioxidantes, antimicrobianas, entre otras. El aceite esencial de naranja puede ser concentrado, es decir, retirar aquellos compuestos volátiles, aumentando compuestos que otorgan las propiedades antes mencionadas. Sin embargo, este tipo de compuestos son susceptibles a factores ambientales como la temperatura, pH, el oxígeno, además ser afectados por procesos tecnológicos industriales. Debido a esto, ha sido necesaria la búsqueda de nuevas técnicas para reducir la inestabilidad y prolongar la vida útil de estos compuestos, para lo cual, se requiere la utilización de tecnologías, que los protejan de los factores que puedan deteriorarlos. Una de las tecnologías es la microencapsulación y su aplicación en alimentos. Este proceso evita la degradación prematura de compuestos de alto valor alimenticio con propiedades funcionales, para dotar de mayor calidad nutricional a los alimentos enriquecidos con los mismos. Para el desarrollo de la microencapsulación se realizan primeramente emulsiones sencillas y/o múltiples y posteriormente alguna técnica de secado; otra manera de encapsular los compuestos es mediante inclusión molecular mediante el uso de ciclodextrinas. Por consiguiente, la presente propuesta está dirigida al uso de nuevas tecnologías protectoras como la microencapsulación por medio de emulsiones, aprovechamiento de las propiedades de biopolímeros para ser utilizados como material de pared y de esta manera proteger, mantener y resguardar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del aceite esencial de naranja para que pueda ser utilizado como un aditivo en la industria de alimentos y pueda llegar a tener un mayor valor nutritivo en la ingesta del consumidor.

#### **4. HIPÓTESIS**

El aceite esencial de naranja y sus concentrados incorporados en microcápsulas desarrolladas mediante emulsiones e inclusión molecular con biopolímeros y  $\beta$ -CD, se estabilizan y preservan su actividad antimicrobiana y antioxidante.

## 5. OBJETIVO

### Objetivo General

Evaluar el efecto estabilizante y preservador de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de microcápsulas de aceite esencial de naranja y sus concentrados, desarrolladas mediante emulsiones e inclusión molecular con biopolímeros y  $\beta$ -CD

### Objetivos Particulares

- Caracterizar mediante cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC/MS) el aceite esencial de naranja y sus concentrados obtenido por prensado en frío y destilación fraccionada.
- Determinar la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial de naranja, sus concentrados (5x, 10x y 20x) y D-limoneno.
- Desarrollar emulsiones con aceite esencial de naranja y sus concentrados utilizando  $\beta$ -CD y biopolímeros y determinar su estabilidad física.
- Evaluar la cinética de actividad antioxidante de aceites concentrados de naranja (5x, 10x y 20x), en emulsión almacenadas a diferentes temperaturas.
- Obtener y caracterizar complejos de inclusión con  $\beta$ -CD de los aceites concentrados de naranja (5x, 10x y 20x) a través del método de co-precipitado.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los complejos de inclusión de la  $\beta$ -CD con los aceites concentrados de naranja (5x, 10x y 20x).
- Evaluar la capacidad antimicrobiana los complejos de inclusión de la  $\beta$ -CD con los aceites concentrados de naranja (5x, 10x y 20x) sobre microorganismos de importancia en la industria de alimentos.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Material**

El aceite esencial de naranja (AN) y los aceites concentrados de naranja (5x, 10x y 20x) fueron proporcionados por Frutech International Mexico, el D-limoneno (DL) fue adquirido en SIGMA-Aldrich México. La beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD) fue proporcionada por Wacker México, concentrado de proteína de suero (WPC, por sus siglas en inglés) y goma xantana (XG) fueron adquiridos comercialmente. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

### **6.2 Métodos**

#### **6.2.1. Caracterización del aceite esencial de naranja y sus concentrados**

El aceite esencial de naranja fue obtenido industrialmente por prensado en frío, posteriormente mediante la destilación fraccionada utilizando una columna de platos con empaque estructurado al vacío se obtuvieron los aceites concentrados de naranja 5x, 10x y 20x. Las condiciones de los parámetros utilizados durante la destilación, se ajustaron en base a la composición inicial del aceite esencial de naranja para obtener un producto final con una composición deseada, en base a las especificaciones del producto requerido por los clientes. Un intervalo de presiones de 5–20 mbar y con reflujo a temperaturas entre 80–100°C.

#### **6.2.2 Análisis cromatográfico del aceite esencial de naranja y sus concentrados**

El análisis se realizó de acuerdo a Liu et al. (2012), con algunas modificaciones. Cromatógrafo de gases 7890B acoplado a un espectrómetro de masas 5977A con una columna capilar HP 5MS: 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m (Agilent Technologies. Santa Clara, CA, USA). Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura del Inyector fue de 250 °C y la temperatura de la fuente de ionización y el cuadropolo fue 230 y 150 °C respectivamente. Se utilizó helio como gas acarreador con un flujo de 1.0 mL/min. El tipo de ionización fue por impacto electrónico con 70 eV, el modo de adquisición fue Scan con rango de 30 a 400 uma. La temperatura del horno fue 70 °C, se mantuvo por 1min, después se alcanzó la temperatura de 200 °C con una rampa de 10 °C/min, esta temperatura se

mantuvo por 2 min, una segunda rampa de 10 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 300 °C esta se mantuvo por 5 minutos. Se utilizaron como estándares: D-limoneno, linalool, decanal,  $\alpha$ -terpineol y valenceno.

### **6.2.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo**

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Salmonella typhi* ATCC 19430, adquirida de la Colección de cepas típicas americanas (American Type Culture Collection ATCC), *Bacillus cereus* ATCC13061, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, fueron donadas por el laboratorio de Microbiología Sanitaria, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Las cepas fueron conservadas a -80°C en medio infusión cerebro corazón (ICC) con 20% v/v de glicerol y cultivadas en caldo ó agar Müeller Hinton (MH). En el caso de *Listeria monocytogenes* se utilizó medio soya tripticasa (ST) tanto para su conservación como para su cultivo. Para la activación de bacterias, se tomó una alícuota (50 $\mu$ L) del cultivo en congelación y se adicionó a un tubo conteniendo 5 mL de caldo Muller Hinton o Soya tripticasa según fuese el caso. Se incubaron a 37 °C durante 18 h. Posteriormente, se tomó una alícuota (10  $\mu$ L) de cada cultivo activado por separado, colocándose en tubos conteniendo caldo MH.

### **6.2.4 Determinación de la actividad antimicrobiana**

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en disco mencionado por Klančnik et al. 2010. Una suspensión bacteriana (ajustada al 0.5 Mc Farland  $\approx 10^7$ ) fue distribuida homogéneamente en placas con agar MH. Cinco discos de 6 mm de diámetro fueron colocados en la superficie del agar e impregnados con 10  $\mu$ L de cada compuesto. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Transcurrido ese tiempo se midieron los halos de inhibición alrededor de los discos, definiéndose la actividad antimicrobiana como la ausencia de crecimiento bacteriano en la zona que rodea los discos. Para *Listeria monocytogenes*, se procedió de la misma forma mencionada utilizándose el agar soya tripticasa. El ensayo se realizó tres veces por duplicado. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril y DMSO. Como control positivo se utilizó gentamicina a una concentración de 400  $\mu$ g/mL.

### **6.2.5 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB)**

Para la determinación de la CMI y CMB se utilizó el método de dilución en tubo de acuerdo al método mencionado por Castillo et al. (2011), con algunas modificaciones. Alícuotas (50  $\mu$ L) de cultivos activados y ajustados (0.2 O.D.<sub>600nm</sub>) ( $1 \times 10^7$ ) de cada bacteria, fueron adicionados por separado en tubos conteniendo 5 mL de caldo Mueller Hinton con diferentes concentraciones de AN, DL y las fracciones concentradas (0.25-0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5 mg/mL concentración final en el tubo por cada uno de los aceites o concentrados utilizados), se incubaron a 37 °C por 24 h. Posterior al tiempo de incubación, se realizó una cuenta en placa, definiéndose la CMI como la concentración menor que causara una disminución del 90% de la población bacteriana a las 24 h y la CMB aquella concentración mínima que inhiba por completo el crecimiento microbiano (Klančnik et al. 2010). Para *Listeria monocytogenes* se procedió de la misma forma, pero se utilizó el medio soya tripticasa.

### **6.2.6 Determinación de la actividad antioxidante**

La determinación de actividad antioxidante del AN, DL y fracciones concentradas, se realizó por los métodos de ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). Se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2- carboxílico 97%) como antioxidante de referencia. Para la determinación por ABTS<sup>+</sup> se realizó según el método propuesto Re et al. (1999), con algunas modificaciones. ABTS<sup>+</sup> fue generado por la reacción 7 mM de ABTS con 2.45 mM persulfato de potasio por 16 h en la oscuridad a temperatura ambiente. El ABTS<sup>+</sup> fue diluido con etanol hasta alcanzar una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  a 734 nm en un espectrofotómetro Genesys 5 (Spectronic). Para el análisis con el radical DPPH acorde al método de Brand-Williams et al. (1995), con algunas modificaciones, se pesó 3.9 mg del radical aforando a 100 mL con etanol, la solución fue medida a 517 nm en un espectrofotómetro a una absorbancia de  $1 \pm 0.05$ .

Alícuotas de 10-300  $\mu\text{L}$  de solución de los aceites esenciales con etanol fueron mezcladas con 2.7 mL de  $\text{ABTS}^+$  reaccionando por 7 minutos en oscuridad. La absorbancia de la solución fue medida a 734 nm en un espectrofotómetro. Para el análisis con DPPH se utilizaron alícuotas de 200–600  $\mu\text{L}$ , se añadió 2.25 mL del radical DPPH reaccionando por 240 minutos. La actividad antioxidante fue expresada en porcentaje de inhibición del radical obteniéndose con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_c - A_m}{A_c} \times 100$$

Donde  $A_c$ = absorbancia del control,  $A_m$ = absorbancia de la muestra.

Se realizó una curva de calibración con el estándar de Trolox para cada radical (ABTS y DPPH), en un rango de 10-160  $\mu\text{M}$ . Cada muestra fue determinada por triplicado.

### **6.2.7 Desarrollo de emulsiones utilizando $\beta$ -ciclodextrinas y biopolímeros**

Para el desarrollo de las formulaciones de emulsiones se utilizaron diferentes materiales de pared siendo  $\beta$ -CD, WPC y XG, en diferentes proporciones como se muestra en la Tabla 7. Se hidrataron los materiales de pared utilizados para las formulaciones de emulsiones, pesando entre 3 - 3.5 g de cada uno, mezclándose en agua destilada a temperatura de 55-60  $^{\circ}\text{C}$  por agitación magnética, en caso de la goma xantana se agitaron durante 2 h en una propela a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Se realizó la medición de porcentaje de sólidos totales mediante un refractómetro Abbemat 300, el resultado nos permite conocer la concentración de cada material de pared a utilizar. La fase acuosa fue la  $\beta$ -CD y WPC, fase oleosa el aceite esencial de naranja utilizándose una  $\Phi$  0.1 y finalmente el XG como estabilizante. Se utilizó el homogeneizador a 7500 rpm durante 5 min, posteriormente fue añadido lentamente la fase oleosa, terminando se elevó a 10000 rpm durante 5 min, finalmente se añadió la cantidad de XG manteniendo las condiciones. Se realizaron 10 fórmulas, las cuales se almacenaron a temperatura ambiente durante 30 días correspondientes al análisis de estabilidad física de las emulsiones. Una vez establecida la formulación de la emulsión más estable, ésta sería utilizada en los aceite concentrado 5x, 10x y 20x, para evaluar su actividad antioxidante durante 93 días.

### 6.2.7.1 Análisis del tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula de las emulsiones como son el diámetro promedio superficial  $[D_{3,2}]$  y diámetro promedio volumétrico  $[D_{4,3}]$ , se determinaron con el equipo analizador de tamaño de partícula Malvern Mastersizer 3000. Se tomó de 3-4 gotas de cada emulsión, utilizando agua destilada como líquido dispersante.

### 6.2.7.2 Análisis del índice de cremado

En un tubo cónico de plástico graduado (15 mm de diámetro interno y 125 mm de altura) se colocaron a 10 cm de cada emulsión y fueron almacenadas a temperatura ambiente durante el tiempo del análisis, según Charoen et al. (2010). Al término del tiempo de almacenamiento, se realizó el cálculo con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de cremado} = 100 \times (H_1/H_3)$$

Se determinó por la medición de la altura de la capa opaca ( $H_1$ ) y altura total ( $H_3$ ). La emulsión de mayor estabilidad es la más cercana a cero.

### 6.2.7.3 Determinación de tasa de coalescencia

La estabilidad de una emulsión se mide a través de la variación del tamaño de partícula de la emulsión respecto al tiempo, calculando de esta manera la tasa de coalescencia, a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{N_t}{N_0} = \left[ \frac{(d_{30})_{t=0}}{(d_{30})_{t=1}} \right]^3$$

Donde  $N_t$  es el número de glóbulos con respecto al tiempo (t),  $N_0$  es el número de glóbulos al tiempo cero. Al graficar  $\ln \left( \frac{N_t}{N_0} \right)$  *ln versus*, el tiempo de almacenamiento en segundos (t) para cada emulsión, se describe por Jafari et al. (2007a).

La tasa de coalescencia permite cuantificar la estabilidad de las emulsiones como:

- Muy estable:  $1 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-9}$
- Estable:  $1 \times 10^{-6}$  -  $1 \times 10^{-7}$
- Inestable:  $> 1 \times 10^{-5}$

#### **6.2.7.4 Determinación de la actividad antioxidante**

De cada emulsión se tomó 1 mL y se colocó en un tubo de centrifuga con 15 mL de etanol absoluto, se mezcló en el vortex por 2 min, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min, según Sang et al. (2011), con modificaciones. Se tomó del sobrenadante, 300 y 600  $\mu$ L para el análisis con el radical ABTS y DPPH respectivamente, la metodología posterior se siguió según el punto 6.2.6.

### **6.2.8 Formación y caracterización de los complejos de inclusión**

#### **6.2.8.1 Preparación de los complejos de inclusión**

El método de co-precipitación fue utilizado para preparar los complejos de inclusión de  $\beta$ -CD y los concentrados de acuerdo a Ayala-Zavala et al. (2008), con algunas modificaciones. Una proporción de 5 g de  $\beta$ -CD se disolvió en 50 mL de una mezcla de etanol-agua (1:2 v/v) y se mantuvo en calentamiento a 55 °C ( $\pm 2$  °C) con agitación magnética constante. Una determinada cantidad de cada aceite fue disuelta en etanol (10 % p/v), la cual fue añadida lentamente a la solución de  $\beta$ -CD, la mezcla fue agitada durante 4 h sin calentamiento. Fueron 3 relaciones utilizadas de cada aceite con la  $\beta$ -CD siendo 4:96, 12:88 y 16:84 (p/p). Posteriormente, fue refrigerada toda la noche a 4 °C. La solución fue filtrada al vacío y secada en una estufa de convección a 50 °C por 24 h. Se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

#### **6.2.8.2 Determinación del rendimiento (%)**

El rendimiento de los complejos de inclusión, se realizó de acuerdo al método mencionado por Shakouri y Krasaaekoopt (2014), con la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{P2}{P1} \times 100$$

Donde, P1 es el peso inicial de la  $\beta$ -CD y el aceite y P2 es el peso de los complejos de inclusión, ambos en gramos.

### **6.2.8.3 Determinación de la Eficiencia de encapsulación (%EE) y cuantificación del aceite encapsulado**

Acorde a Santos et al. (2015b), con ligeras modificaciones, la cantidad de aceite (5x, 10x y 20x), fue determinada espectrofotométricamente. El aceite encapsulado (atrapado en la cavidad de la  $\beta$ -CD) fue calculado del total del aceite más el aceite de la superficie de los complejos de inclusión. Para obtener la cantidad de aceite total fueron pesados 0.1 g de cada complejo de inclusión, se disolvieron en agua (5.35 mL) y hexano (2.66 mL), esta mezcla se agitó en vortex por 2 min y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min; se realizó el lavado con hexano dos veces adicionales, se retiró la parte hexánica y se aforó a 10 mL con hexano. Para obtener la cantidad de aceite superficial, se pesaron 0.1 g de los complejos de inclusión y se adicionaron 2 mL de hexano; se agitó manualmente y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Se filtró con un filtro de 0.45  $\mu$ m y finalmente se aforó a 10 mL con hexano. Se realizaron, lecturas en el espectrofotómetro UV-visible (Thermo Scientific, modelo Genesys 10S) a una longitud de onda a 313 nm. Para cuantificar el aceite, los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración realizada para cada aceite a concentraciones de 2.5 a 30  $\mu$ g/mL bajo las mismas condiciones.

La EE (%) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación

$$EE(\%) = \frac{\text{Aceite total} - \text{Aceite superficial}}{\text{Aceite total}} \times 100$$

Donde, la cantidad del aceite encapsulado es la diferencia entre la cantidad total y la cantidad superficial de los complejos de inclusión reportándose en mg de aceite/g de  $\beta$ -CD.

#### **6.2.8.4 Análisis de tamaño de partícula**

El tamaño de partícula de cada complejo de inclusión fue medido utilizando el equipo Mastersizer 3000 (Malvern Instruments), con un índice de refracción de 1.333. Se pesaron 0.07 g de cada complejo de inclusión, se utilizó isopropanol como líquido dispersante.

#### **6.2.8.5 Análisis por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)**

El análisis de los complejos de inclusión de cada aceite con  $\beta$ -CD, fueron realizados en un espectro de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR) (Perkin Elmer). Las condiciones de escáner fueron las siguientes: rango de longitud de onda de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ , resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y número de exploraciones 16, rapidez de exploración 0.2  $\text{cm}^{-1}$ , detector  $\text{LiTaO}_3$  (Toro-Sánchez et al. 2010)

#### **6.2.8.6 Análisis morfológico**

Para estudiar la morfología de las muestras, se realizaron microfotografías mediante microscopía electrónica de barrido (Merlin VP Compact, Zeiss, Alemania), las cuales se fijaron en los botones de montaje y se observaron al microscopio.

#### **6.2.9 Cepas Bacterianas y condiciones de cultivo**

Las cepas bacterianas que se utilizaron fueron *Salmonella typhi* ATCC 19430, adquirida de la colección de cepas típicas americanas (American Type Culture Collection ATCC), y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Las cepas fueron conservadas a  $-80^\circ\text{C}$  en medio infusión cerebro corazón (ICC) con 20% v/v de glicerol y cultivadas en caldo o agar Müeller Hinton (MH). En el caso de *Listeria monocytogenes* se utilizó medio soya tripticasa (ST) tanto para su conservación como para su cultivo. Para la activación de bacterias, se tomó una alícuota (50  $\mu\text{L}$ ) del cultivo en congelación y se adicionó a un tubo conteniendo 5 mL de caldo Muller Hinton o Soya tripticasa según la cepa. Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 18 h. Posteriormente, se ajustó la bacteria en espectrofotómetro a 0.1

O.D.<sub>600 nm</sub> en tubos con el medio de cultivo correspondiente para su posterior utilización. Las cepas fúngicas con las que se trabajaron fueron *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, donadas por el Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, las cuales se conservaron en agar papa dextrosa (PDA). Posterior a eso se ajustaron a  $10^4$  esporas en tubos conteniendo solución salina al 0.85% con 0.05% de Tween 80.

## **6.2.10 Determinación de la actividad biológica**

### **6.2.10.1 Preparación de la solución stock**

Se pesaron 0.1 g del complejo de inclusión correspondiente, en una solución etanol/agua a una relación 2:1, en condiciones estériles.

### **6.2.10.2 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB)**

Para la determinación de la CMI y CMB se utilizó el método de dilución en tubo. Alícuotas (10 $\mu$ L) de cultivos activados y ajustados (0.1 O.D. 600nm) ( $1 \times 10^6$ ) de cada bacteria, fueron adicionados por separado en tubos conteniendo 2 mL de caldo Mueller Hinton, en diferentes concentraciones (1.25, 2.5, 5 y 10 mg/mL) de los complejos de inclusión de 5x, 10x y 20x, incubándose a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se realizó el método por goteo en placa de Miles and Misra. Definiéndose la CMI como la concentración menor que causara una disminución del 90% de la población bacteriana a las 24 h y la CMB aquella concentración mínima que inhiba por completo el crecimiento microbiano (Kamimura et al. 2014). Para *Listeria monocytogenes* se procedió de la misma forma utilizándose el medio Soya Trypticasa.

### **6.2.10.3 Determinación de la actividad antifúngica: Inhibición micelial**

Las cepas fúngicas se mantuvieron en 25 mL de agar papa dextrosa (PDA) y 2% de agar maltosa (MA2) a 28 °C para asegurar condiciones óptimas de crecimiento. Los medios de cultivo se prepararon y esterilizaron en una autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Siete días antes de su uso, las cepas fúngicas se activaron para después sub- cultivarlas.

#### **6.2.10.4 Concentración mínima inhibitoria fungicida (CIF)**

De acuerdo al método semi-cuantitativo reportado por Rosas-Taraco et al. (2011), con ligeras modificaciones. Suspendieron 200  $\mu\text{L}$  de conidias ajustadas a  $(1 \times 10^4)$  en tubos que contenían 1.8 mL de caldo PDA con las determinadas concentraciones (1.25, 2.5, 5 y 10 mg/mL) de los complejos de inclusión, se incubaron a 28° C durante 5 días. La concentración inhibitoria fungicida se asignó de acuerdo a una escala simbólica (+) y arbitraria de 0 a 5 en donde 0 (+) representa ausencia total de crecimiento y 5 (+) el máximo crecimiento comparado con el crecimiento control de la cepa pura sin añadir encapsulado o concentrado. La determinación de la CIF se definió como la concentración mínima que no permitiera el crecimiento micelial visual del hongo.

#### **6.2.10.5 Determinación de la actividad antioxidante**

De cada complejo de inclusión, se pesó 0.1 g y se colocó en un tubo de centrifuga con 1.5 mL de la solución NaCl (10%)-metanol (1:1), se mezcló en el vortex por 10 min, posteriormente se añadió 8 mL de hexano-acetona (1:1), se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min. Se tomó del sobrenadante de 300 y 600  $\mu\text{L}$  para el análisis con el radical ABTS y DPPH respectivamente, la metodología posterior se siguió según el punto 6.2.6.

### **6.3 Análisis estadístico**

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado o triplicado al menos tres veces. El análisis estadístico fue realizado usando el software SPSS (IBM versión 22, SPSS Inc., Chicago IL). Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) para los datos y determinar la diferencia ( $p \leq 0.05$ ) y la prueba de Tukey, para determinar la diferencia significativa entre la media de los factores principales.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización de aceite esencial de naranja y sus concentrados

Para esta investigación, se utilizaron aceite esencial de naranja obtenido industrialmente por prensado en frío, posteriormente se obtuvieron los aceites concentrados de naranja 5x, 10x, 20x (la asignación “x” es un símbolo utilizado internacionalmente), el D-limoneno se obtuvo comercialmente. En la Tabla 1, se muestran las propiedades físicoquímicas de estos aceites, principalmente para conocer sus características entre los aceites.

Tabla 1. Propiedades físicoquímicas de los aceites

Abreviatura	Nombre	Densidad (20°C)	Índice de refracción (20 °C)	Solubilidad en agua
AN	Aceite esencial de naranja	0.846	1.477	Insoluble
DL	D-Limoneno al 97%	0.840	1.472	Insoluble
5x	5 veces concentrado del aceite de naranja	0.884	1.482	Insoluble
10x	10 veces concentrado del aceite de naranja	0.920	1.494	Insoluble
20x	20 veces concentrado del aceite de naranja	0.945	1.497	Insoluble

### 7.2 Perfil cromatográfico del aceite esencial de naranja y sus concentrados

El análisis de los principales componentes del aceite esencial de naranja (AN) y sus concentrados (5x, 10x y 20x) reveló diferencias cualitativas y cuantitativas de los

compuestos presentes (Tabla 2). Se identificaron en total 40 compuestos, los cuales mostraron similitudes cualitativas, así como diferencias cuantitativas en los componentes de cada uno de los aceites analizados. Para AN y concentrados 5x, 10x y 20x, se identificaron un total de 18, 20, 18 y 27 componentes respectivamente, que representan el 99.87, 98.49, 98.25, 92.11% del total los de componentes detectados. El principal componente del AN es el D-limoneno que se reporta en un 91.12%, mientras en los aceites concentrados 5 y 10x se mostró en 72.08 y 73.77% respectivamente, resultando con el menor porcentaje el aceite 20x con 23.24%. De los demás componentes que resultaron mayores al 1%, se observó que el Decanal, un aldehído, aumentó considerablemente en los aceites 5x, 10x y 20x con un 3.60, 4.78 y 18.46% respectivamente, mientras que en AN se detectó solo un 0.44%. Así mismo, el linalool, presentó un aumento en los aceites 5x (3.33%), 10x (3.99%) y 20x (5.53%) con respecto a AN (0.65%). Por otra parte, se encontró una disminución en la mezcla de monoterpenos hidrocarbonados en todos los aceites concentrados comparadas con el AN (97.67%) siendo el aceite 20x la que presentó la menor cantidad (23.24%), mientras que los aceites 10x y 5x se mantuvieron en 74.88 y 72.51%, respectivamente. Para los monoterpenos oxigenados se detectó un aumento en la concentración en los aceites concentrados con 11.83% (5x), 9.30% (10x) y 21.56 % (20x). con respecto al AN con 1.25%. La misma tendencia se observó para los sesquiterpenos hidrocarbonados, en donde se detectó un aumento significativo en las concentraciones presentes en los aceites concentrados en comparación con el AN, siendo el aceite 20x el que presentó la mayor concentración de los mismos, mientras que los sesquiterpenos oxigenados solo pudieron ser detectados en el aceite 20x (2.67%).

Tabla 2. Perfil cromatográfico del AN, 5x, 10x y 20x

No.	Compuesto	Porcentaje (%)			
		AN	5x	10x	20x
1	$\alpha$ -Pino	1.11			
2	Sabineno	0.41			
3	$\beta$ -Felandreno	0.42			
4	$\beta$ -Mirceno	4.11	0.43	1.11	
5	Octanal	0.15			
6	Felandreno	0.09			
7	Careno	0.20			
8	D-Limoneno	91.12	72.08	73.77	23.24
9	Ocimeno	0.11			
10	Terpinoleno	0.10			
11	Octanol	0.10			
12	Linalool	0.65	3.33	3.99	5.53
13	trans-p-mentha-2,8-dienol		0.80	0.46	0.98
14	trans-2-menthenol				1.00
15	cis-Oxido de Limoneno		1.94		
16	trans-Oxido de Limoneno		1.01		
17	Citronela	0.09	0.52	0.69	1.04
18	$\alpha$ -Terpineol	0.60	1.37	2.16	4.60
19	Decanal	0.44	3.60	4.78	18.46
20	Tras-carveol		1.07		
21	cis-Carvotanacetol				1.59
22	Citronelol				0.61
23	Carveol				0.76
24	Z-citral		0.67	0.79	1.70
25	D-Carvona		1.25	0.68	2.01
26	Citral		1.12	1.33	3.48
27	Perilaldehido		0.52	0.57	1.31
28	Acetato de geraniol				0.45
29	$\alpha$ -Cubebeno		0.71	0.98	2.32
30	2-isopropil-5-metil-9-metileno				2.06
31	$\beta$ -Cubebeno	0.05		0.82	2.22
32	Germacrene D	0.05	0.71	0.94	0.91
33	Dodecanal		0.84	1.09	2.80
34	Cariofileno			0.64	1.35
35	$\gamma$ -Muurolo		0.65		1.46
36	Valenceno		4.89	2.14	6.35
37	$\delta$ -Cadineno	0.07	0.98	1.31	3.21
38	Elemol				0.96
39	Oxido de cariofileno				0.77
40	Nootkatona				0.94
	Monoterpenos Hidrocarbonados	97.67	72.51	74.88	23.24
	Monoterpenos Oxigenados	1.25	11.83	9.30	21.56
	Sesquiterpenos Hidrocarbonados	0.17	7.94	6.83	19.88
	Sesquiterpenos Oxigenados	ND	ND	ND	2.67
	Otros	0.78	6.21	7.24	24.76
	Porcentaje total de compuestos identificados	99.87	98.49	98.25	92.11

ND: No detectado

### 7.3 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de naranja y sus concentrados

De manera general, entre los aceites que se analizaron para la actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco (Tabla 3) presentaron halos de inhibición que variaron desde 12 mm hasta 28 mm. La mayor inhibición se presentó con los aceites 10x y 20x para *B. cereus* y *S. aureus*, mientras que para *L. monocytogenes* fueron 5x y 20x, presentando diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) comparadas con AN y DL. En el caso de *S. typhi*, la mayor inhibición fue con los aceites 5x y 10x siendo comparable su actividad con el control positivo (gentamicina), se mostró una diferencia significativa con el aceite 20x, AN y DL. Al comparar la actividad antimicrobiana de los aceites concentrados (5x, 10x, 20x) con el DL y AN se evidenció una diferencia significativa con los aceites concentrados en la mayoría de los casos.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana del AN, DL, 5x, 10x y 20x por el método de difusión en disco.

Compuesto Utilizado	Halo de Inhibición (mm)			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhi</i>
AN	13 ± 1 <sup>d</sup>	13 ± 1 <sup>d</sup>	12 ± 0.7 <sup>d</sup>	16 ± 0.7 <sup>c</sup>
DL	15.4 ± 1.1 <sup>d</sup>	17 ± 1 <sup>c</sup>	14 ± 0.7 <sup>d</sup>	17 ± 0.7 <sup>c</sup>
5x	23.4 ± 2.0 <sup>c</sup>	17.4 ± 0.5 <sup>c</sup>	24.4 ± 1.3 <sup>bc</sup>	28 ± 1.4 <sup>a</sup>
10x	28 ± 1.2 <sup>b</sup>	20.4 ± 2.4 <sup>b</sup>	22.6 ± 1.8 <sup>c</sup>	27.2 ± 1.6 <sup>a</sup>
20x	27.8 ± 1.3 <sup>b</sup>	18.6 ± 0.8 <sup>bc</sup>	26.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	24.8 ± 1.1 <sup>b</sup>
Gentamicina	45.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	37 ± 1.4 <sup>a</sup>	35.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	28 ± 0.7 <sup>a</sup>

Halo de inhibición son valores promedio de tres repeticiones por duplicado ± desviación estándar. <sup>a-d</sup>Los promedios en una columna con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

Al determinar la CMI y CMB se encontró diferencia significativa entre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales con las fracciones concentradas. La CMI para las fracciones concentradas varió desde <0.25 - 1 mg/mL mientras que la CMB desde 0.25 - 2.5 mg/mL. La CMI para los aceites esenciales varió de 1.5-2.5mg/mL y la CMB 2 - >2.5mg/mL. Los valores más bajos encontrados fueron para la fracción 20x tanto de CMI como de CMB en todos los casos, seguida de las fracciones 10x y 5x las cuales presentaron

similitudes en los valores encontrados (Tabla 4). La CMI y CMB variaron muy poco entre las fracciones 5x, 10x, 20x para un mismo microorganismo, sin embargo, al comparar la CMI y CMB determinadas para AN y D-Limoneno con aquellas de las fracciones, se observó diferencia significativa, siendo el D-Limoneno el compuesto con menor actividad antimicrobiana con valores de CMI (0.5-2mg/mL) y CMB mayores a 2 mg/mL. El AN presentó mejor actividad antimicrobiana que éste último en la CMI (0.5-2 mg/mL) y aunque la CMB sólo pudo determinarse para *L. monocytogenes* (2mg/mL).

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) de AN, DL, 5x, 10x y 20x.

Aceite	CMI y CMB (mg/mL)							
	<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. typhi</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
AN	1.5±0.3 <sup>ab</sup>	>2 <sup>a</sup>	1±0.3 <sup>b</sup>	>2 <sup>a</sup>	0.5±0.2 <sup>a</sup>	2±0.3 <sup>b</sup>	2±0.5 <sup>a</sup>	>2.5 <sup>a</sup>
DL	>2 <sup>a</sup>	>2 <sup>a</sup>	2±0.2 <sup>a</sup>	>2 <sup>a</sup>	0.5±0.2 <sup>a</sup>	>2 <sup>a</sup>	2.5±0.3 <sup>a</sup>	>2.5 <sup>a</sup>
5x	1±0.3 <sup>bc</sup>	1.5±0.3 <sup>b</sup>	0.5±0.2 <sup>b</sup>	1.5±0.3 <sup>b</sup>	0.25±0.1 <sup>a</sup>	0.5±0.2 <sup>c</sup>	1±0.3 <sup>b</sup>	2.5±0.3 <sup>ab</sup>
10x	1±0.3 <sup>bc</sup>	1.5±0.3 <sup>b</sup>	0.5±0.3 <sup>b</sup>	2±0.3 <sup>ab</sup>	0.25±0.1 <sup>a</sup>	0.5±0.2 <sup>c</sup>	1±0.3 <sup>b</sup>	2.5±0.3 <sup>ab</sup>
20x	0.5±0.3 <sup>c</sup>	1±0.3 <sup>b</sup>	0.5±0.2 <sup>b</sup>	1.5±0.3 <sup>b</sup>	<0.25	0.25±0.1 <sup>c</sup>	1±0.6 <sup>b</sup>	2±0.3 <sup>b</sup>

Zona de inhibición son valores promedio de tres repeticiones por duplicado ± desviación estándar. <sup>a-c</sup>Los promedios en una columna con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

#### 7.4 Actividad antioxidante del aceite esencial de naranja y sus concentrados

La actividad antioxidante del AN, DL y aceites concentrados 5x, 10x, 20x fue analizada mediante los métodos de DPPH y ABTS. En la Tabla 5, se reportan los promedios obtenidos de la actividad antioxidante en [ $\mu\text{mol}$  equivalentes Trolox (ET) / mL aceite de cítrico (AC)] siendo el aceite 20x la que presentó la mayor actividad antioxidante con 156.25  $\mu\text{mol}$  ET/mL AC en ABTS y 21.24  $\mu\text{mol}$  ET/mL AC en DPPH, seguido de los aceites 10x y 5x con 141.53 y 86.02  $\mu\text{mol}$  ET/mL AC en ABTS respectivamente, mientras que en DPPH fueron de 16.96 y 7.69  $\mu\text{mol}$  ET/mL AC respectivamente; para el caso de AN se obtuvo 23.25 ET/mL AC en ABTS y 3.01  $\mu\text{mol}$  ET/mL AC en DPPH, finalmente en D-Limoneno, no se detectó actividad antioxidante por ninguno de los métodos.

Tabla 5. Actividad antioxidante de AN, DL, 5x, 10x y 20x.

Método	μmol TE/mL aceite				
	AN	DL	5x	10x	20x
ABTS	23.25 ± 0.84 <sup>d</sup>	ND	86.02 ± 1.12 <sup>c</sup>	141.53 ± 0.16 <sup>b</sup>	156.25 ± 0.62 <sup>a</sup>
DPPH	3.01 ± 0.20 <sup>d</sup>	ND	7.69 ± 0.35 <sup>c</sup>	16.96 ± 0.81 <sup>b</sup>	21.24 ± 0.32 <sup>a</sup>

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar de la media. <sup>a-d</sup> Los promedios en la misma fila con diferente letra difieren significativamente (p≤0.05). ND=No detectado

En la Tabla 6, se muestran los valores de la actividad antioxidante en CI<sub>50</sub>, donde el aceite 20x mostró mayor actividad antioxidante con 3.80 y 10.25 mg/mL, para inhibir el 50 % del radical ABTS y DPPH respectivamente, seguido del 10x y 5x con 6.49 y 16.27 mg/mL ABTS y 15.50 y 37.25 mg/mL en DPPH. El AN obtuvo 68.40 y 70.17 mg/mL en ABTS y DPPH respectivamente. El DL, no presentó actividad antioxidante para inhibir los radicales estudiados.

Tabla 6. Concentración Inhibitoria (CI<sub>50</sub>) de AN, DL, 5x, 10x y 20x.

Método	CI <sub>50</sub> (mg/mL)				
	AN	DL	5x	10x	20x
ABTS	68.40 ± 0.39 <sup>a</sup>	ND	16.27 ± 0.32 <sup>b</sup>	6.49 ± 0.10 <sup>c</sup>	3.80 ± 0.06 <sup>d</sup>
DPPH	70.17 ± 5.15 <sup>a</sup>	ND	37.25 ± 2.85 <sup>b</sup>	15.50 ± 1.20 <sup>c</sup>	10.25 ± 0.50 <sup>c</sup>

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. <sup>a-d</sup> Los promedios en una fila con diferentes superíndices difieren significativamente (p≤0.05). ND= No detectado

### 7.5 Obtención de emulsiones utilizando β-ciclodextrinas y biopolímeros

Se desarrollaron 10 formulaciones de emulsiones, a diferentes concentraciones con diferentes matrices biopoliméricas mostradas en la Tabla 7. Se utilizó como fase oleosa el AN con Φ 0.1, al definir la formulación más estable (mostrado más adelante) se realizaron con aceites concentrados (5x, 10x, 20x).

Tabla 7. Formulaciones (%) desarrolladas para emulsiones con AN

Fórmula	$\beta$ -CD	WPC	XG	Agua
1	11.80	12.43	9.375	56.30
2	19.00	4.97	9.375	56.70
3	9.43	7.46	4.69	67.24
4	15.10	2.98	4.69	67.24
5	33.00	0.00	8.00	49.00
6	0.00	27.54	8.00	54.46
7	26.90	4.13	8.00	59.67
8	28.50	2.75	8.00	50.98
9	30.10	1.38	8.00	50.77
10	14.40	15.97	0.00	52.21

A todas las emulsiones se determinó su estabilidad física mediante el análisis de tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ), determinación de la tasa de coalescencia, medición del índice de cremado (%) y observación de la morfología por microscopio óptico durante 30 días almacenadas a temperatura ambiente.

### 7.5.1 Estabilidad física de las emulsiones con AN

En la Tabla 8, se muestran los resultados para la estabilidad física con AN al término de los 30 días. Las emulsiones formuladas 1, 2, 7, 8 y 9 presentaron valores que se consideran como estables, tamaño de partícula promedio de 1.5  $\mu\text{m}$ , en la tasa de coalescencia según la escala presentada en la sección 6.2.7.3, los valores obtenidos los clasifican como emulsiones muy estables. Para el índice de cremado en la observación del comportamiento de la emulsión de manera visual, si presenta alguna separación física de la emulsión entre sus materiales. Emulsiones cercanas a 0% son las más estables, ya que no presentan separación; las emulsiones 3, 4, 5, 6 y 10 presentaron separación entre sus materiales mostrando valores entre 14.5-29.35 % en el índice de cremado, sin embargo para estas emulsiones no se logró determinar el tamaño de partícula y la tasa de coalescencia debido a la inestabilidad del sistema, mostrando incluso separación de la emulsión en ocasiones

al término de la homogeneización o en algunos días, descartando estas emulsiones por su inestabilidad.

Tabla 8. Estabilidad física de emulsiones con AN

Fórmula	Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	Tasa de Coalescencia	Índice de cremado (%)
1	1.62	$1.49 \times 10^{-9}$	0
2	1.59	$1.35 \times 10^{-8}$	0
3	ND	ND	14.50
4	ND	ND	15.77
5	ND	ND	15.50
6	1.59	$1.49 \times 10^{-8}$	29.35
7	1.57	$1.43 \times 10^{-9}$	0
8	1.56	$9.13 \times 10^{-9}$	0
9	1.57	$1.52 \times 10^{-8}$	0
10	ND	ND	23.19

ND=No determinado

En la Figura 5, se muestran imágenes al microscopio óptico de las emulsiones realizadas, donde podemos observar el comportamiento de la gota de aceite en la fase continua y si se crea algún mecanismo que contribuya a la inestabilidad de las emulsiones como floculación o aglomeración entre otras. Sin embargo, se observan de manera general las gotas de aceite de forma dispersa. Las imágenes de índice de cremado para la observación de la separación de fases que se mencionó anteriormente, siendo más notoria la separación en las emulsiones 3, 4 y 10, siendo inestables.

### **7.6 Evaluación de la cinética de actividad antioxidante de aceites concentrados de naranja en emulsión almacenadas a diferentes temperaturas**

De la evaluación de la estabilidad física de las emulsiones, se determinó que las formulaciones realizadas, la fórmula de la emulsión 1, era la que sería utilizada para los

aceites concentrados 5x, 10x y 20x, debido a que presento mejores resultados de estabilidad física durante 30 días con AN.

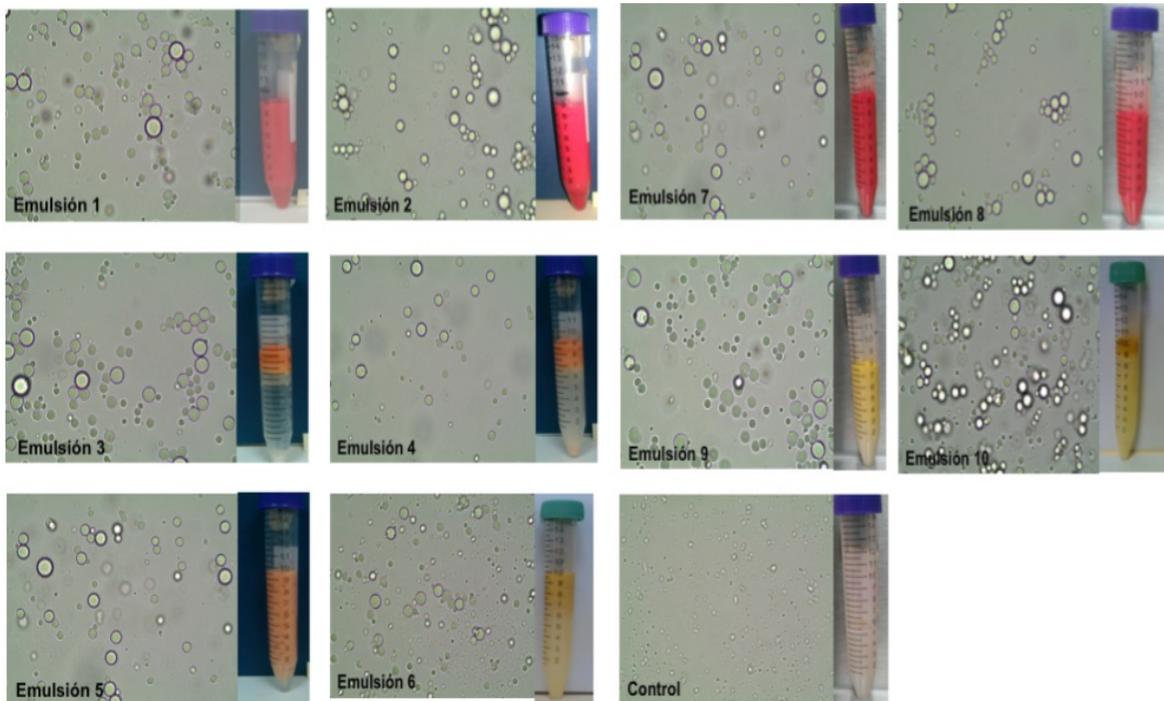


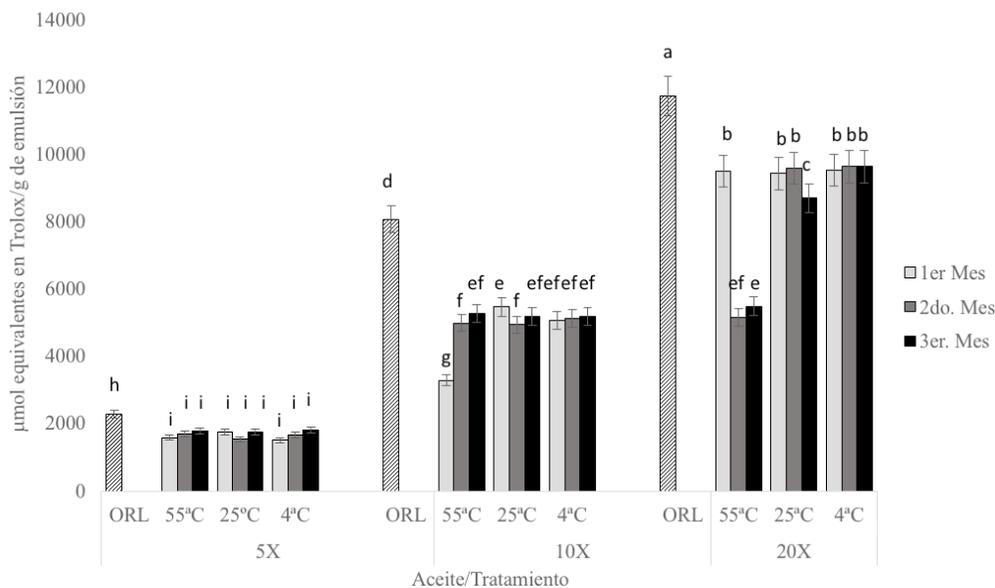
Figura 5. Fotografías de emulsiones con AN por microscopio óptico y de índice de cremado

Tabla 9. Estabilidad física de emulsiones con 5x, 10x y 20x durante 93 días.

Aceite	Tratamiento	Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	Tasa de coalescencia
5x	4 °C	1.52	$1.51 \times 10^{-8}$
	25 °C	2.19	$1.52 \times 10^{-7}$
	55 °C	5.37	$2.45 \times 10^{-6}$
10x	4 °C	1.52	$2.54 \times 10^{-9}$
	25 °C	1.61	$3.17 \times 10^{-8}$
	55 °C	4.92	$2.10 \times 10^{-6}$
20x	4 °C	1.70	$4.21 \times 10^{-8}$
	25 °C	1.61	$2.66 \times 10^{-8}$
	55 °C	4.93	$2.09 \times 10^{-6}$

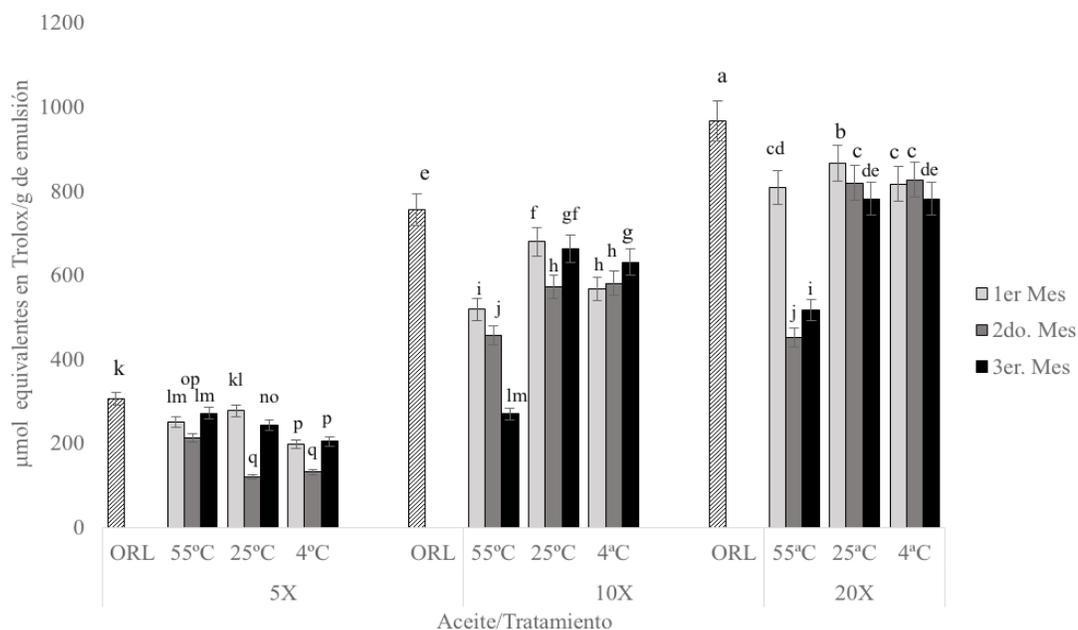
En la Tabla 9, se muestran los valores del tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ) y tasa de coalescencia, que indican de manera cuantificable la estabilidad de la emulsión, observando que a temperaturas de almacenamiento 4 y 25 °C presentó un rango entre 1.52-2.19  $\mu\text{m}$ , sin embargo a 55 °C las emulsiones empezaron a incrementar este valor por encima de 4  $\mu\text{m}$ , resaltando que la lectura se obtuvo hasta el día 21, debido a que iba en aumento, aunado a que su valor de tasa de coalescencia también mostraba un incremento y con ello una inestabilidad del sistema. El comportamiento de temperatura, aceite y tamaño de partícula fue similar para los 3 aceites concentrados (5x, 10x y 20x).

Los resultados de la cinética de la actividad antioxidante de los aceites concentrados de naranja (5x, 10x, 20x) en emulsión por el método ABTS y DPPH, se presentan en las Figuras 6 y 7, respectivamente. De manera general, los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa entre el aceite sin encapsular (ORL) con los aceites encapsulados (5x, 10x y 20x), sin embargo, la actividad antioxidante del aceite encapsulado con respecto al tiempo se mantuvo durante el tiempo de análisis a temperaturas de 4 y 25 °C, y se observa que decayó la temperatura a 55 °C.



Valores promedio de tres repeticiones. <sup>a-i</sup> Los promedios por columna con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

Figura 6. Gráfica de la cinética de la actividad antioxidante (ABTS) de emulsiones de aceites concentrados de naranja almacenadas a diferentes temperaturas durante 93 días



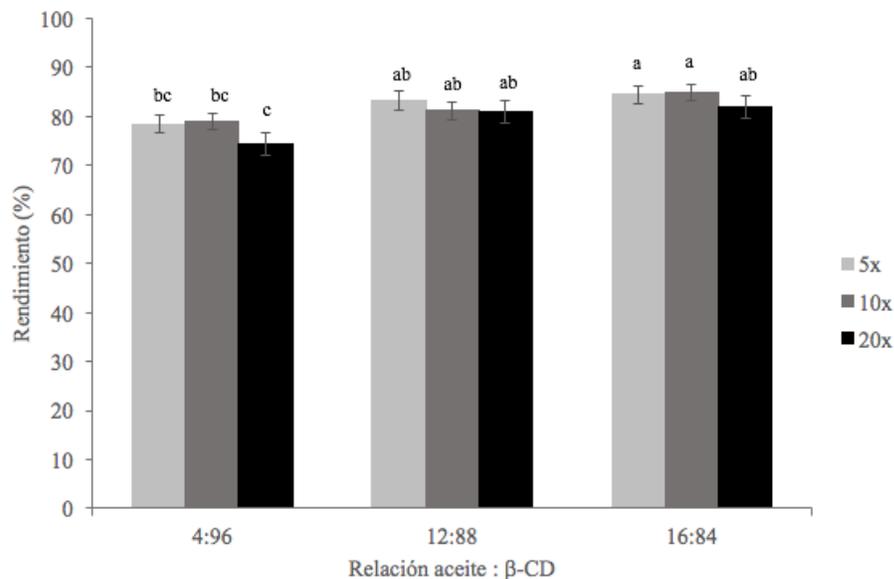
Valores promedio de tres repeticiones. <sup>a-q</sup> Los promedios por columna con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

Figura 7. Gráfica de la cinética de la actividad antioxidante (ABTS) de emulsiones de aceites concentrados de naranja almacenadas a diferentes temperaturas durante 93 días

## 7.7 Caracterización de los complejos de inclusión

### 7.7.1 Rendimiento (%)

Se obtuvieron los complejos de inclusión de cada aceite concentrado de naranja (5x, 10x, 20x) con  $\beta$ -CD en 3 relaciones (4:96, 12:88 y 16:84). En la Figura 8, se muestra el porcentaje de rendimiento, de manera general se obtuvo entre 75 – 85%, particularmente la relación 4:96 obtiene un rendimiento de entre el 74 – 78% en los complejos de inclusión de cada aceite, sin diferencia significativa entre ellos, pero al compararse con las relaciones 12:88 y 16:84 de todos los complejos, muestra una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ). En la relación 12:88 de todos los complejos muestran rendimientos entre un 80 – 83%, sin mostrar una diferencia significativa entre cada uno de ellos. Así mismo, la relación 16:84 se obtuvieron resultados entre 82 - 85% de rendimiento. No se observó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las relaciones 12:88 y 16:84 de todos los complejos de inclusión con 5x, 10x y 20x.



Valores promedio de tres repeticiones. <sup>a-c</sup> Los promedios por columna con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

Figura 8. Gráfica del rendimiento (%) de los complejos de inclusión

### 7.7.2 Eficiencia de encapsulación (% EE) y cuantificación del aceite encapsulado

La cuantificación del aceite es la diferencia en la cantidad de aceite total y aceite superficial, es decir la cantidad que está en la cavidad de la molécula de  $\beta$ -CD y la eficiencia de encapsulación es la asociación que exista entre el compuesto y el encapsulante para resguardar el compuesto. Los resultados obtenidos tras la encapsulación de los aceites concentrados 5x, 10x y 20x, en sus relaciones 4:96, 12:88 y 16:84 con  $\beta$ -CD, se muestran en la Tabla 10. La relación 12:88 del aceite 20x obtuvo la mayor cantidad de aceite resguardada en la cavidad de la  $\beta$ -CD con 102.3 mg de aceite/g de  $\beta$ -CD, seguido de la 16:84 del mismo aceite con 83.1 mg de aceite/g de  $\beta$ -CD, el resto de los aceites y sus relaciones estuvieron por debajo de 60 mg de aceite/g de  $\beta$ -CD.

Tabla 10. Aceite encapsulado (mg/g  $\beta$ -CD) y eficiencia de encapsulación (%) de los complejos de inclusión

Aceite	Relación	Aceite encapsulado * (mg/g $\beta$ -CD)	Eficiencia de encapsulación (%)
5x	4:96	7.8±1.3 <sup>f</sup>	75.6±0.1 <sup>c</sup>
	12:88	23.7±1.6 <sup>e</sup>	84.4±3.0 <sup>ab</sup>
	16:84	35.8±4.1 <sup>d</sup>	85.2±2.4 <sup>ab</sup>
10x	4:96	7.7±1.3 <sup>f</sup>	84.5±2.0 <sup>ab</sup>
	12:88	58.1±1.0 <sup>e</sup>	80.7±3.4 <sup>bc</sup>
	16:84	35.9±2.2 <sup>d</sup>	67.1±3.4 <sup>d</sup>
20x	4:96	18.2±2.5 <sup>e</sup>	85.8±0.9 <sup>ab</sup>
	12:88	102.3±3.4 <sup>a</sup>	89.5±0.4 <sup>a</sup>
	16:84	83.1±1.5 <sup>b</sup>	74.5±1.4 <sup>c</sup>

Valores promedio de tres repeticiones. <sup>a-f</sup> Los promedios por columna con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ )

La relación 12:88 del concentrado de aceite 20x obtuvo el mayor % de eficiencia de encapsulación con 89.5, sin embargo no hubo diferencia significativa con la relación 4:96 de este mismo aceite con 85.8 % y 10x con un 84.5 %, de la misma forma que el 5x en sus relaciones 12:88 (84.4 %) y 16:84 (85.2 %). La relación 4:96 (5x), 16:84 (10x), 16:84 (20x) obtuvieron % eficiencia de encapsulación de 75.6, 67.1 y 74.5% respectivamente, siendo los resultados más bajos.

### 7.7.3 Tamaño de partícula

La Tabla 11, muestra los tamaños de partícula de los complejos de inclusión en los aceite concentrados 5x, 10x, 20x y sus relaciones 4:96, 12:88, 16:84. Se muestran suspensiones y partículas dispersas de diferentes tamaños de acuerdo a cada relación, se presentaron tamaños desde 1.5  $\mu\text{m}$  (20x; 12:88) hasta de 3.6  $\mu\text{m}$  (5x; 4:96), mostrandose diferencia significativa entre los aceites concentrados y las relaciones con la  $\beta$ -CD, sin embargo, se obtuvo diferencia significativa de la  $\beta$ -CD sola que presento 12.63  $\mu\text{m}$  con respecto a los complejos de inclusión con valores menores a 3.6  $\mu\text{m}$ .

Tabla 11. Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ) de los complejos de inclusión.

Relación Aceite : $\beta$ -CD	Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )		
	5x	10x	20x
4:96	3.6 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	3.3 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>
12:88	2.5 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	1.6 $\pm$ 0.01 <sup>g</sup>	1.5 $\pm$ 0.01 <sup>g</sup>
16:84	2.0 $\pm$ 0.01 <sup>ef</sup>	2.0 $\pm$ 0.07 <sup>ef</sup>	1.9 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>
$\beta$ -CD	12.63 <sup>a</sup>		

Valores promedio de tres repeticiones. <sup>a-f</sup> Los promedios con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ )

#### 7.7.4 Caracterización por espectrofotometría de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)

El análisis de FTIR es una técnica muy utilizada para confirmar la formación de los complejos de inclusión. En la Figura 9, se muestra el comportamiento de  $\beta$ -CD pura, concentrado de aceite 20x libre y el complejo de inclusión (relación 12:88); se pueden observar el comportamiento del número de ondas para la  $\beta$ -CD pura, mostrando una significativa banda a  $3340 \text{ cm}^{-1}$ , debido a la O-H de vibraciones de estiramiento de los diferentes grupos hidroxilo de la  $\beta$ -CD. También es ligeramente visible una banda a  $1647 \text{ cm}^{-1}$ , relacionada con las vibraciones de flexión de estos grupos O-H. El espectro de FTIR del aceite 20x, se revela una banda a  $2946 \text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C-H), además de una gran cantidad de bandas entre las regiones (C-O), (C-C), (C-C). Para el aceite concentrado, se puede observar una banda intensa a  $2800 \text{ cm}^{-1}$  aproximadamente atribuida a vibraciones relacionados con el compuesto metileno cuyos principales enlaces C-H cercano a  $2926 \text{ cm}^{-1}$ . La banda intensa en  $1644 \text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración de estiramiento C = C del grupo alilo. Dichas bandas se presentaron en los aceites concentrados 5x, 10x, 20x y se vio disminuido, por tanto la desaparición de la banda típica indica en algún grado, que este compuesto (metileno) se incluyó en la cavidad de las  $\beta$ -CDs, de tal modo indica la formación exitosa de los complejos de inclusión  $\beta$ -CD/aceite. Cada complejo de inclusión (aceite: $\beta$ -CD) muestran el mismo comportamiento, observándose en el Anexo.

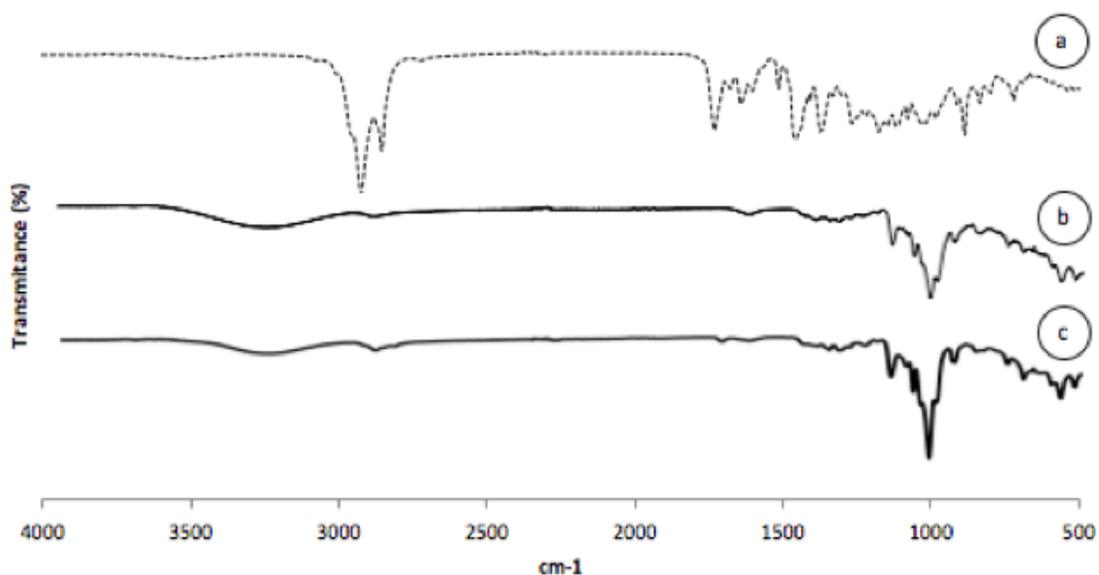


Figura 9. Espectro FTIR de (a) aceite 20x, (b)  $\beta$ -CD, (c) relación 12:88

### 7.7.5 Análisis morfológico

La estructura morfológica de los diferentes polvos obtenidos por el método co-precipitación para los aceites concentrados se analizó en el microscopio electrónico de barrido (Figura 10), observando sin distinción del tipo de aceite utilizado, estructuras amorfas tipo cristal e irregulares, de diferentes tamaños.

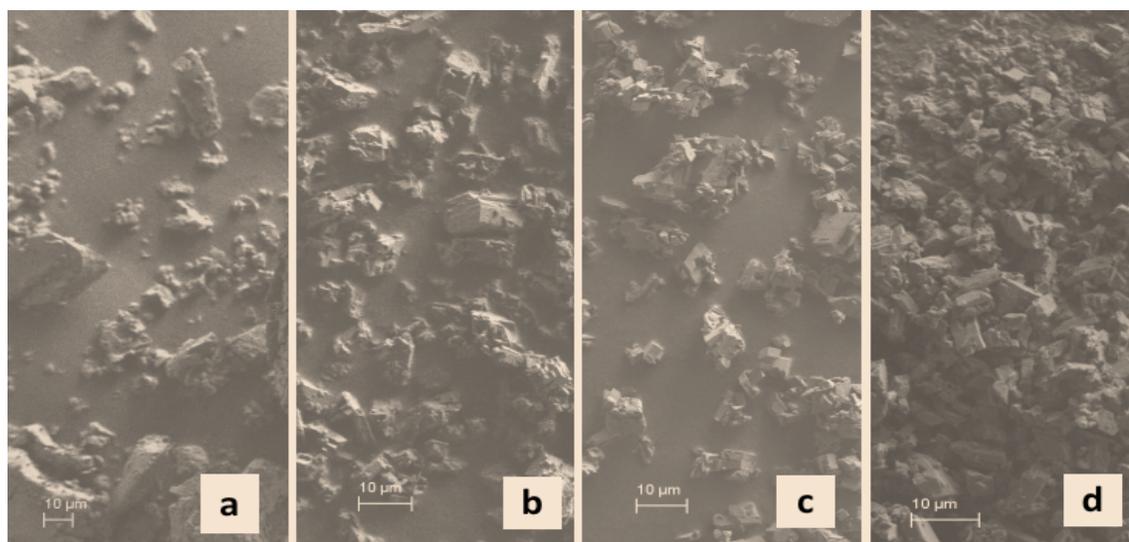


Figura 10. Microfotografías en microscopio electrónico de barrido (a)  $\beta$ -CD pura; (b) 5x, 12:88; (c) 10x, 12:88; (d) 20x, 12:88

## 7.7.6 Actividad biológica

### 7.7.6.1 Actividad antioxidante

La Figura 11, muestra los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de los aceites concentrados 5x, 10x, 20x libres (ORL) y en complejo de inclusión en sus diferentes relaciones con la  $\beta$ -CD, obteniendo valores entre 1000 – 8500  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de  $\beta$ -CD, donde no hubo diferencia significativa entre los aceites concentrados sin encapsular y los complejos de inclusión en la relación 12:88 en los 3 aceites con valores entre 6500-8500  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de  $\beta$ -CD, sin embargo, si hay diferencia significativa entre la relación 12:88 respecto a la 4:96 y 16:84, obteniendo que el aceite 5x en relación 4:96 y 16:84 presentaron los valores más bajos entre 1000 - 2000  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de  $\beta$ -CD.

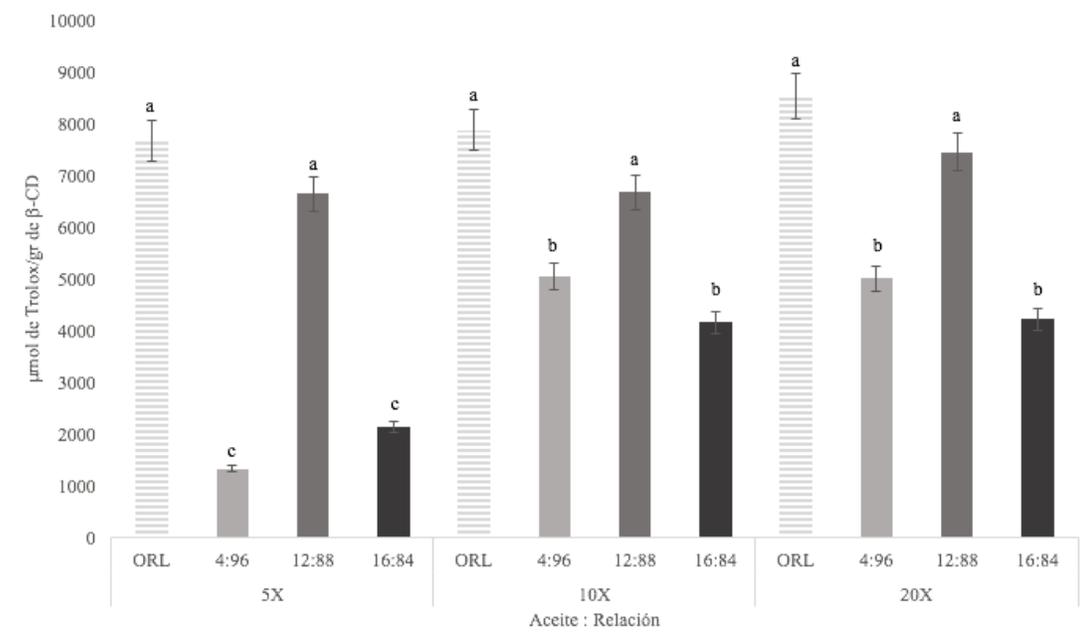


Figura 11. Gráfica de la actividad antioxidante de los complejos de inclusión de los aceites concentrados con  $\beta$ -CD en diferentes relaciones

### 7.7.6.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB)

La capacidad antimicrobiana se evaluó tanto inhibitoria como bactericida de los aceites concentrados 5x, 10x, 20x en complejos de inclusión en las 3 relaciones (4:96,

12:88 y 16:84). En estudios previos, se obtuvieron las CMI para algunas cepas bacterianas de importancia en alimentos (*Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) utilizando los aceites concentrados no encapsulados, mostrando mayor efecto antimicrobiano las dos primeras cepas, por lo cual, en aceite encapsulado solo se realizó con estas dos cepas bacterianas, obteniendo que el aceite concentrado 5x presentó una buena actividad antimicrobiana para *Salmonella thyphi*, mientras que para *Listeria monocytogenes* fue el aceite 20x; el resto de los aceites concentrados encapsulados no mostraron actividad antimicrobiana preliminar por lo cual solo se realizó el estudio de CMI y CMB los aceites concentrados (5x y 20x). La CMB no se logró determinar para ninguna de las dos cepas debido a que el crecimiento se observó incluso en la concentración de 10 mg/mL. Sin embargo, al realizar el análisis de CMI se pudo observar que la disminución bacteriana fue mayor al 90% en ambos aceites, obteniendo un crecimiento menor al 10% en todos los casos para ambas cepas. La CMI (definida como la concentración capaz de reducir el 90% del crecimiento microbiano) se determinó en una concentración de 1.25mg/mL para ambas bacterias, no encontrándose diferencia significativa (Tabla 12). Entre las diferentes concentraciones probadas no hubo diferencia significativa, pero si en comparación con el control (Figuras 12 y 13).

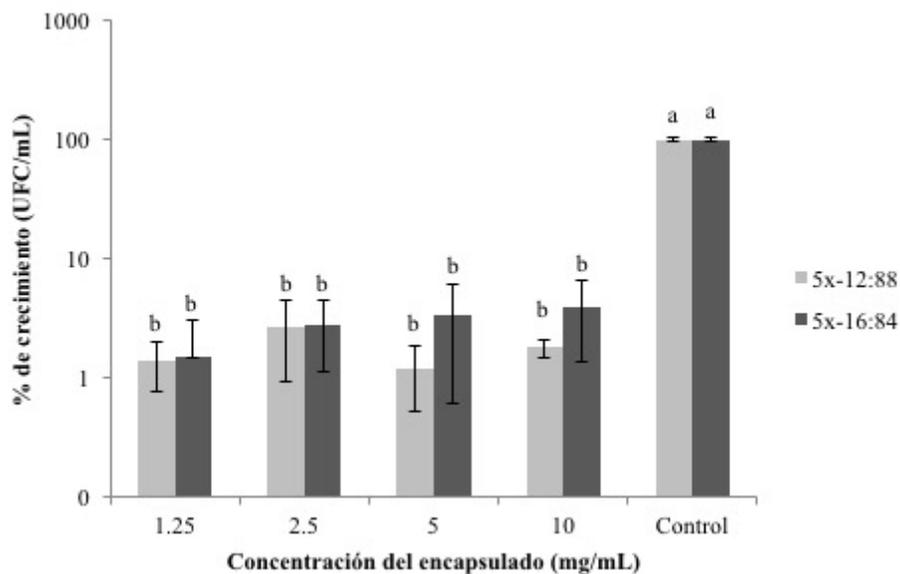


Figura 12. Gráfica del crecimiento (%) de *Salmonella typhi* a diferentes concentraciones de complejos de inclusión 5x en relaciones 12:88 y 16:84

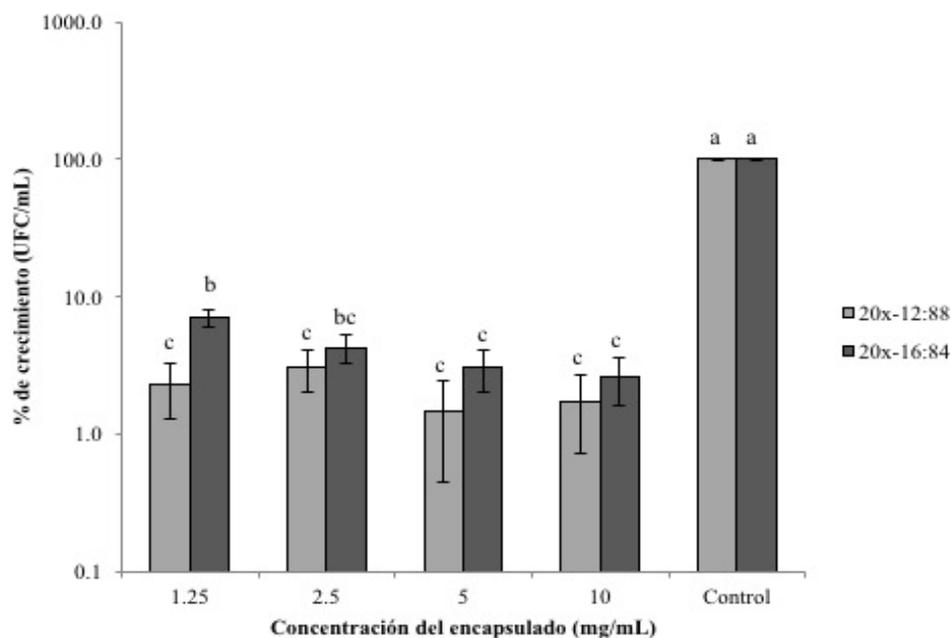


Figura 13. Gráfica del crecimiento (%) de *Listeria monocytogenes* a diferentes concentraciones de complejos de inclusión 20x en relaciones 12:88 y 16:84

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) de los complejos de inclusión.

Bacteria	Aceite	Relación	
		12:88	16:84
<i>S. typhi</i>	5x	1.25	1.25
<i>L. monocytogenes</i>	20x	1.25	1.25

Los aceites concentrados 5x y 20x presentaron actividad inhibitoria en ambas relaciones (12:88 y 16:84) a las diferentes concentraciones en las que se realizó el análisis (1.25, 2.5, 5 y 10 mg/mL) encontrándose la CIM para *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* de 1.25 mg/mL, donde se evidencia una disminución del 90% del crecimiento bacteriano.

### 7.7.6.3 Concentración inhibitoria fungicida (CIF)

Para el estudio de CIF se utilizaron los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, debido a su gran importancia en la industria de alimentos por ser microorganismos productores de micotoxinas. La CIF se definió como la concentración mínima en la cual no hubiese crecimiento micelial visible. La CFI fue determinada en los aceites concentrados 5x, 10x y 20x en sus tres relaciones con la  $\beta$ -CD (4:96, 12:88, 16:84),

utilizando las concentraciones de 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/mL (no se utilizaron concentraciones mayores debido a la concentración de ciclodextrina presente, determinando el efecto de los complejos de inclusión a concentraciones iguales o menores a 10 mg/mL). Los resultados obtenidos mostraron que a mayor concentración de aceite encapsulado, mayor inhibición micelial para ambas cepas utilizadas. Aun con variaciones, se obtuvo que los aceites concentrados 5x, 10x y 20x mostraron disminución en crecimiento en 10 mg/mL. El menor crecimiento micelial para *A. niger* se presentó en el concentrado 10x en la relación 16:84 y 12:88 en la concentración de 10 mg/mL, mientras que para *A. flavus* se observó en los 3 concentrados en ambas relaciones a excepción del 20x. La CIF no se logró determinar, sin embargo se utilizaron unidades arbitrarias del 0 - 5 (representados con +) para determinar el crecimiento micelial, siendo el 0 la ausencia, mientras que el 5 el crecimiento máximo comparable con el control positivo, mostrándose en las Tablas 13 y 14, para *A. niger* y Tablas 15 y 16, para *A. flavus* en relaciones 12:88 y 16:84, respectivamente.

Tabla 13. Crecimiento micelial de *A. niger* en presencia de complejos de inclusión en la relación 12:88

Aceite	Concentración mg/mL				Control
	1.25	2.5	5	10	
12:88					
5x	+++++	++++	++++	+++	+++++
10x	++++	+++	+++	++	+++++
20x	+++++	++++	++++	++++	+++++

+++++ abundante crecimiento  
 ++++ crecimiento regular  
 +++ crecimiento medio  
 ++ poco crecimiento  
 + muy poco crecimiento

Tabla 14. Crecimiento micelial de *A. niger* en presencia de complejos de inclusión en la relación 16:84

Aceite	Concentración mg/mL				Control
	1.25	2.5	5	10	
16:84					
5x	++++	+++	+++	+++	+++++
10x	++++	+++	++	+	+++++
20x	++++	++++	++++	++++	+++++

+++++ abundante crecimiento  
 ++++ crecimiento regular  
 +++ crecimiento medio  
 ++ poco crecimiento  
 + muy poco crecimiento

Tabla 15. Crecimiento micelial de *A. flavus* en presencia de complejos de inclusión en la relación 12:88

Aceite 12:88	Concentración mg/mL				Control
	1.25	2.5	5	10	
5x	+++++	+++++	++++	+++	+++++
10x	+++++	++++	++++	+++	+++++
20x	+++++	+++++	++++	++++	+++++

+++++ abundante crecimiento  
 ++++ crecimiento regular  
 +++ crecimiento medio  
 ++ poco crecimiento  
 + muy poco crecimiento

Tabla 16. Crecimiento micelial de *A. flavus* en presencia de complejos de inclusión en la relación 16:84

Aceite 16:84	Concentración mg/mL				Control
	1.25	2.5	5	10	
5x	+++++	+++++	++++	+++	+++++
10x	+++++	++++	++++	+++	+++++
20x	+++++	+++++	++++	+++	+++++

+++++ abundante crecimiento  
 ++++ crecimiento regular  
 +++ crecimiento medio  
 ++ poco crecimiento  
 + muy poco crecimiento

## 8. DISCUSIÓN

Los aceites esenciales de cítricos se han aplicado industrialmente en una amplia variedad de productos, incluyendo alimentos, bebidas, cosméticos y medicamentos debido a su sabor y/o aroma (Settanni et al. 2012; Liu et al. 2012). En esta investigación, se utilizó AN obtenido industrialmente por prensado en frío y posteriormente se obtuvieron los aceites concentrados de naranja por destilación fraccionada, con denominación 5x, 10x y 20x, mostrado en la Tabla 1, un parámetro como la densidad se observa que aumenta dependiendo de la concentración del aceite debido posiblemente a que sus componentes de mayor peso molecular se van concentrando, pero se volatilizan aquellos con peso molecular bajo (Lopes et al. 2003). Existen pocos estudios relacionados con los aceites concentrados de cítricos, es por eso que se tomó importancia para este estudio.

En el estudio del perfil cromatográfico, su análisis cualitativo y cuantitativo de los principales componentes del aceite esencial de naranja y sus concentrados (5x, 10x y 20x) mostró diferencias en la composición y porcentaje de los compuestos presentes (Tabla 2) Estos resultados concuerdan con estudios anteriores (Espina et al. 2011; Ruiz y Flotats, 2014; Singh et al. 2010), donde se menciona que existen diferencias en el perfil cromatográfico del AN dependiendo del tipo de extracción, conservando sus componentes mayoritarios como el D-Limoneno, coincidiendo con nuestros resultados que mostraron este compuesto como mayoritario. Lopes et al. (2003) realizaron un estudio donde utilizaron diferentes parámetros durante la destilación al vacío, encontrando variaciones cuantitativas importantes en los perfiles cromatográficos coincidiendo con las variaciones encontradas en nuestros resultados. Estas diferencias encontradas podrían deberse al tipo de proceso de extracción, ya que se sabe que el proceso de destilación al vacío, proporciona fracciones concentradas provenientes del aceite esencial de naranja mediante la eliminación selectiva de limoneno (principal constituyente) y otros terpenos hidrocarbonados, aumentando así la concentración de compuestos oxigenados principalmente aldehídos y alcoholes (Lopes et al. 2003; O'Bryan et al. 2008). Los terpenos hidrocarbonados (incluyendo el limoneno) requieren ser removidos para obtener un producto final estable debido a que no contribuyen de manera determinante al sabor y

fragancia del aceite, además son inestables al calor, luz y disminuir la solubilidad del aceite (Beneti et al. 2011; Liu et al. 2012; Lopes et al. 2003). El presente estudio examinó la composición química del aceite esencial de naranja y aceites concentrados 5x, 10x y 20x, para comparar diferencias entre sus constituyentes, debido a que los aceites concentrados proporcionan una mayor intensidad saborizante por el aumento en concentración de compuestos oxigenados en comparación con el aceite de naranja obtenido por prensado en frío, además son menos susceptibles a la oxidación y el desarrollo de mal sabor, mostrando así una mejor estabilidad y solubilidad en alcohol, con mayor interés industrial, en comparación con el aceite de naranja (Beneti et al. 2011; Lopes et al. 2003). El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permitió conocer la composición química y la abundancia relativa de los principales componentes, los cuales se agrupan en varias clases: monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos oxigenados y otros (aldehídos, cetonas, ésteres) (Tabla 2). Estos resultados mostraron similitudes cualitativas, así como diferencias cuantitativas en los componentes de cada uno de los aceites analizados, mostrando una disminución en la mezcla de monoterpenos hidrocarbonados en todos los aceites concentrados comparadas con el AN, siendo el aceite 20x el que presentó la menor cantidad. En monoterpenos oxigenados se detectó un aumento en la concentración de los aceites concentrados respecto al AN, coincidiendo con Lopes et al. (2003), quienes al analizar los perfiles cromatográficos de aceite concentrado de naranja 5x, reportaron una disminución inversamente proporcional respecto al concentrado de naranja de compuestos hidrocarbonados como limoneno, mirceno, entre otros. Mientras que para los compuestos oxigenados como el decanal y linalool se reportó un aumento directamente proporcional respecto al aceite concentrado de naranja.

De acuerdo con algunos reportes (Espina et al. 2011; Njoroge et al. 2005; Singh et al. 2010) el limoneno se encuentra en un 90% reconociéndose como el componente principal del aceite esencial, coincidiendo con nuestros resultados, donde el AN presentó 91.12% de D-Limoneno. Cuando se analizaron los aceites concentrados, se detectó una disminución en el porcentaje de D-Limoneno, resultando el aceite 20x con el menor porcentaje, mientras que los aceites 10x y 5x se mantuvieron alrededor del 73 %. De los

demás componentes que resultaron mayores al 1%, como el decanal y linalool considerados por aportar fragancia y actividad biológica aumentaron considerablemente en los aceites concentrados (Liu et al. 2012; Fisher y Phillips, 2006a). La composición de los aceites esenciales varía con respecto a las condiciones ecológicas geográficas, edad de la planta, métodos de cultivo, momento de la cosecha, tipo de extracción y separación (Nannapaneni et al. 2009; Singh et al. 2010). Tal variación en la composición química de los aceites esenciales, sin duda podría alterar su actividad biológica (Singh et al. 2010). Con base a lo anterior, se consideró también evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites en estudio.

Respecto a la actividad antimicrobiana, los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado por Frassinetti et al. (2011) quienes reportaron la menor actividad antimicrobiana para el D-Limoneno comparado con aceites esenciales de cítricos en bacterias como *Xanthomonas campestris*, así como lo reportado de Nannapaneni et al. (2009) quienes encontraron poca o nula actividad antimicrobiana del D-Limoneno en bacterias como *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni*. A pesar de las diferencias significativas encontradas en los halos de inhibición entre los concentrados en este estudio y de una mínima pero aparente sensibilidad mayor de *S. typhi* por el método de difusión en disco, al realizar la CMI y CMB, el aceite con mayor potencial antimicrobiano fue 20x encontrando que la bacteria más sensible fue *L. monocytogenes* mientras que la más resistente fue *S. typhi*, esto pudiera deberse a que el método de difusión en disco es limitado, debido principalmente a variaciones en la capacidad de difusión de los compuestos activos en el agar, el tamaño del halo de inhibición no necesariamente es correspondiente con la CMI/CMB determinada en medio líquido (Nannapaneni et al. 2009; O'Bryan et al. 2008). Por otra parte, la CMI/CMB varió de una bacteria a otra confirmando las observaciones de Kim et al. (1995), quienes reportaron que un mismo compuesto puede tener diferentes efectos antimicrobianos o nulos sobre los diferentes microorganismos. Esto dependerá de algunos factores como el tipo de Gram y variabilidad de compuestos presentes que en ocasiones pudieran ejercer un sinergismo entre ellos (O'Bryan et al. 2008). Se ha reportado que las bacterias Gram (-) poseen una resistencia mayor que las Gram (+) debido a la doble membrana que éstas poseen, ya que la membrana externa rodea a la pared celular ejerciendo una protección extra que restringe

la difusión de compuestos hidrofóbicos (Burt, 2004). En nuestro estudio se utilizó la bacteria Gram (-) *S. typhi* que presentó una mayor resistencia al efecto antimicrobiano de los aceites esenciales y aceites concentrados. Mientras que las Gram (+) presentaron menor resistencia encontrando variaciones entre ellas. A pesar de estas observaciones, existen reportes de bacterias Gram (-) más susceptibles que las Gram (+) o incluso sin diferencia significativa en susceptibilidad debido a otros factores que juegan un papel importante en la actividad antimicrobiana tales como sinergismo entre los compuestos. Se ha demostrado que aquellos componentes que se encuentran en menor proporción, juegan un papel crítico en la actividad antimicrobiana y tienen un efecto sinérgico que potencializa la actividad biológica (Burt, 2004). En este estudio, el aceite 20x presentó la mayor actividad antimicrobiana seguida de la 10x y 5x, esto pudiera deberse al aumento en la concentración de los componentes minoritarios que poseen actividad antimicrobiana que podrían actuar en sinergia con otros compuestos presentes, ya que se ha demostrado que los aceites de cítricos son mezclas complejas de aproximadamente 400 compuestos cuyo contenido depende de los métodos de cultivo, extracción y separación específicos además de la condición ecológica, geográfica y la edad de la planta que podrían alterar el perfil químico cuantitativo y cualitativo del aceite, por lo que la actividad biológica se atribuye a una sinergia entre éstos y no a un único compuesto (Jing et al. 2014; Nannapaneni et al. 2009; Singh et al. 2010).

Existen estudios respecto al uso de fracciones a partir del aceite esencial de naranja; desterpenados, terpenados, terpenos de alta pureza, terpenos a partir de esencia de naranja, aceite concentrado 5x (Nannapaneni et al. 2009; O'Bryan et al. 2008), compuestos aislados (Liu et al. 2012), utilizando diferentes especies de naranja (Settanni et al. 2012; Sing et al. 2010) o diferentes variedades de aceite de cítricos (Espina et al. 2011; Frassinetti et al. 2011; Settanni et al. 2012). Sin embargo, no se encontraron estudios sobre el uso de aceites concentrados a partir de aceite esencial de naranja, obtenidas por destilación fraccionada al vacío, como 10x y 20x utilizadas en esta investigación.

La actividad antioxidante del AN, DL y aceites concentrados 5x, 10x, 20x fue analizada mediante los radicales de DPPH y ABTS. Los resultados obtenidos evidenciaron

diferencia significativa en la actividad antioxidante en los aceites concentrados 5x, 10x, 20x con respecto al AN y DL, siendo el aceite 20x el que mostró la mayor actividad antioxidante. El análisis estadístico reveló diferencia significativa en la actividad antioxidante del aceite 20x con respecto a 10x y 5x. Los aceites concentrados 20x, 10x y 5x son principalmente utilizados en la industria de alimentos, farmacéuticos y cosméticos por características de sabor y aroma, sin embargo pocos estudios se han realizado para determinar su actividad antimicrobiana y antioxidante que de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio los aceites concentrados mostraron mejor actividad biológica en comparación al aceite esencial de naranja, esto pudiera deberse que al concentrar el aceite, se potencializan aquellos compuestos que se encuentran en menor proporción, reduciendo el contenido de D-limoneno que en condiciones normales se encontraría aproximadamente en un 90 %.

En algunas investigaciones, se ha sugerido que la actividad antioxidante de aceites esenciales de cítricos podría estar relacionada con la presencia del D-Limoneno así como otros monoterpenos como el  $\gamma$ -terpineno y terpinoleno (Choi et al. 2000; Frassinetti et al., 2011). Sin embargo, en el presente estudio se obtuvo mejor actividad antioxidante por parte de los aceites concentrados (5x, 10x, 20x), que según el perfil cromatográfico, la cantidad de D-Limoneno presente disminuyó mientras que otros componentes como decanal y linalool se incrementaron. Estos resultados coinciden con Choi et al. (2000), quienes reportaron que a pesar de que el D-limoneno está como componente principal en el AN, este no juega un papel importante en la determinación de la actividad antioxidante, observándose que en el aceite 20x mostró la mejor actividad antioxidante siendo ésta la que presentó menor cantidad de D-Limoneno, mostrando que la actividad antioxidante, está dada también por compuestos diferentes al D-Limoneno, que al aumentar su concentración presentan una mayor actividad antioxidante, o en su defecto una actividad sinérgica en los compuestos presentes que potencializan esta capacidad antioxidante. Se han realizado estudios analizando la actividad antioxidante de compuestos puros por separado, presentes en el AN. De acuerdo a Liu et al. (2012), el AN presentó mejor actividad antioxidante, así como antimicrobiana, que los compuestos puros como el linalool, decanal, valenceno y octanal, lo que pudiera confirmar según los resultados

obtenidos en este estudio, que la actividad biológica presente en los aceites esenciales no es debida a un solo compuesto, sino a la sinergia entre varios de ellos. De ser así, los aceites concentrados proporcionarían características biológicas diferentes a las encontradas en sus respectivos aceites esenciales, lo que abriría la pauta para nuevas investigaciones dirigidas a la aplicación estratégica de este tipo de compuestos, tomando en cuenta que la eficacia relativa de antioxidantes depende del tipo de acción que presenten (inhibidor de radicales libres, descomposición de peróxido o limpiador de oxígeno), sistema de prueba, concentración, método utilizado y la etapa de crecimiento en la planta (Choi et al. 2000).

Por los resultados obtenidos en los estudios realizados en la actividad biológica para AN, DL, 5x, 10x y 20x, los que obtuvieron mejores valores en la actividad antimicrobiana y antioxidante fueron los últimos 3, por lo que se decidió que se encapsularan solo los aceites concentrados de naranja 5x, 10x y 20x, mediante emulsiones y complejos de inclusión con  $\beta$ -CD.

Se desarrollaron 10 formulaciones de las emulsiones utilizándose como fase oleosa AN y se determinó que la formulación 1, resultó con mejor estabilidad debido a que parámetros como tamaño de partícula, índice de cremado, tasa de coalescencia se mantuvieron estables durante 30 días, por lo que fue seleccionada para los aceites concentrados 5x, 10x y 20x. Los materiales de pared influyen considerablemente en la estabilidad de las emulsiones. Macromoléculas como las proteínas y los polisacáridos juegan un papel muy importante en la estabilización de emulsiones aceite-agua (O/W), este tipo de moléculas alimenticias contribuyen a la estructura, textura y estabilidad debido a sus propiedades espesantes y comportamiento gelante (Ruiz, 2004), influenciando la interacción entre ellos para mantener la estabilidad durante el tiempo.

La composición de los materiales de pared puede afectar el comportamiento de la emulsión, en esta investigación se utilizaron ingredientes con proteína como WPC y con carbohidratos como  $\beta$ -CD y gomas como la xantana. Hye-Sook et al. (2011), reportó que la interacción entre WPC/CD influye fuertemente en el tamaño de partícula con aceite de

pescado, formando pequeñas gotas de aceite en la emulsión, reportando valores de 120 – 700 nm, lo cual difiere un poco en esta investigación siendo alrededor de 1.5  $\mu\text{m}$ , sin embargo, este parámetro no solo está influenciado en los materiales de pared, sino también por la etapa de homogeneización (Rao y McClements, 2012). Por otro lado, al microscopio óptico, las gotas de aceite se observaron uniformes y sin aglomeración, lo que indica que no se están floculando, al respecto los estudios realizados por Jafari et al. (2012b) mencionan que la gota de aceite de D-limoneno, estuvo influenciada por la cantidad de goma arábica, cuando estaba al 10% la distribución de tamaño y las gotas están completamente estabilizadas y alejadas una de la otra debido a las fuerzas repulsivas y al aumento de la viscosidad producido por la goma, sin embargo, a una concentración del 1%, se puede ver que la distribución de tamaños es amplia y las gotas se acercan una a la otra ocasionando floculación, y finalmente la coalescencia. El índice de cremado cuantifica la estabilidad de la emulsión en porcentaje debido a que se puede observar físicamente la homogeneización o separación de la emulsión. Se realizaron 10 formulaciones para emulsiones, 5 de ellas fueron estables y el resto inestables. Las emulsiones tienen diferentes mecanismos por los que pueden presentar inestabilidad, en esta investigación en particular, de manera general las emulsiones que presentaron inestabilidad mostraron “cremado” es decir, que por efecto de la gravedad y densidad, las gotas de aceite al ser menos densas que la fase continua (acuosa), se observa en la parte superficial de la emulsión la aglomeración de los materiales utilizados, esto se presentó en las formulaciones de emulsiones 3, 4, 5, 6 y 10; el balance de los materiales de pared utilizados también se requiere considerar debido a que las formulas 5, 6 y 10, no contenían WPC,  $\beta$ -CD, XG, respectivamente, pero en la 3 y 4 contenían menos cantidad de XG y WPC, es decir, al no añadir algún material de pared se inestabiliza el sistema por lo cual cada uno influye de manera importante en la emulsión al final. En emulsiones con aceite de pescado utilizando XG en su formulación obtuvieron emulsiones con alta estabilidad, debido a que este ingrediente proporciona estabilidad en emulsiones O/W, debido a que es un excelente viscosificador y estabilizador (Hye-Sook et al. 2011). Con esto, la tasa de coalescencia se obtuvo de manera cuantificable por lo que las emulsiones más estables fueron las formulaciones 1, 2, 7, 8, 9.

Para la siguiente etapa de la investigación, se eligió la formulación de la emulsión 1, para utilizarla en los aceites concentrados 5x, 10x y 20x, debido a que mostró mejores valores de estabilidad. Se realizó el análisis de tamaño de partícula, tasa de coalescencia y actividad antioxidante a las emulsiones realizadas con los concentrados almacenadas a temperaturas de 4, 25 y 55 °C durante 93 días. Anteriormente, se habían realizado análisis de índice de cremado en las formulas, sin embargo, en esta parte, investigamos una posible correlación en la estabilidad de la emulsión con la concentración del aceite y la protección de la actividad antioxidante durante el tiempo a las temperaturas mencionadas anteriormente.

El tamaño de partícula que presentaron las emulsiones almacenadas a temperatura de 4 y 25 °C fueron menores a 2.2  $\mu\text{m}$ , sin embargo, a temperatura de 55 °C todas las emulsiones fueron superiores a 4.9  $\mu\text{m}$ . Jafari et al. (2012b), evaluaron la estabilidad de emulsión con diferente proporción de limoneno (5 y 10 %) en el análisis de tamaño de partícula preparadas como goma angum y arábica a diferentes concentraciones almacenadas de 1 a 4 días; obtuvieron tamaños de partícula entre 1.6 – 3.8  $\mu\text{m}$ , reportando que el tipo y la cantidad de cada goma no influyó de manera considerable este parámetro, mencionando que la cantidad del aceite tuvo una influencia significativa en la tensión superficial de la emulsión, no así en la estabilidad de la misma. Sin embargo, la composición de un aceite concentrado es diferente debido a que los compuestos de peso molecular alto se mantienen y aumentan al concentrarse el aceite, como se observó en la sección 7.2 de esta investigación, al respecto Roa y McClements, (2012), realizaron estudios sobre la influencia en la formación y propiedades de emulsiones de aceite en agua con aceites concentrados de limón de 1x, 3x, 5x y 10x, reportando que las emulsiones fueron inestables por el aumento del tamaño de partícula, sin embargo conforme aumentaba el concentrado disminuía el tamaño de partícula, siendo el más estable el realizado con el concentrado de aceite 10x, concluyendo que el tamaño de partícula se dirige a un aumento en la cremación en las emulsiones. En las emulsiones realizadas en esta investigación con aceites concentrados 5x, 10x y 20x, no se observó que el concentrado pudiera influir en la estabilidad de la emulsión, debido a que se mantuvieron dentro de los mismos valores, pero si hubo afectación en la estabilidad de la emulsión por el tiempo y temperatura de

almacenamiento, como es reportado por Jafari et al. (2012b), quienes almacenaron las emulsiones con limoneno durante 3 días a 25 °C, donde solo ligeramente aumentaba el tamaño de partícula en algunas formulaciones, sin embargo el tiempo y temperatura de este estudio fue relativamente corto y una temperatura idónea, lo cual no permiten conocer el comportamiento de la estabilidad de la emulsión completamente. En esta investigación, las emulsiones fueron almacenadas a diferentes temperaturas (4, 25 y 55 °C) precisamente para conocer si la temperatura influye en la estabilidad de la emulsión, en todos los casos la temperatura de almacenamiento que ocasionó inestabilidad en el sistema fue a 55 °C, caso contrario de temperaturas de 4 y 25 °C, esto posiblemente debido a que a temperaturas mayores los materiales de pared como  $\beta$ -CD, WPC y XG, pudieran presentar rompimientos en su sistema por los componentes, en el caso de la  $\beta$ -CD, la estabilidad térmica del complejo varía dependiendo del analito, pero la mayoría de los complejos empiezan a desnaturalizarse a partir de 50-60 °C, en el caso de la WPC y XG, los enlaces de las proteínas y carbohidratos se ven desfavorecidos al incrementar la temperatura. Un estudio realizado con aceite concentrado de limón 1x, 3x, 5x y 10x, reportaron que las emulsiones con mayor concentración del aceite (10x) presentaron más estabilidad con el tiempo (12 h), pero en la temperatura de almacenamiento el tamaño de partícula se vio influenciada en aceites concentrados 3x y 5x, el tamaño de partícula fue directamente proporcional al incremento de la temperatura (20 y 37 °C), pero en el concentrado de aceite 10x no influyó la temperatura con el tiempo, concluyendo que la estabilidad de las emulsiones aceite/agua disminuía a medida que aumentaba la concentración del aceite, atribuyéndole este efecto a cambios en la solubilidad de los aceites en agua, debido a la presencia de componentes con baja solubilidad pudiendo evitar el crecimiento de gotas y generar un efecto de maduración composicional que se opuso al efecto de maduración Ostwald (Roa y McClements, 2012).

La actividad antioxidante de los aceites concentrados 5x, 10x y 20x, fue evaluada con radicales ABTS y DPPH por un periodo de 93 días a temperaturas de almacenamiento de 4, 25 y 55 °C, debido a que son temperaturas en condiciones de refrigeración, temperatura de ambiente y de algún proceso térmico ligero. Los resultados muestran diferencia significativa entre el aceite sin emulsión (libre) y aceite en emulsión en el análisis de

actividad antioxidante para ambos radicales, sin embargo, a través del tiempo la actividad antioxidante se mantuvo de acuerdo al mes de inicio, es decir, del primer mes al tercer mes no hubo cambio en los valores de los análisis de la actividad antioxidante, pero las emulsiones que fueron almacenadas a temperatura de 55 °C, si hubo una disminución en la actividad antioxidante para el aceite 20x en el radical ABTS, lo cual indica que el balance del material de pared de  $\beta$ -CD, WPC, XG, ayudó a mantener dicha actividad durante el tiempo de análisis, considerando que la temperatura para mantener las emulsiones estables y su actividad antioxidante sería en 4 y 25 °C, ya que se mostraron valores óptimos en la estabilidad y actividad biológica. La selección de la combinación de los materiales de pared puede afectar las propiedades de la emulsión durante el almacenamiento (Carneiro et al. 2013), esto influye en la protección del ingrediente activo en la emulsión, durante el tiempo de almacenamiento.

En esta investigación, se realizó la microencapsulación por emulsiones con diferentes materiales de pared, mencionados anteriormente, debido a que este en un sistema de protección líquido, sin embargo, también existía el interés de realizar la protección en un sistema sólido como son los complejos de inclusión con  $\beta$ -CD.

Se realizaron los complejos de inclusión de los aceites concentrados 5x, 10x y 20x con  $\beta$ -CD, obteniendo las relaciones 4:96, 12:88 y 16:84, respectivamente, se eligieron estas combinaciones de relaciones con base a referencias bibliográficas, realizadas con diferentes aceites, sin embargo, el comportamiento de cada aceite con la  $\beta$ -CD es distinto, debido a que la interacción interna de la  $\beta$ -CD con el analito depende de varios factores en el proceso y de la estructura química de cada parte.

En todos los tratamientos, se obtuvo polvo de color ligeramente amarillo, diferente del color original de la  $\beta$ -CD (blanco); la interacción de los aceites concentrados con la  $\beta$ -CD probablemente es la diferencia del color final. El rendimiento de los complejos de inclusión es el porcentaje del polvo obtenido entre el material originalmente utilizado (aceite +  $\beta$ -CD). En la Figura 8, se muestran los resultados de rendimiento en porcentaje obteniéndose valores que oscilan entre 74.37 – 84.83 %, existiendo una diferencia

significativa entre los aceites y las relaciones. Estos resultados concuerdan con algunos autores que han realizado complejos de inclusión con aceite de canela, ajo, timol, *Santurela montana* (Ayala-Zavala et al. 2008, Petrović et al. 2010, Haloci et al. 2014). Investigaciones similares, reportan resultados de rendimiento del 98.41 % utilizando aceite de tomillo en una relación 14:86 (Toro-Sánchez et al. 2010). Así mismo se ha probado la saturación de  $\beta$ -CD, que se ha producido en otras concentraciones, como el caso del aceite de canela se obtuvo en la relación 16:84 con 94.82 % y en el aceite de ajo se obtuvo ésta saturación a una relación de 12:88 con 94.58 % (Ayala-Zavala et al. 2008). Sin embargo, hay algunos factores que pueden contribuir a la pérdida del concentrado del aceite en la  $\beta$ -CD como son: la retención del aceite en la solución después de formar el complejo, el equilibrio de sabores entre el líquido y el estado complejado, la evaporación del aceite superficial durante el proceso de complejación, la evaporación durante el paso de secado. La pérdida del  $\beta$ -CD y del polvo complejo se asigna principalmente a la solubilidad de  $\beta$ -CD en agua (Petrović et al. 2010).

Para los resultados de aceite encapsulado (mg/g  $\beta$ -CD) y eficiencia de encapsulación (%) realizadas para los aceites concentrados y  $\beta$ -CD en sus 3 relaciones son mostradas en la Tabla 10. Los valores de aceite encapsulado fluctuaron entre 7.7 - 102.3 mg / g  $\beta$ -CD, para la relación 12:88 de 20x obtuvo una diferencia significativa con 102.3 mg / g  $\beta$ -CD, seguida por la relación 16: 84 del mismo aceite con 83.1 mg / g  $\beta$ -CD. Para el resto de aceites y sus proporciones hubo diferencia significativa obteniendo valores <60 mg / g  $\beta$ -CD. En general, la relación de 4:96 fue la menor interacción entre aceites concentrados y  $\beta$ -CD, debido a los bajos valores de aceite encapsulado. Madene et al. (2006), informaron que los complejos de inclusión son el resultado de interacciones entre compuestos, que donde encajan mejor las moléculas huésped más pequeñas, debido a que sus dimensiones pueden incluirse dentro de la cavidad de la ciclodextrina. Petrović et al. (2010), concluyeron que una relación óptima para complejos de inclusión con aceite de canela era de 15:85, obteniendo 117.2 mg / g de CD, mencionando que la polaridad de los compuestos podría desempeñar un papel importante en la complejación, compuestos menos polares forman más complejos que los compuestos polares. Estos resultados pueden sugerir que la máxima inclusión de  $\beta$ -CD con aceites concentrados se ha alcanzado

en la relación 12:88 para 5x, 10x y 20x. Para la eficiencia de encapsulación, los resultados son consistentes con estudios previos como Kfoury et al. (2016); Kamimura et al., (2014); Santos et al. (2015a), quienes han estudiado diferentes compuestos como eugenol, carvacrol y otros, informando valores de % EE entre 17 – 99 %. Este estudio, tuvo buenos resultados en la eficiencia de encapsulación con valores entre 67.1 – 89.5 %. Dos Passos et al., (2016), informaron valores bajos de eficiencia de los complejos de inclusión de limoneno, posiblemente este compuesto no estaba completamente complejado permaneciendo en la superficie y por los factores implicados en el proceso como volatilización por la etapa de calentamiento y secado. La relación óptima de aceite: $\beta$ -CD fue de 12:88 para todos los aceites. Otro factor a considerar es el perfil químico de cada aceite concentrado, como es el limoneno, donde en aceite de naranja se obtuvo por arriba del 90 % y para el aceite 20x es del 23.24 %, aumentando otros compuestos con mayor peso molecular, pudiendo ser más difícil de interactuar con el interior de la cavidad de la  $\beta$ -CD, contrario a los compuestos volátiles de menor peso molecular, ya que estos compiten por el interior de la  $\beta$ -CD; diferentes moléculas tienen diferentes equilibrios en solución que los impulsan a formar complejos de inclusión o permanecer en solución (Tao et al. 2014). Por otro lado, el método seleccionado puede ser crucial en el porcentaje de eficiencia de encapsulación, Wang et al. (2011), reportó un 90.3% por método de coprecipitación, en este mismo método utilizando Trans-anetol se informó 51.29% por Zhang et al. (2015), mientras que Santos et al. (2015a), reportaron 91.3% utilizando carvacrol por liofilización a bajas temperaturas, pero 83.8% por el método de amasado.

La Tabla 11, muestra los tamaños de partícula de los complejos de inclusión en los aceites concentrados 5x, 10x y 20x, con las relaciones 4:96, 12:88 y 16:84 con la  $\beta$ -CD respectivamente, mostrando suspensiones y partículas dispersas de diferentes tamaños de acuerdo a su relación con valores de 1.5 – 3.6  $\mu$ m. Estos resultados coincidieron con los reportados por Tao et al. (2014) al trabajar con aceite de tomillo (3.2  $\mu$ m), quienes mencionan que el método utilizado para realizar los complejos de inclusión puede influir en el tamaño de partícula, además del tiempo de complejación durante el proceso de agitación. Sin embargo,  $\beta$ -CD tiene una fuerte tendencia a la aglomeración como consecuencia de su autoensamblaje en agua (Tao et al. 2014), debido a la falta de carga

neta sobre las partículas del complejo de inclusión, lo que significa que no hay repulsión para evitar la aglomeración de partículas (Hill et al. 2013). Las ciclodextrinas y sus complejos pueden formar agregados solubles en agua en soluciones acuosas y estos agregados pueden ser capaces de solubilizar fármacos lipófilos mediante complejación sin inclusión o estructuras similares a micelas (Tao et al. 2014).

La caracterización de los aceites ha sido estudiada por medio de espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) entre los componentes del AN, incluso de los aceites concentrados 5x, 10x y 20x, es de gran importancia en la industria, sin embargo, ha sido poco estudiada. Este análisis permite conocer la interacción molecular de los complejos de inclusión entre los componentes de los aceites concentrados y la  $\beta$ -CD, además para analizar la fuerza impulsora entre los aceites y la  $\beta$ -CD en el proceso de formación de los complejos. En el Anexo, se muestran los espectros IR de los complejos de inclusión de los aceite concentrados 5x, 10x y 20x con la  $\beta$ -CD en las relaciones 4:96, 12:88 y 16:84, los cuales se observa la misma tendencia; se puede observar el comportamiento del número de ondas para la  $\beta$ -CD pura mostrando una significativa banda a  $3467\text{ cm}^{-1}$ , lo cual representa enlaces  $\nu(\text{O-H})$ , posteriormente en  $2946\text{ cm}^{-1}$  representando  $\nu(\text{C-H})$  además de una gran cantidad de bandas entre las regiones  $\nu(\text{C-O})$ ,  $\nu(\text{C-C})$ ,  $\nu(\text{C-C})$ . En la Figura 9, se pueden observar claramente vibraciones remarcadas en la banda aproximadamente en  $2800\text{ cm}^{-1}$ , los cuales están relacionados con el compuesto metileno cuyos principales enlaces son (C-H) cercano a  $2926\text{ cm}^{-1}$ , característico de los aceites concentrados se vio disminuido, por tanto la desaparición de la banda típica indica en algún grado se incluyó en la cavidad de la  $\beta$ -CD, de tal modo indicaron la formación exitosa de los complejos de inclusión  $\beta$ -CD/aceite. Además, está acompañado de la presencia de cadenas de ácidos grasos, ceras, carotenoides y fitoesteroles. Otro número de vibraciones se observa en  $1500\text{ cm}^{-1}$  dentro del espectro FTIR, representando la presencia de ácidos grasos e hidrocarburos, atribuidos principalmente flavonas polimetoxiladas las cuales no han sido caracterizadas aún, así mismo esta vibración puede ser asignada razonablemente a la unión  $\nu(\text{C=C})$  unido a los anillos de fenilflavona (Manthey, 2006). Los aceites concentrados 5x, 10x y 20x muestran el mismo comportamiento, sin embargo, en cada uno se ven disminuidas estas vibraciones, esto se debe a que el AN al concentrarse

va disminuyendo dichos compuestos como la presencia de carotenoides, ceras y fitoesteroles, además de compuestos polihidroxilados (Manthey, 2006). El uso de la técnica de FTIR permite la detección de formación de complejos en fase sólida y señalar la implicación de los diferentes grupos funcionales de las moléculas huésped y anfitrión, permitiendo el estudio de los cambios en las características espectrales de las moléculas huésped (Calabro et al, 2004). La metodología para realizar los complejos de inclusión también influye si hay completa interacción entre el compuesto y la  $\beta$ -CD; Toro-Sánchez et al. (2010) realizaron los complejos de inclusión con aceite de tomillo utilizando la técnica de co-precipitado y mezcla física, mencionando que se observó interacción entre el complejo, debido a que no se observaban las bandas características del aceite en el espectro del complejo de inclusión para el método de co-precipitado, contrario al método de mezcla física, donde a pesar de haber obtenido el polvo del complejo de inclusión la interacción entre el aceite y la  $\beta$ -CD no fue efectuada, debido a que permanecían en el espectro las bandas características del aceite sin encapsular y el que se acomplejo con la  $\beta$ -CD, además de observar que el análisis de FTIR reveló las diferencias entre las posiciones de las bandas de los complejos respecto a los componentes iniciales, estas diferencias son típicas en la  $\beta$ -CD debido a la pérdida de la vibración y la flexión de la molécula huésped durante la formación del complejo. Otro estudio realizado en la obtención de complejos de inclusión de Limoneno con  $\beta$  y  $\alpha$ -CD en 3 diferentes métodos (mezcla física, pasta y slurry), reportando que solo obtuvieron complejos de inclusión en el método de pasta con  $\alpha$ -CD, para la  $\beta$ -CD solo en el método de pasta y slurry con el limoneno, y revelando que no hubo interacción entre el aceite y las ciclodextrinas en el método de mezcla física (Dos Passos et al. 2016).

Para conocer la morfología de los complejos de inclusión se utilizó el microscopio electrónico de barrido para obtener las imágenes de los complejos de inclusión con la  $\beta$ -CD y observar si hay una alteración morfológica en compuestos puros y los complejos de inclusión. En este estudio se realizó principalmente en la 12:88, debido a que en la mayor parte de los análisis realizados fue la que mejores resultados presento (Figura 10). La morfología muestra en la  $\beta$ -CD pura, partículas cristalinas compactas, de forma amorfa e irregulares con tendencia a rectangular, de diferentes tamaños. Zhang et al. (2015),

observaron la morfología superficial de los complejos realizados con *trans*-anetol (compuesto aromático del anís) utilizando  $\beta$ -CD por el método co-precipitado y mezcla física, reportando que tuvieron estructuras cristalinas amorfas e irregulares y con cambios físicos dependiendo de la técnica utilizada siendo la mezcla física que presentó una morfología similar a la  $\beta$ -CD, pero en menor tamaño y al comparar en tamaño y forma de las partículas entre la  $\beta$ -CD y la mezcla física con la técnica de co-precipitado confirma la formación de complejo de inclusión de *trans*-anetol y la  $\beta$ -CD en esta última técnica, coincidiendo nuestros resultados con este y con otro estudio realizado con aceite de citronela con  $\beta$ -CD como uso como repelente (Songkro et al. 2012). Algunos autores mencionan que la alteración o cambio de las estructuras de cristal y polvo, sugiere la formación de los complejos de inclusión con la ciclodextrina (Shao et al. 2014; Duarte et al. 2015; Gibara et al. 2015).

Para establecer la continuidad de la actividad biológica que presentaron los aceites concentrados de naranja 5x, 10x, 20x sin encapsular, se realizaron estudios en la actividad antioxidante, antimicrobiana y antifúngica de los encapsulados de los aceites con  $\beta$ -CD en las tres relaciones estudiadas.

Numerosos estudios han investigado si el compuesto activo continúa con su acción biológica aun cuando se encuentra dentro de la cavidad de la  $\beta$ -CD. En la actividad antioxidante, radicales libres como DPPH y ABTS son utilizados ampliamente para el estudio de compuestos naturales (Duarte et al. 2015). Diversos investigadores han encapsulado con ciclodextrinas en distintas técnicas, algunos compuestos puros como resveratrol, estragol, ácido clorogénico, mangiferina y aceites esenciales de albahaca, estragón, estudiando si mantiene la actividad antioxidante que poseen estos compuestos aun con la presencia de la ciclodextrinas (Duarte et al. 2015; Ferreira et al. 2013; Kfoury et al. 2015; Shao et al. 2014). Los resultados de esta investigación mostraron que en la relación 12:88 de los tres aceites, no hubo diferencia significativa entre aceites sin encapsular frente a los complejos de inclusión, sin embargo, en las relaciones 4:96 y 16:84 si hubo diferencia significativa en los tres aceites estudiados. Estos resultados coinciden con investigaciones al encapsular compuestos como resveratrol utilizando una ciclodextrina modificada conocida como RM- $\beta$ -CD, reportando que no hubo diferencia

significativa del compuesto puro (13.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con el complejo de inclusión (11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) manteniendo la actividad antioxidante como fuerte (Duarte et al., 2015). En compuestos como el ácido clorogénico utilizaron  $\beta$ -CD y una ciclodextrina modificada llamada HP- $\beta$ -CD, reportando que el complejo de inclusión con HP- $\beta$ -CD tuvo mayor capacidad antioxidante, seguido del complejo con  $\beta$ -CD y finalmente el compuesto puro, observando que aun cuando está en complejo aumento la disponibilidad del compuesto para reaccionar con el radical DPPH, sin influenciar las ciclodextrinas debido a que no poseen actividad antioxidante (Shao et al., 2014). Kfoury et al. (2015) reportaron en el estudio de estragol compuesto que contiene el aceite esencial de albahacar y estragón, de manera pura y en complejos de inclusión utilizando distintos tipos de ciclodextrinas, observando que se mantuvo la actividad antioxidante del estragol, aceite esencial de albahacar y estragón reportando 2, 5, 9 %, pero en complejo de inclusión con  $\beta$ -CD se obtuvo 3, 8, 9 % respectivamente, y la actividad fue más alta en aceites esenciales debido a una sinergia entre los compuestos mayoritarios y minoritarios.

En cuanto al estudio de la actividad antimicrobiana de los complejos de inclusión, éste se realizó evaluando la inhibición de crecimiento de cepas de importancia en la industria de alimentos como son *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*. El aceite concentrado 5x y 20x mostró actividad en dos relaciones (12:88 y 16:84) respectivamente, obteniendo que la dosis requerida para inhibir el crecimiento microbiano al 90% es de 1.25 mg/mL.

La importancia de encapsular un compuesto es que aun estando recubierto pueda liberarse y ejercer la actividad que presenta en forma libre, es así que la industria de alimentos puede considerar compuestos naturales para ejercer acción inhibitoria en bacterias. Numerosas investigaciones han estudiado la aplicación de ciclodextrinas generando complejos de inclusión, por ejemplo con compuestos de aceites esenciales de canela, clavo, tomillo como trans-cinamaldehído, eugenol, timol, carvacrol, resveratrol contra bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua* y del género *Campylobacter* (Duarte et al. 2015; Hill et al. 2013; Santos et al. 2015a; Tao et al. 2014). En general, de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, si hay una inhibición en el crecimiento bacteriano en los complejos de inclusión, en las investigaciones mencionadas realizaron esta misma relación obteniendo que al encapsular

los compuestos puros en la cavidad de la  $\beta$ -CD mejora la eficacia antimicrobiana del aceite a una menor concentración, sin embargo dependía mucho del tipo de compuesto y de la cepa, debido a que algunos compuestos son más eficientes para algunas cepas. Hill et al (2013), reportaron menor MIC para inhibir el crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *Listeria innocua* en compuestos como trans-cinamaldehído, eugenol, extracto de canela y clavo requiriendo para su inhibición de 4.2 a 86% menos del compuesto usando de 0.16 a 1.15 mg/mL de complejos de inclusión, esto puede depender de la resistencia de la cepa ante el componente, debido a que la  $\beta$ -CD logra mejorar las capacidades antimicrobianas de los aceites esenciales pues la acción antimicrobiana de éstos es de distintas maneras, algunas en la membrana y dentro del citoplasma de las bacterias. También es posible que influya la técnica utilizada para la obtención de los complejos de inclusión; Tao et al. (2014) reportaron para el componente de timol y aceite de tomillo utilizando los métodos de obtención amasado y secado en frío, que este último fue más eficiente para la preparación de los complejos debido a que logró mayor inhibición de *Escherichia coli* K12 con concentraciones menores de ambos compuestos en comparación a la técnica de amasado, sin embargo, otra investigación en la que usaron para la preparación de complejos de inclusión las mismas técnicas pero con carvacrol, fue más efectiva la técnica de amasado inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli* K12 y *Salmonella thyphimurium* obteniendo inhibiciones cercanas al 70%.

El crecimiento micelial de las cepas *A. niger* y *A. flavus* se realizó en dos relaciones (12:88 y 16:84) y en los aceites concentrados (5x, 10x y 20x) obteniendo que la dosis para la disminución del crecimiento fue de 10 mg/mL sin embargo, *A. niger* fue menos resistente siendo el aceite 10x más efectivo para su inhibición. Haloci et al. (2014) realizaron un estudio utilizando el aceite de *Satureja montana* utilizando las relaciones de 5:95, 10:90 y 20:80 con 8 especies de hongos, reportando zonas de inhibición desde 3.13 a 100% en complejos de inclusión dependiendo de la relación de la cepa de hongo estudiada, y la relación más efectiva para la actividad antifúngica fue la 10:90. Kfoury et al. (2016) estudiaron la actividad antifúngica en algunos fenilpropanoides como estagol, eugenol entre otros, de forma libre y encapsuladas contra dos hongos de importancia en poscosecha como *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, reportando que la encapsulación con ciclodextrinas incrementó la solubilidad y fotoestabilidad de los compuestos estudiados y

propiedades antifúngicas notables, mostrando valores bajos de concentración inhibitoria en el crecimiento del micelio y la germinación de las esporas. Sin embargo, los resultados de esta investigación no mostraron alta inhibición en concentraciones bajas y esto puede deberse a que la  $\beta$ -CD actúa como una fuente de carbohidrato para los hongos, debido a que es una cadena cíclica de glucosa, según Ayala-Zavala et al. (2008), que reporta crecimiento micelial de *Alternaria alternata* en aceite de canela y ajo en la relación 12:88 y 16:84 en diferentes concentraciones de complejo de inclusión e incluso en  $\beta$ -CD libre se presentó mayor crecimiento que en el control. Sin embargo, esta respuesta depende del tipo de hongo, los requerimientos para su crecimiento y el poder inhibitorio que posee el componente o componentes a estudiar.

## 9. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de naranja y los aceites concentrados presentaron diferencias cualitativas y una tendencia inversamente proporcional en cuanto a la concentración de D-limoneno con respecto a la de otros compuestos como decanal, linalool y citral.
- Los aceites concentrados de naranja 5x, 10x y 20x presentaron mejor actividad antimicrobiana y antioxidante que el AN y DL.
- La emulsión de la fórmula 1 a más de 90 días mostró mejor estabilidad física, manteniendo su actividad antioxidante almacenada a temperaturas de 4 y 25°C.
- El complejo de inclusión con  $\beta$ -CD en la relación 12:88 con los aceites concentrados de naranja, mostró mayor eficiencia de encapsulación, concentración de aceite, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana en microorganismos de importancia en la Industria alimenticia.
- Se logró estabilizar los aceites concentrados de naranja mediante el uso de emulsiones con biopolímeros y complejos de inclusión con  $\beta$ -ciclodextrinas y se obtuvo un potencial aditivo alimenticio estable con actividad antioxidante y antimicrobiana.

## **10. PERSPECTIVAS**

En la actualidad, hay pocas investigaciones con el estudio de aceites concentrados de naranja debido a que estos son utilizados en su mayoría como ingredientes de aromas y sabores. Esta investigación proporciona información para el uso alternativo para estos aceites por los resultados obtenidos en su actividad biológica frente a microorganismos de importancia en la industria alimenticia, siendo protegidos de factores medioambientales mediante el desarrollo de emulsiones e inclusión molecular y posible alternativa en la utilización de aditivo en un alimento líquido o sólido.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca RL, Rodríguez FJ, Guarda A, Galotto MJ, Bruna JE. 2016. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry* 196: 968–975.
- Alfaro MJ. 2012. Desarrollo de metodologías de encapsulación utilizando aislado proteico de suero lácteo modificado con azúcares para la protección de ingredientes. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 1, 267.
- Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas L. spp. stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J Agric Food Chem* 54: 4364-4370.
- Aranberri I, Binks BP, Clint JH, Fletcher PD. 2006. Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 7(3): 211-231.
- ASERCA-SAGARPA. 2009. La industria de la Naranja. Revista mensual producida y editada por la Dirección Regional Peninsular de Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). Consultada el 27/08/17 en la página: [www.aserca.gob.mx/artman/uploads/boletinmayo2009.pdf](http://www.aserca.gob.mx/artman/uploads/boletinmayo2009.pdf)
- Astray G, Mejuto JC, Morales J, Rial-Otelo R, Simal-Gándara J. 2010. Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. *Food Research International* 43:1212–1218.
- Ayala-Zavala F, Soto HV, González LA, Álvarez PE, Martín BO, González AG. 2008. Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in  $\beta$ -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl chem* 60: 359-368

- Barrow C, Wang B, Adhikari B, Liu H. 2013. Spray drying and encapsulation of omega-3 oils. Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids. Woodhead Publishing, Oxford, U.K. Pp: 194-225.
- Bauer K, Garbe D, Surbugurg H. 1985. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, properties and uses. Cuarta edición, Wiley-VCH, Weinheim.
- Beneti S, Rosset E, Corazza M, Frizzo C, Di Luccio M, Oliveira V. 2011. Fractionations of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. Journal of Food Engineering 102: 348-354.
- Botsoglou N, Taitzoglou I, Botsoglou E, Zervos I, Kokoli A, Christaki E, Nikolaidis E. 2009. Effect of long-term dietary administration of oregano and rosemary on the antioxidant status of rat serum, liver, kidney and heart after carbon tetrachloride-induced oxidative stress. Journal of the Science of Food and Agriculture. 89(8): 1397-1406.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology. 28: 25-30.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food: a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223-253.
- Calabró ML, Tommasini S, Donato P, Raneri D, Stacanelli R, Ficarra P. 2004. Effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. J. Pharm Biomed Anal. 35(2):365-377.
- Cárdenas A. 2003. Emulsiones Múltiples. 2<sup>da</sup> Edición. Laboratorio FIRP. Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela. Pp: 2-17.
- Carneiro HC, Tonon RV, Grosso CR, Hubinger MD. 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different

- combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering* 115: 443–451.
- Castellanos MF. 2007. Biotransformación de Limoneno,  $\alpha$  Pineno y aceite esencial de naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger*. Tesis de Maestría en Química. Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Bucaramanga, Colombia. Universidad Industrial Santander. Pp. 36-37.
- Castillo SL, Heredia N, Contreras JF, García S. 2011. Extracts of Edible and Medicinal Plants in Inhibition of Growth, Adherence, and Cytotoxin Production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal Food Science* 76: 421-426.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Grissem W, Jones R (Eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists 1250-1318.
- Changhui S, Gunasekaran S. 2010. Rheology and oxidative stability of whey protein isolate-stabilized menhaden oil-in-water emulsions as a function of heat treatment. *Journal of Food Science*, 75(1): C1-C8.
- Chanthaphon S, Chanthachum S, Hongpattarakere T. 2008. Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus spp.* against food-related microorganisms. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 30: 15-131.
- Charoen R, Jangchud A, Jangchud K, Harnsilawat T, Naivikul O, McClements DJ. 2010. Influence of biopolymer emulsifier type on formation and stability of rice bran oil-in-water emulsions: whey protein, gum arabic and modified starch. *Journal of Food Science*, 76 (1): 165-172.
- Chávez-Páez M, Quezada C, Ibarra BL, González-Ochoa H, Arauz-Ibarra J. 2012. Coalescence in Doble Emulsions. *Langmuir* 14: 5934-593.
- De Garcia C, Nicolini J, Machado C, Gageiro V. 2008. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas *Quimica Nova* 31 (2): 360-368.

- Desai KG, Park HJ, 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* 23 (7): 1361-1394.
- Di Vaio C, Graziani G, Gaspari A, Scaglione G, Nocerino S, Ritieni A. 2010. Essential oils content and antioxidant properties of peel ethanol extract in 18 lemon cultivars *Scientia Horticulturae* 126: 50–55.
- Dickinson E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17: 25-39.
- Djordjevic D, Cercaci L, Alamed J, McClements JD, Decker EA. 2007a. Chemical and physical stability of citral and limonene in sodium dobecyl-chitosan and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 55: 3585-3591.
- Djordjevic D, Cercaci L, Alamed J, McClements DJ, Decker EA. 2008b. Chemical and physical stability of protein and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions containing limonene. *Journal of Food Science* 73: C167- C172.
- Dos Passos MP, Dos Santos PB, Doria GA, de Sousa BM, Serafini MR, Nunes PS, et al. 2016. Molecular modeling and physicochemical properties of supramolecular complexes of limonene with  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cyclodextrins. *AAPS PharmSciTech* 18(1):49-57.
- Duarte A, Martinho A, Angelo L, Figueiras A, Oleastro M, Domingues FC, Filomena S. 2015. Resveratrol encapsulation with methyl- $\beta$ -cyclodextrin for antibacterial and antioxidant delivery applications. *LWT Food Science and Technology* 63: 1254-1260.
- Espina L, Somolinos M, Lorán S, Conchello P, García D, Pagán R. 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes *Food Control* 22: 896-902.

- Fang Z, Comino PR, Bhandari B. 2013. Effect of encapsulation of D-limonene on the moisture adsorption property of  $\beta$ -cyclodextrin. *LWT - Food Science and Technology*. 51:164-169.
- FAO. 2011. Estadísticas de cosechas procesadas de Naranja. [Online]. Consultado el 23/02/17. Disponible en:  
<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#ancor>
- Fernández-Pachón MS, Villaño D, Troncoso A, García-Parrilla MC. 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56: 110-122.
- Ferreira FD, Barros I, Catarí EL, Salles MT, Olea-Azar C, Perez-Cruz F, Caxico F, Fonseca MO. 2013. Antioxidant activity of the mangiferin inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrins. *LWT-Food Science and Technology* 51: 129-134.
- Filardo KS, Sánchez AV. 2010. La encapsulación o microencapsulación. Una revisión bibliográfica. *Industria Alimentaria*. Alfa Editores Técnicos, Pp: 44-52.
- Fisher K, Phillips C. 2008b. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*. 19: 156-164.
- Fisher K, Phillips CA. 2006a. The effect of lemon, orange, and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 12321240.
- Frassinetti S, Caltavuturo L, Cini, Della Croce CM. 2011. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Citrus spp.* *Journal of Essential Oil Research* 23: 27-31.
- Galvão JG, Silva VF, Ferreira SG, França FRM, Santos DA, Freitas LS, Alves PB, Araújo AAS, Cavalcanti SCH, Nunes RS. 2015.  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes

containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. *Thermochimica Acta* 608: 14–19.

García-Becerra L, Verde-Star MJ, Chávez-Montes A, Castro-Ríos R, Oranday-Cárdenas A, Núñez-González A, Rivas-Morales C. 2010. *Industria Alimentaria*, Marzo/ Abril. Pp:10-15.

Gibara AG, Almeida MO, dos Santos RA, dos Passos PM, Russo MS, de Souza AAA, Pereira DB, Quintans LJ. 2015. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with  $\beta$ -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-Biological Interactions* 227:69–76.

Guddadarangavvanahally KJ, Basavaraj G, Bhimanagouda SP. 2008. Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT- Food Science and Technology* 41: 376–384.

Haloci E, Toska V, Shkreli R, Goci E, Vertuani S, Manfredini S. 2014. Encapsulation of *Santureja montana* essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 80: 147-153.

Hill LE, Gomes C, Taylor TM. 2013. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology* 51: 86-93.

Hogan SA, McNamee BF, O’Riordan ED, and O’ Sullivan M. 2001. Microencapsulating properties of whey protein concentrate. *Journal Food Science* 66(59): 675-680.

Hyang-Sook C, Song HS, Ukeda H, Sawamura M. 2000. Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.* 48:4156-4161.

- Hye-Sook Na, Ji-Na Kim, Jin-Man Kim, Ki-Young Lee. 2011. Encapsulation of fish oil using cyclodextrin and whey protein concentrate. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16: 1077-1082.
- Ismail M, Zhang J. 2004. Postharvest citrus diseases and their control. *Outlooks Pest Manag.* 15: 29-35
- Jacometti MA, Wrattn SD, Walter M. 2010. Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. *Australian journal of Grape and Win Research* 16(1): 154-172.
- Jafari S, Beheshti P, Assadpoor E. 2012b. Rheological behavior and stability of D-limonene emulsions made by a novel hydrocolloid (Angum gum) compared with Arabic gum. *Journal of Food Engineering* 109:1–8
- Jafari S, He Y, Bhandari B. 2007a. Encapsulation of Nanoparticle of d-limonene by spray drying: Role of emulsifiers and emulsifying techniques *Drying Technology* 25: 1079-1089.
- Jiang H, Han X, Li Z, Chen X, Hou Y, Gai L, Li D, Lu X, Fu T. 2012. Superparamagnetic core-shell structured microspheres carrying carboxyl groups as adsorbents for purification of genomic DNA. *Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects* 401: 74– 80.
- Jing L, Lei Z, Li L, Xie R, Xi W, Guan Y, Sumner LW, Zhou Z. 2014. Antifungal activity of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and food chemistry* 62: 3011-3033.
- Jyothi M, Prasanna S, Prabha P, Seetha RG, Srawan SN. 2010. Microencapsulation Techniques, Factors Influencing Encapsulation Efficiency: A Review. *The Internet Journal of Nanotechnology* 27 (3): 187-197.
- Kabara JJ. 1991. Phenols and chelators. In NJ. Russell & GW. Gould (Eds.), *Food preservatives* Pp. 200–214.

- Kamimura JA, Santos EH, Hill LE, Gomes CL. 2014. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *LWT Food Science and Technology*. 57, 701-709.
- Kealey KS, Kinsella JE. 1979. Orange juice quality with an emphasis on flavor components. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 11: 1-35.
- Kfoury M, Auezova L, Ruellan S, Greige-Gerges H. 2015. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. *Carbohydrate polymers*. 118: 156-164.
- Kfoury M, Sahraoui AL, Bourdon N, Laurelle F, Fontaine J, Auezova L, Gerges HG, Fourmentin S. 2016. Solubility photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. *Food Chemistry* 196: 518-525.
- Kim J, Marshall MR, Wei C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2839-2845.
- Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 81: 121-126.
- Kringel DH, Antunes MD, Colussi R, Dias ARG, Zavareze ER, Oliveira RP. 2016. Orange essential oil inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: a árvore que sustenta a vida-X CGIGR Section VI International Technical Symposium Food: the tree that sustains life. 24 a 27 de outubro de 2016.
- Li C, Fu X, Luo F, Huang Q. 2011. Effects of maltose on stability and rheological properties of orange oil-in-water emulsion formed by OSA modified starch. *Food Hydrocolloids*. 32: 79-86

- Liu K, Chen Q, Liu Y, Zhou X, Wang X. 2012. Isolation and Biological Activities of Decanal, Linalool, Valencene, and Octanal from Sweet Orange Oil. *Journal of Food Science*, 77: 1156-1161.
- Lopes D, Raga AC, Stuart GR, De Oliveira JV. 2003. Influence of vacuum distillation parameters on the chemical composition of a five-fold sweet orange Oil (*Citrus sinensis Osbeck*). *J. Essent. Oil Res.* 15: 408–411.
- López Hernández OD. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión *Revista Cubana de Farmacia* 44:381-389.
- Lopretti, M, Barreiro F, Fernandez I, Damboriarena A, Ottati C, Olivera A. 2007. Microencapsulacion de compuestos de actividad biológica. *Publicación anual de laboratorio*. Pp: 19-23.
- Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release. *International Journal of Food Science and Technology*, 41:1-21.
- Madsen HL, Bertelsen G. 1995. Spices as antioxidants. Review. *Trends in food science & technology*. 6(8): 271-277.
- Magro A, Carolino M, Bastos M, Mexia A. 2008. Efficacy of plants extracts against stored products fungi *Revista iberoamericana de Micología* 23(3): 176-178.
- Mahmud S, Saleem M, Siddique S, Ahmed R, Khanum R, Perveen Z. 2009. Volatile components, antioxidant and antimicrobial activity of *Citrus acida* var. sour lime peel oil *Journal of Saudi Chemical Society* 13: 195–198
- Maji TL, Baruah L, Dube S, Hussain M. 2007. Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (XLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application *Bioresearch Technology* 98: 840-844.

- Manthey A. 2006. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of the Polymethoxylated Flavone Content of Orange Oil Residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 3215-3218.
- Martínez G, Gómez M. 2007. Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 8: 300-312.
- Masotti V, Juteau F, Bessiére JM, Viano J. 2003. Seasonal and pheonological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J Agric Food Chem* 51:7115-7121.
- Matiz G, Osorio MR, Camacho F, Atencia M, Herazo J. 2012. Diseño y evaluación in vivo de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum L*) y ácido acético. *Biomedical* 32:125-133.
- McClements DJ. 2005. Food emulsion. Principles, practice and techniques. Boca Raton, Florida, Pp: 2-4.
- Menezes PP, Serafini MR, Quintans-Junior LJ, Silva GF, Oliveira JF, Carvalho FMS, Souza JCC, Matos JR, Alves PB, Matos IL, Hādārugā DI, Araújo AAS. 2014. Inclusion complex of (2)-linalool and  $\beta$ -cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim* 115:2429–2437
- Mercier I, Smilanick JL. 2005. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biol. Control.* 32, 401–407.
- Mey-Chau A, Kuroiwa T, Kobayashi I, Nakajima M. 2008. Effect of chitosan on the stability and properties of modifies lecithin stabilized oil-in-water monodisperse emulsion prepared by microchannel emulsification. *Food Hydrocolloids.* 23:600-610.
- Mirhosseini H, Tan CP, Hamid N, Yusof S. 2008. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil on flavor release from diluted orange beverage emulsion *Food Chemistry* 107, 1161–1172

- Miron T, Gazi I, Plaza del Moral. 2010. Romanian Aromatic Plants as Source of Antioxidants Journal Innovative Romanian Food Biotechnology 6: 18 -26.
- Mondragón R, Enrique J, Barba A, Jarque JC. 2013. El proceso de secado por atomización: formación de gránulos y cinética de secado de gotas Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio 52 (4): 159-168
- Nannapaneni R, Chalova VI, Crandall PG, Ricke SC, Johnson MG, O'Bryan CA. 2009. *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. Int. J. Food Microbiol., 129, 43-49.
- Nava E, Michelena G, Iliná A, Martínez JL. 2015. Microencapsulación de componentes bioactivos. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes 66: 64-70.
- Neng-guo T, Yue-jin L, Miao-ling Z. 2009. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) International Journal of Food Science and Technology 44: 1281–1285.
- Njoroge SM, Koaze H, Karanja PN, Sawamura M. 2005. Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). Flavour Fragr. J., 20: 80–85.
- O'Bryan CA, Crandall PG, Chalova VI, Ricke SC. 2008. Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella spp.* J. Food Sci. 73: 264–267.
- Petrović GM, Stojanović AS, Radulović NS. 2010. Encapsulation of cinnamon oil in  $\beta$ -cyclodextrin. Journal of Medicinal Plants Research. 4(14): 1382-1390.
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. 2005. Antioxidantes de los Alimentos Aplicaciones Prácticas. Editorial Acribbia. Zaragoza, España. Pp:23-60, 265-280.
- Prior RL, Wu XL, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 4290-4302.

- Purpura M, Lowery RP, Wilson JM, Mannan H, Münch G, Razmovski-Naumovski V. 2016. Analysis of different innovative formulations of curcumin for improved relative oral bioavailability in human subjects. *European Journal of Nutrition*. Pp: 1-10.
- Ramírez JS. 2006. Liofilización en alimentos *Revista ReCiTeLa*. Pp. 1
- Rao J, McClements DJ. 2012. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. *Food Chemistry*. 134: 749–757
- Ré MI. 1998. Microencapsulation by Spray Drying. *Drying Technology* 16(6): 1195-1236.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26: 1231-1237.
- Rosas-Taraco A, Sanchez E, García S, Heredia N, Bhatnagar D. 2011. Extracts of *Agave americana* inhibit aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. 2011. *Journal World Mycotoxin*. 4(1): 37-42.
- Ruiz B, Flotats X. 2014. Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: an overview. *Waste Manage*. 34 (11): 2063–2079.
- Ruiz RO. 2004. Caracterización reológicas de emulsiones aceite-en-agua (O/W) estabilizadas con goma de mezquite y quitosano y su efecto en la permeabilidad de películas comestibles. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana Pp:1-87.
- SAGARPA. 2010. Naranja *Citrus sinensis*. [Online]. Consultada el 28/02/16 y disponible en:[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=216&Itemid=105](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=216&Itemid=105).

- Salazar N, Alvarez C, González J, Ocampo J, Orrego C. 2016. Efecto del control de congelamiento en la liofilización de mango (*Mangifera indica* L.) encapsulado. *Agronomía colombiana* 34: S540-S544.
- Sang SL, Moo YB, Decker EA, Henson L, Popplewell LM, McClements, Choi SJ. 2011. Stabilization of orange oil-in-water emulsions: A new role for ester gum as an Ostwald ripening inhibitor. *Food Chemistry* 128:1023–1028
- Santos EH, Kaminura JA, Hill LE, Gomes CL. 2015a. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant application 60: 583-592.
- Santos MG, Bozza FT, Thomazini M, Favaro-Trindade CS. 2015b. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. *Food Chemistry* 171: 32-39.
- Schneiderman E, Stalcup AM. 2000. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J. Chromatogr. B.* 745: 83–102.
- Seid MJ, Elham S, Yinghe H, Bhesh B. 2008. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26: 816-835.
- Settanni L, Palazzolo E, Guarrasi V, Aleo A, Mammina C, Moschetti G, Germanà MA. 2012. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*. 26: 326-330
- Shakouri PE, Krasaekoopt W. 2014. Microencapsulation of *Litsea cubbeba* Essential Oil in  $\beta$ -cyclodextrin using paste and co-precipitation methods. *Nat. Sci*, 48: 893-907.
- Shao P, Zhang J, Fang Z, Sun P. 2014. Complexing of chlorogenic acid with  $\beta$ -cyclodextrins: Inclusion effects, antioxidative properties and potential application in grape juice. *Food Hydrocolloids*. 41:132-139.

- Silvestre WP, Agostini F, Muniz LAR, Pauletti GF. 2016. Fractionating of green mandarin (*Citrus deliciosa Tenore*) essential oil by vacuum fractional distillation. *Journal of Food Engineering* 178: 90-94.
- Singh P, Shukla R, Prakash B, Kumar A, Singh S, Kumar P, Dubey KN. 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene *Food and Chemical Toxicology* 48: 1734–1740.
- Songkro S, Hayook N, Jaisawang J, Maneenuan D, Chuchome T, Kaewnopparat N. 2012. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with  $\beta$ -cyclodextrin for mosquito repellent. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 72: 339-355.
- Tao F, Hill LE, Peng Y, Gomes CL. 2014. Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery application. 59: 247-255.
- Toro-Sánchez CLD, Ayala-Zavala JF, Machi L, Santacruz H, Villegas-Ochoa MA, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA. 2010. Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from  $\beta$ -cyclodextrin capsules. *J Incl Phenom Macrocyclic Chem.* 67: 431-441.
- Tranchida PQ, Bonaccorsi I, Dugo P, Mondello L, Dugo G. 2012. Analysis of Citrus essential oils: State of the art and future perspectives. A review. *Flavour Fragr. J.*, 27: 98–123.
- Tripathi P, Dubey NK. 2003. Evaluation of some plant extracts in the management of blue mould rot of mandarin oranges. *Indian Phytopathology.* 56: 481-483
- Tsung-Shi Y, Tai-Ti L, Tzu-Fang H. 2011. Effects of Lecithin and Pectin on Riboflavin-

Photosensitized Oxidation of Orange Oil in a Multilayered Oil-in-Water Emulsion.  
Journal of Agricultural and Food Chemistry 59: 9344–9350

Vargas-Arispuro L, Sanz B, Martínez-Téllez MA, Primo-Yúfera E. 1998. Actividad antioxidante de compuestos aislados del residuo no-volátil del aceite esencial de naranja. Revista Aceite y Grasas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 49: 159-164.

Velázquez CC. 2008. Encapsulación de aceite esencial de naranja en un secado de lecho por fluidizado con sólidos inertes. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional Pp. 4-7.

Velázquez MJ, Avila R, Palou E, López A. 2013. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. Food Control 31: 1-4.

Viuda MM, Ruiz NY, Fernandez LJ, Pérez AJ. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grape fruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food Control 19: 1130-1138.

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-López J, Pérez-Álvarez J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grape fruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food Control 19: 1130-1138.

Wang J, Cao Y, Sun B, Wang C. 2011. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. Food Chemistry, 127: 1680-1685.

Yáñez J, Salazar JA, Chaires L, Jiménez J, Márquez M, Ramos EG. 2005. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. Mundo Alimentario. Pp. 24-30.

Yáñez RX, Lugo Mancilla L, Parada DY. 2007. Estudio del aceite esencial de la cascara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca

(Norte de Santander, Colombia). Bistua: Revista a la Facultad de Ciencias Basicas, Pp: 3-8.

Zhang W, Li X, Yu T, Yuan L., Rao G, Li D, Changdao M. 2015. Preparation, physicochemical characterization and release behavior of the inclusion complex of trans-anethole and  $\beta$ -cyclodextrin. Food Research International 74: 55-62.

Zhu G, Xiao Z, Zhou R, Zhu Y. 2014. Study of production and pyrolysis characteristics of sweet orange flavor- $\beta$ -ciclodextrin inclusion complex. Carbohydrate Polymers. 105: 75–80.

Zia-ur-Rehman. 2006. Citrus peel extract – A natural source of antioxidant. Food chemistry 99: 450–454.

## 12. ANEXO

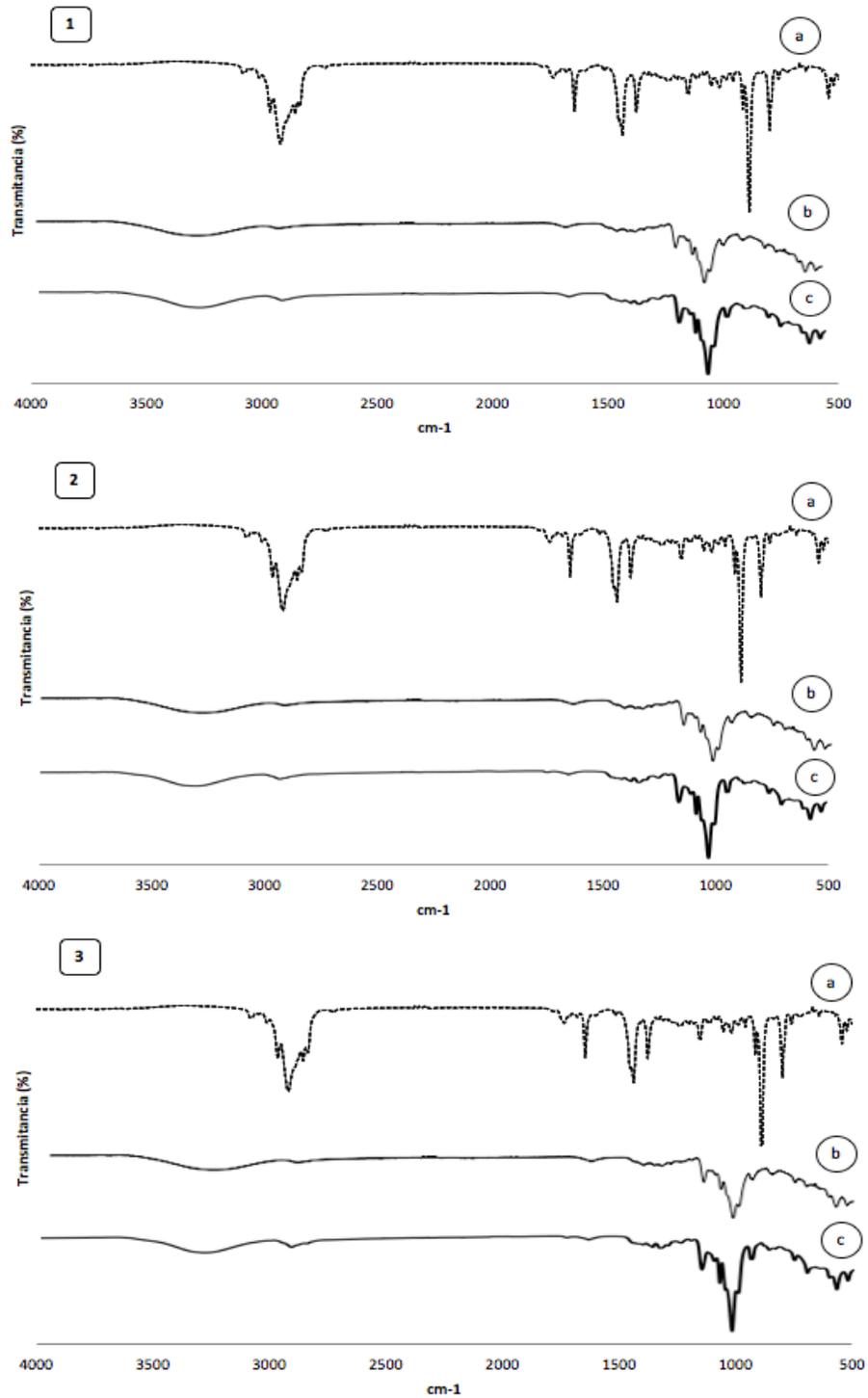


Figura 14. Espectro FTIR de (a) aceite 5x, (b)  $\beta$ -CD, (c), (1) relación 4:96; (2) relación 12:88; (3) relación 16:84.

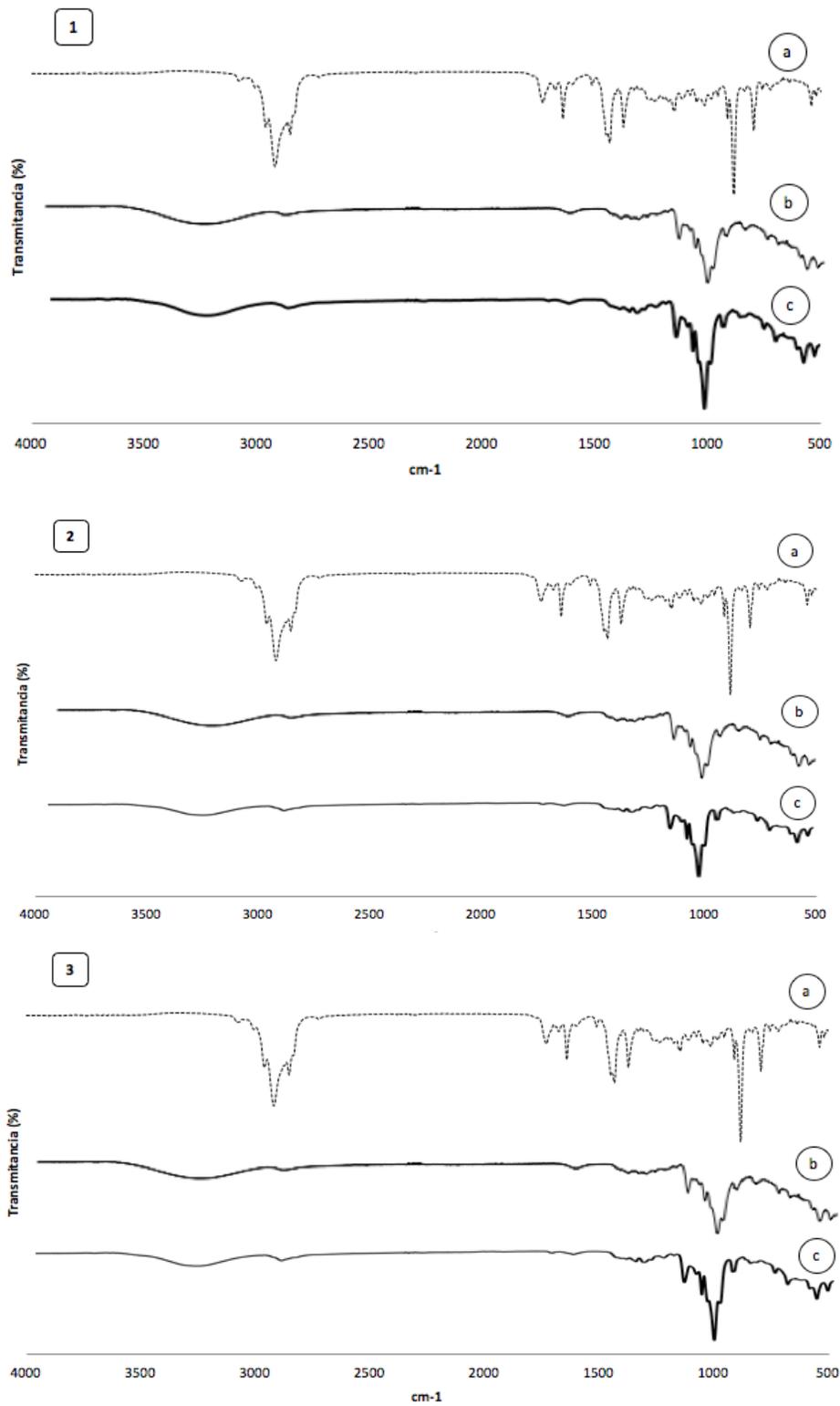


Figura 15. Espectro FTIR de (a) aceite 10x, (b)  $\beta$ -CD, (c), (1) relación 4:96; (2) relación 12:88; (3) relación 16:84.

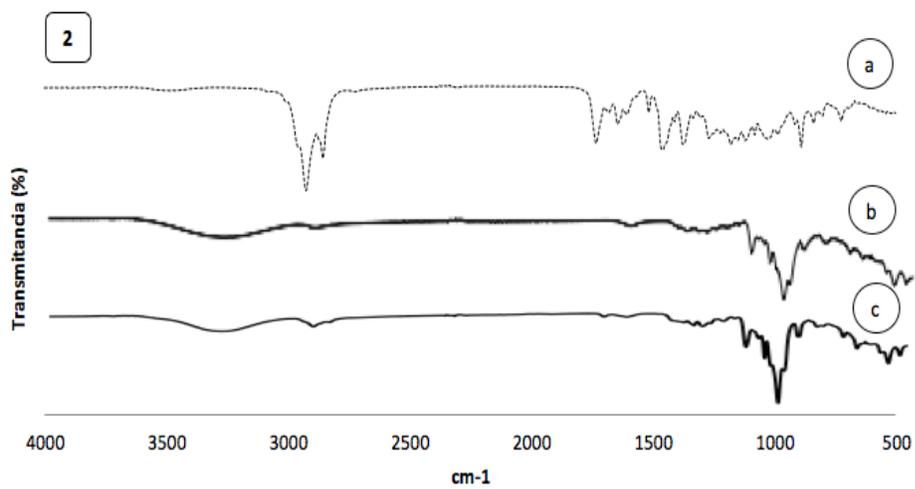
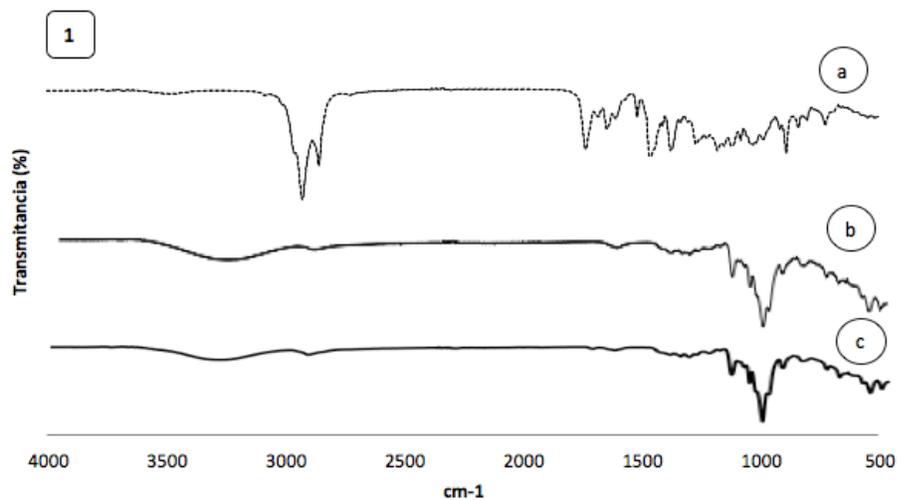


Figura 16. Espectro FTIR de (a) aceite 20x, (b)  $\beta$ -CD, (c), (1) relación 4:96; (2) relación 16:84

### 13. RESUMEN BIOGRÁFICO

Cynthia Torres Alvarez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con acentuación en Alimentos

Tesis: MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA Y SUS CONCENTRADOS MEDIANTE EMULSIONES E INCLUSIÓN MOLECULAR PARA LA ESTABILIZACIÓN Y PRESERVACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE

Campo de Estudio: Alimentos

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 10 de Agosto de 1983, hija de Lazaro Torres Cantu y Margarita Alvarez Garza

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Ciencia de Alimentos en 2005

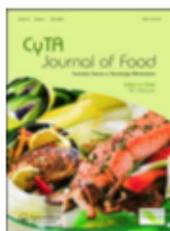
Experiencia Profesional:

#### *INDUSTRIA*

- Industria de Alimentos del 2006 al 2012
  - Alimentos preparados y congelados
  - Jugos de cítricos
  - Cárnicos
- Áreas desarrolladas en calidad, higiene, microbiología, auditorías, seguridad en alimentos.
- Último puesto: Jefatura en seguridad alimentaria
- Capacitación en sistemas de calidad con auditorías de BPM's, POES, HACCP, SQF y FSSC 22000.
- Manejo de personal

#### *DOCENCIA*

- Docente en la Facultad de Agronomía, UANL, Ene-Dic 2017
- Docente en la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL desde 2017



## Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils

C. Torres-Alvarez, A. Núñez González, J. Rodríguez, S. Castillo, C. Leos-Rivas & J. G. Báez-González

To cite this article: C. Torres-Alvarez, A. Núñez González, J. Rodríguez, S. Castillo, C. Leos-Rivas & J. G. Báez-González (2017) Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils, *CyTA - Journal of Food*, 15:1, 129-135, DOI: 10.1080/19476337.2016.1220021

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2016.1220021>



© 2016 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 07 Nov 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 236



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tcvt20>

Download by: [187.160.70.147]

Date: 28 December 2016, At: 18:13

## Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils

C. Torres-Alvarez , A. Núñez González , J. Rodríguez , S. Castillo , C. Leos-Rivas  and J. G. Báez-González 

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, San Nicolás de los Garza, México; <sup>b</sup>Centro de Calidad Ambiental, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, México

### ABSTRACT

In this study, the chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil (AN), its folded orange oils (5x, 10x, 20x) and d-limonene (LN) were investigated. The results observed in the chemical composition showed a decrease in the major component LN, in contrast to other minor components, which increased their concentration, such as decanal, linalool, and  $\alpha$ -terpineol. The antimicrobial activity was determined for foodborne pathogens using the disk diffusion method followed by the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration. Results showed that folded orange oils (5x, 10x, 20x) had better antimicrobial activity than AN and LN. The antioxidant activity was carried out by 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl methods; folded orange oil 20x presented significantly better results ( $p \leq 0.05$ ) than other oils studied. Using folded oils from AN could be a natural alternative in food processing as ingredients with antimicrobial and antioxidant effect.

### ARTICLE HISTORY

Received 19 April 2016  
Accepted 28 July 2016

### KEYWORDS

Fold oil; orange essential oil; composition; antimicrobial; antioxidant

### PALABRAS CLAVE

Aceite concentrado; aceite esencial de naranja; composición; antimicrobiano; antioxidante

### Perfil químico, actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial de naranja y sus aceites concentrados

#### RESUMEN

En este estudio, se investigó la composición química, actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial de naranja (AN), sus concentrados (5x, 10x, 20x) y d-limoneno (LN). Los resultados en la composición química mostraron una disminución del componente mayoritario d-limoneno, contrario a otros componentes minoritarios que aumentaron su concentración como es el decanal, linalol y  $\alpha$ -terpinol. La actividad antimicrobiana fue determinada para bacterias de importancia en alimentos por el método de difusión en disco seguido de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). Los resultados mostraron que los aceites concentrados (5x, 10x, 20x) presentaron significativamente mayor actividad antimicrobiana que el AN y LN. La actividad antioxidante se realizó por los métodos de ABTS y DPPH obteniendo que la fracción 20x, presentó actividad antioxidante significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) que los demás aceites estudiados. Los aceites concentrados del aceite esencial de naranja podrían ser una alternativa en la aplicación en alimentos como ingredientes con efecto antimicrobiano y antioxidante.

### Introduction

Essential oils (EOs) from aromatic and medicinal extracts obtained from a wide variety of plants have recently become popular and raised scientific interest as potential natural agents for food preservation because of their biological activity (Velázquez-Núñez, Avila-Sosa, Palou, & López-Malo, 2013). Citrus EOs have been a part of the human diet for hundreds of years, and they belong to the group of substances generally recognized as safe (GRAS) by U.S. Food and Drug Administration (FDA) (Nannapaneni et al., 2009). It has been suggested that the use of such compounds as additives in foods may act as preservatives, preventing the growth of pathogens and spoiling microorganisms of the product concerned (Fisher & Phillips, 2006; Velázquez-Núñez et al., 2013).

In recent years, consumers have become aware of the health problems (oxidative-stress-related disease) caused by synthetic chemical ingredients used in processed foods.

Therefore, a natural alternative to the chemical preservation of foods is the use of essential oils. Industrially, citrus EOs have been widely applied in a variety of products, including foods, beverages, cosmetics, and medicines because of their flavor, fragrance, and certain properties (Liu, Chen, Liu, Zhou, & Wang, 2012; Settanni et al., 2012). Citrus EOs are complex mixtures containing volatile (85–99%) and nonvolatile (1–15%) compounds mainly from monoterpenes, sesquiterpene hydrocarbons, and their oxygenated derivatives, including aldehydes, ketones, acids, alcohols, and esters.  $\alpha$ -Limonene (LN), (1-methyl-4-(1-methylethenyl) cyclohexane) is one of the main component of citrus EOs (25–98%), and its content varies significantly between species and/or varieties of the same (Fisher & Phillips, 2008; Jing et al., 2014). The nonvolatile residue may contain hydrocarbons, sterols, fatty acids, waxes, carotenoids, coumarins, psoralens, and flavonoids; this latter group of compounds is useful for differentiating

CONTACT J. G. Báez-González  [juan.baezgn@uanl.edu.mx](mailto:juan.baezgn@uanl.edu.mx)  Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Av. Universidad s/n, Cd. Universitaria CP, 66450 San Nicolás de los Garza, Nuevo Leon, México

© 2016 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

between species (Jing et al., 2014; Tranchida, Bonaccorsi, Dugo, Mondello, & Dugo, 2012).

The chemical composition of the citrus EOs is influenced by several factors, such as the genetic differences between varieties and species, which are the main determinants of the composition and content of essential oils. Environmental factors, such as soil type, cropping practices, stages of maturity, and types of weather can contribute to quantitative variations in the content of essential oils; in addition, they could affect the biological activity of the oils (Jing et al., 2014). Citrus EOs contain a high amount of terpene hydrocarbons; however, these compounds do not contribute much to the flavor and fragrance of the oil. In addition, they are unstable when exposed to heat or light and the solubility of the whole oil in alcohol decreases. Because of this, in order to stabilize the final product, these kinds of compounds should be removed. Furthermore, the oxygenated fraction provides much of the intense characteristic flavor of citrus EOs and consists mainly of alcohols, aldehydes, ketones, and esters (Lopes, Raga, Stuart, & Oliveira, 2003).

Industrially, orange essential oil (AN) is produced from orange peel through the cold-pressed method. Different procedures can be applied for the reduction of undesirable compounds, such as terpene hydrocarbons (including LN), which conventionally may be reduced by vacuum distillation (O'Bryan, Crandall, Chalova, & Ricke, 2008), solvent extraction, and adsorption chromatography. During vacuum distillation, it is difficult to indicate general limits for obtaining defined physicochemical properties of the concentrated fractions because these depend on the degree of concentration, operating conditions, applied technology, relative proportions of the oxygenated components of origin, and economic factors (Lopes et al., 2003). Commercially, the main folding degrees available are 2–5-fold for lime and mandarin oils, 2–10-fold for lemon and grapefruit oils, and 2–20-fold for orange oil. Folded oils are less prone to oxidation, they have a high solubility in water, and they have high organoleptic qualities (López-Muñoz & Balderas-López, 2014).

Moreover, the application of antioxidants plays an important role in inhibiting oxidative reactions in various products; in addition, these could prevent diseases related to the oxidative stress in the human body (Liu et al., 2012). Application of synthetic antioxidants, such as butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), has resulted in the appearance of significant side effects, which explains the growing interest in search for natural antioxidants (Olmedo, Nepote, & Grosso, 2014).

Another important issue among the food, cosmetics, and pharmaceutical industries is microbial contamination. The continuous use of synthetic preservatives can cause the development of resistance in some microorganisms, as well as residual toxicity. To solve these problems, natural and safe antimicrobial additives have been suggested. Recently, natural products, such as essential oils or compounds obtained from plants have gained scientific interest and acceptance by these industries, since they have shown little or no harm to human health (Char, Cisternas, Pérez, & Guerrero, 2016; Liu et al., 2012). Biological activities of citrus EOs as antifungal, antioxidant, and antimicrobial among others, have been studied (Espina et al., 2011; Jing et al., 2014; Liu et al., 2012; Singh et al., 2010). However, there are few reports on the antioxidant and antimicrobial activity of the individual components and/or folded oil obtained from the AN.

The aim of this research was to compare and evaluate the chemical composition of AN, its folded oils (5x, 10x, 20x) and LN (as main component) as well as evaluating their antimicrobial and antioxidant activity.

## Materials and methods

### AN and folded oil

AN was provided by Frutech International (NL, Mexico), industrially obtained through cold-pressed method; subsequently, the folded oils were prepared in a vacuum-distilled column with structured packing equivalent to 20 theoretical plates. The equipment was operated in a batch mode. The conditions of the parameters used during vacuum distillation were adjusted based on the initial composition of AN in order to obtain a final product with a desired composition according to the specification of each folded oil with the following parameters: pressure range 5–20 mbar and the reflux at temperatures between 80°C and 100°C. Table 1 shows some physicochemical characteristics of the AN and folded orange oils (5x, 10x, 20x). LN 97% and Trolox were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The reagents used were analytical grade.

### Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis

The analysis for AN and its folded oils (5x, 10x, 20x) was performed according to Liu et al. (2012), with some modifications. These oils were analyzed by GC–MS (7890B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). GC was conducted on HP-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) capillary column. The GC conditions were as follows: injection temperature 250°C; the oven temperature was controlled at 70°C for 1 min with the heating rate from 10°C/min to 200°C for 2 min, and finally from 10°C/min to 300°C for 5 min. Helium gas was used as carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min, sample size at 1 µL. Parameters for MS analysis 5977A were with EI ion source, electron energy 70 eV, the temperature of quadrupoles 150°C, temperature of interface 230°C,  $m/z = 30–400$  amu. Identification of compounds was carried out by comparing their mass spectra with those of Wiley 7 nL library, considering a quality match >85%. In addition, essential oils' analyses were performed in one more capillary column (DB-1 MS, 60 m × 0.25 mm × 0.25 µm) for a more accurate identification. Results were confirmed with the injection of some standards of essential oils components (LN, linalool,  $\alpha$ -terpineol, decanal, and valencene) (Sigma-Aldrich) (data not shown).

Table 1. Chemical properties of the oils tested.

Tabla 1. Propiedades químicas de los aceites probados.

Code	Commercial name	Specific gravity (20°C)	Refractive index (20°C)	Solubility in water
AN	Orange essential oil	0.846	1.477	Negligible
LN	$\alpha$ -Limonene	0.840	1.472	Negligible
5x	Fifefold concentrated orange oil	0.884	1.482	Negligible
10x	Tenfold concentrated orange oil	0.920	1.494	Negligible
20x	Twentyfold concentrated orange oil	0.945	1.497	Negligible

#### Bacterial strains and growth conditions

The following strains used in the study were acquired from American Type Culture Collection (ATCC), *Salmonella typhi* (ATCC 19430), *Bacillus cereus* (ATCC13061), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), and *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), and kindly provided by the Laboratory of Sanitary Microbiology, FCB, UANL. The strains were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in brain heart infusion with 20% (v/v) glycerol (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA). Fresh cultures were obtained in Mueller Hinton broth or agar (MHB and MHA, Difco Laboratories). *L. monocytogenes* was cultivated on trypticase soy broth (TSB). An aliquot (50  $\mu\text{L}$ ) was taken from a frozen culture and was added to a tube containing 5 mL of MHB or TSB depending of each strain and were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 18 h ( $30^{\circ}\text{C}$  for *L. monocytogenes*); thereafter an aliquot (10  $\mu\text{L}$ ) of each culture was added to the tubes with MHB or TSB.

#### Antimicrobial activity assay (disk diffusion assay)

Preliminary antimicrobial activity of AN, LN, and folded orange oils (5x, 10x, 20x) was tested against four foodborne pathogens, using disk diffusion technique (Klančnik, Piskernik, Jeršek, & Možina, 2010). An aliquot (100  $\mu\text{L}$ ) of bacterial suspension (adjusted to 0.5 McFarland =  $10^6$ ) was distributed homogeneously on MHA plates. Five disks of 6 mm in diameter were separately impregnated with 10  $\mu\text{L}$  of each oil and placed on the agar surface. The plates were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Antimicrobial activity was defined as absence of bacterial growth in the area surrounding the disk. The diameter of the inhibition zones was measured with a caliper. A test for *L. monocytogenes* was conducted the same way, but TSA was used instead of MHA, and it was incubated at  $30^{\circ}\text{C}$ . Duplicate analyses were performed at least three times. Disks impregnated with sterile distilled water and/or DMSO served as negative controls and disks with an antibiotic (gentamicin) as positive controls.

#### Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

After determining preliminary antimicrobial activity, the MIC and MBC were obtained for the four pathogens. The dilution method according to Castillo, Heredia, Contreras, and García (2011), with minor modifications was carried out. Briefly, an aliquot (50  $\mu\text{L}$ ) of fresh cultures adjusted to McFarland standard ( $0.5 = 1 \times 10^7$ ) of each strain were added separately in tubes containing 5 mL of MHB with various concentrations of AN, LN, 5x, 10x, 20x (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5 mg/mL final concentration in each tube for every oil). Cultures were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. After that, bacterial survival was determined by plate counting. MIC was defined as the lowest concentration of oil that decreased growth about 90% of the bacterial population after 24 h of incubation, while the MBC was defined as the lowest concentration that completely inhibited growth on the MHA plate after 24 h of incubation (Klančnik et al., 2010). *L. monocytogenes* was tested the same way under the conditions referred above. Triplicate analyses of MIC and MBC were conducted at least three times.

#### Antioxidant activity assay

The antioxidant activity of the oils was measured using the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS) radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. Trolox (Sigma-Aldrich) a water-soluble analogue of vitamin E, showing a potent antioxidant activity, was used as a standard reference (positive control). ABTS radical scavenging assay was determined following the method of Re et al. (1999), with some modifications, the blue-green ABTS radical cation chromophore (ABTS $^{\cdot+}$ ) was prepared by reacting ABTS stock solution (7 mmol) with potassium persulphate (2.45 mmol) and allowing the mixture to stand at room temperature in the dark during 16 h. The solution was diluted with ethanol to obtain an absorbance of  $0.700 \pm 0.02$  at 734 nm in a Genesys 5 (spectronic) spectrophotometer. The DPPH radical scavenging assay was conducted according to Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995), with some modifications. DPPH solution was prepared with 3.9 mg of radical and 100 mL of ethanol, the solution was measured to 517 nm in a spectrophotometer to obtain an absorbance of  $1.000 \pm 0.05$ . Aliquots of 10–300  $\mu\text{L}$  of solution of each oil with ethanol were mixed with 2.7 mL of ABTS $^{\cdot+}$  solution. The mixture was allowed to react at room temperature for 7 min in dark conditions. The absorbance was recorded by spectrophotometer at 734 nm. For DPPH assay, different concentrations (200–600  $\mu\text{L}$ ) of each oil were added separately to 2.25-mL DPPH solution. The mixture was shaken and left at room temperature for 240 min in the dark. Thereafter, the absorbance was measured at 517 nm in spectrophotometer.

The antioxidant activity was calculated as a percentage of inhibition according to the following equation:

$$\% \text{Inhibition} = \left\{ \frac{[A_b - A_s/A_b] \times 100}{A_b} \right\},$$

where  $A_b$  represents the absorbance of the control (without test oil), and  $A_s$  represents the absorbance of the test oil. A calibration curve was determined for Trolox standard for each radical (ABTS and DPPH) at a concentration range of 10–160  $\mu\text{mol}$ . The curve equations were  $y = 0.4447x + 0.3721$ ,  $R^2 = 0.99$  for ABTS and  $y = 0.7371x + 0.7321$ ,  $R^2 = 0.99$  for DPPH. Triplicate analyses of each oil were made. The antioxidant activity values were expressed as  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalent (TE)/mL citrus oil (CO). In addition, the antioxidant activity expressed as half-maximal inhibitory concentration  $\text{IC}_{50}$  (mg/mL) was defined as the amount of antioxidant necessary to decrease the initial ABTS and DPPH concentration by 50% (Liu et al., 2012).

#### Statistical analysis

All experiments were performed in duplicate or triplicate at least three times. Statistical analyses were performed using SPSS software (IBM version 22, SPSS Inc, Chicago, IL). Data were analyzed by analyses of variance test (one-way ANOVA) and a post hoc test of Tukey's multiple range. Differences between means were considered significant at  $p$  values  $\leq 0.05$ .

## Results and discussion

#### Chemical composition of the citrus EOs

The analysis of the main components of AN, 5x, 10x, 20x showed differences in the composition and percentage of

Table 2. Chemical composition of AN, 5x, 10x, 20x.

Tabla 2. Composición química de AN, 5x, 10x, 20x.

No.	Compound	Percentage (%) <sup>a</sup>			
		AN	5x	10x	20x
1	$\alpha$ -Pinene	1.11			
2	Sabinene	0.41			
3	Myrcene	4.11	0.43	1.11	
4	$\alpha$ -Phellandrene	0.42			
5	Octanal	0.15			
6	<i>o</i> -Limonene	91.12	72.08	73.77	23.24
7	$\beta$ -Cadinene	0.11			
8	Terpinolene	0.10			
9	Octanol	0.10			
10	Linalool	0.65	3.33	3.99	5.53
11	trans-p-Mentha-2,8-dienol		0.80	0.46	0.98
12	cis-p-Mentha-2,8-dienol				1.00
13	cis-Limonene oxide		1.94		
14	trans-Limonene oxide		1.01		
15	Citronellal	0.09	0.52	0.69	1.04
16	$\alpha$ -Terpineol	0.60	1.37	2.16	4.60
17	Decanal	0.44	3.60	4.78	18.46
18	trans-Carveol		1.07		1.59
19	Citronellol				0.61
20	cis-Carveol				0.76
21	Neral		0.67	0.79	1.70
22	Carvone		1.25	0.68	2.01
23	Geraniol		1.12	1.33	3.48
24	Perilla aldehyde		0.52	0.57	1.31
25	Geraniol acetate				0.45
26	Dodecanal		0.84	1.09	2.80
27	$\alpha$ -Cubebene		0.71	0.98	2.32
28	$\beta$ -Cubebene	0.05		0.82	2.22
29	Caryophyllene			0.64	1.35
30	Germacrene D	0.05	0.71	0.94	0.91
31	Valencene		4.89	2.14	6.35
32	$\gamma$ -Muurolene		0.65		1.46
33	$\delta$ -Cadinene	0.06	0.98	1.31	3.21
34	Elemol				0.96
35	Caryophyllene oxide				0.77
36	Nootkatone				0.94
	Hydrocarbon monoterpenes	97.37	72.51	74.88	23.24
	Oxygenated monoterpenes	1.78	17.20	15.45	43.07
	Hydrocarbon sesquiterpenes	0.17	7.94	6.83	17.82
	Oxygenated sesquiterpenes	ND	ND	ND	2.67
	Others	0.25	0.84	1.69	3.25
	Total identified components	99.57	98.49	98.25	90.05

<sup>a</sup>Given in the relative peak area percent, mean of triplicate determination. ND: not detected.

<sup>b</sup>Dada en el porcentaje de área relativa del pico, con una media de determinación por triplicado. ND = No detectado.

the compounds observed (Table 2). These results agree with results of previous studies (Espina et al., 2011; Ruiz & Flotats, 2014; Singh et al., 2010) in which differences in the chromatographic profile of AN were found depending on the type of extraction, retaining its major components, such as the LN. This finding is consistent with our results, which showed LN as majority compound. Lopes et al. (2003) performed a study with different parameters during vacuum distillation and they found quantitative variations in the chromatographic profiles. Our results showed the same tendency indicating that these variations might be influenced by the type of extraction used. It is well known that vacuum distillation process produces folded oils from orange EO, through a selective decrease of LN (main constituent) and other terpene hydrocarbons; therefore, the concentration of oxygenated compounds, primarily aldehydes and alcohols are increased (Lopes et al., 2003; O'Bryan et al., 2008). Terpene hydrocarbons (including LN) must be removed in order to obtain a stable final product because they do not contribute much to the flavor and fragrance of the oil; also, they are unstable when exposed to heat or light and their oil

solubility is decreased as well (Beneti et al., 2011; Liu et al., 2012; Lopes et al., 2003). This study analyzed the chemical composition of AN and its folded oils 5x, 10x, and 20x to estimate the differences between the constituents, since the folded orange oils, provide greater flavor intensity by increasing the concentration of oxygenated compounds. In addition, they are less susceptible to oxidation and off-flavor development, showing better stability with greater industrial interest (Beneti et al., 2011; Lopes et al., 2003). Considering the information mentioned above, it is preponderant to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of the folded orange oil. Analysis by GC-MS gave the chemical composition and relative abundance of the major components that comprise AN, 5x, 10x, 20x. The components are grouped into several classes: hydrocarbon monoterpenes, oxygenated monoterpenes, hydrocarbon sesquiterpenes, oxygenated sesquiterpenes, and others (Table 2). These results showed that there are qualitative similarities between components present in oils although some of them showed quantitative differences when tested. For AN, 5x, 10x, and 20x, were identified 16, 20, 18, and 26 compounds, respectively, representing the 99.57%, 98.49%, 98.25%, and 90.05% of the total detected constituents, respectively. There was a decrease in the mixture of hydrocarbon monoterpenes (including LN) in all fractions compared with AN (97.37%), keeping the 20x fraction the minor amount (23.24%) followed by 5x and 10x with 72.51% and 74.88%, respectively. For oxygenated monoterpenes, an increase in the concentration of folded orange oils with respect to AN was observed, being these 1.78% (AN), 17.20% (5x), 15.45% (10x), and 43.07% (20x), coinciding with Lopes et al. (2003) who reported an inversely proportional diminution on hydrocarbon compounds, such as LN, myrcene, among others, respect to the folded oils, while for oxygenated compounds as decanal and linalool, an inversely proportional increase with respect to the folded oils was reported. It is important to note the variation about the quantity of oxygenated monoterpenes between the oils because some compounds from this group are recognized with biological and antimicrobial activity (Espina et al., 2011). According to some reports (Espina et al., 2011; Njoroge, Koaze, Karanja, & Sawamura, 2005; Singh et al., 2010), LN is found at around 90%, recognized as the major component of AN, coinciding with our results, in which AN presented 91.12% of LN; however in the folded oils, a decrease of this compound was observed, resulting in 72.08% and 73.77% of LN in 5x and 10x, respectively, while in the 20x, a lower amount was observed (23.24%). Nevertheless, LN was still the leading component in all oils analyzed. Other compounds detected over 1%, as decanal, an aldehyde that provides fragrance (Liu et al., 2012) increased significantly in 5x, 10x and 20x with 3.60%, 4.78%, and 18.46%, respectively, while in AN it was detected only 0.44%. In addition, compounds such as linalool, recognized for its importance in fragrance and biological activity (Fisher & Phillips, 2006) presented an increment in 5x (3.33%), 10x (3.99%), and 20x (5.53%), with respect to AN (0.65%). The same tendency was observed for hydrocarbon sesquiterpenes, in which an increase was detected for 5x (7.94%), 10x (6.83%), and 20x (17.82%) compared to AN (0.17%), being the 20x the major concentration of these compounds. Finally, oxygenated sesquiterpenes were detected only in 20x (2.67%), while in AN, 5x and 10x were not.

### Antimicrobial activity by the disk diffusion assay and determination of MIC and MBC

Antimicrobial activity was performed for AN, LN, 5x, 10x, and 20x by disk diffusion method against four foodborne pathogens. The antimicrobial activity of the oils studied is summarized in Table 3. The oils tested showed inhibition zone in ranges of 12–28 mm. *B. cereus* and *S. aureus* showed greater inhibition at 10x and 20x, *L. monocytogenes* showed inhibition with 5x and 20x, while for *S. typhi*, the greatest inhibition was in 5x and 10x, and it was comparable with positive control (gentamicin). When comparing the antimicrobial activity of AN and LN, with 5x, 10x, and 20x there were significant differences ( $p \leq 0.05$ ) in inhibition; the major inhibition zones were for the folded orange oils in most cases. These results are similar to those previously reported by Espina et al. (2011), who found that lemon and orange EOs showed lower inhibition against foodborne pathogen than other essential oils, which could be attributed to the portion of oxygenated monoterpenes.

The MIC and MBC were determined for the four foodborne pathogens for the oils tested, the values were compared finding differences between AN and LN with 5x, 10x, and 20x (Table 4). The MIC varied among folded orange oils ranged from <0.25 to 1 mg/mL while the MBC from 0.25 to 2.5 mg/mL. Major values of MIC and MBC for AN and LN were evidenced. The MIC for these two oils ranged from 1.5 to 2.5 mg/mL and MBC from 2 to >2.5 mg/mL, depending on the strain tested. MIC and MBC values were lowest in the entire folded orange oils fractions being the 20x with the higher antimicrobial potential. However, the values varied very little between the folded orange oils for the same

microorganism, but on comparing the MIC and MBC values with AN and LN, significant differences were observed. LN showed the lowest antimicrobial activity with MIC values of 0.5–2 mg/mL and MBC values >2.5 mg/mL. Even AN presented lower values of MIC and MBC than LN, no significant differences were evidenced in most cases. These results agree with Frassinetti, Caltavuturo, Cini, DellaCroce, and Maserti (2011) and Nannapaneni et al. (2009), who reported a low or null antimicrobial activity of LN compared with citrus essential oils against foodborne pathogens.

When MIC/MBC were determined, slight differences in susceptibility with respect to the results obtained in disk diffusion assay were noted; the most sensitive bacteria was *L. monocytogenes* with MIC/MBC (<0.25/0.5 mg/mL), followed by *B. cereus* (0.5/1.5 mg/mL), *S. aureus* (0.5/2 mg/mL) while the more resistant one was *S. typhi* (1.0/2.5 mg/mL). This could be attributed to the disk diffusion method, which is limited due to changes in the diffusivity of the active compounds in agar; for this reason, the size of the inhibition zone did not necessarily predict the MIC/MBC determined in liquid medium (Nannapaneni et al., 2009; O'Bryan et al., 2008). On the other hand, MIC/MBC values varied between bacteria, confirming the observations of Kim, Marshall, and Wei (1995); Rivera, Bocanegra-García, and Monge (2010) who reported that essential oils could vary in their antimicrobial potential among different microorganisms. This will depend on several factors including the structure of bacterial cell wall and variability of compounds present in the oil, which sometimes could exert a synergism between them (O'Bryan et al., 2008). In previous reports, it has been demonstrated that compounds present in low concentrations have a crucial role in antimicrobial activity due to a synergic effect that potentiates biological activity. In this study, the folded orange oil 20x presented the best antimicrobial activity followed by 10x and 5x; all of them had major activity than AN and LN. This could be attributed to the increment of oxygenated monoterpenes considering that this portion was lower for AN (1.78%) than the fractions 5x (17.21%), 10x (15.45%), and 20x (43.07%). In addition, other minority compounds, which have been reported to possess antimicrobial activity (linalool, decanal, geranial, among others), could be implicated in synergism or biological activity (Jing et al., 2014; Nannapaneni et al., 2009; Singh et al., 2010). These findings were consistent with those found in this study, in which these components are present, and are actually increased in the concentrated oils.

There are some studies about fractions from cold-pressed orange oil, terpeneless orange oil, terpenes from orange juice essence, or fivefold orange oil (Nannapaneni et al., 2009; O'Bryan et al., 2008), and also of isolated compounds

Table 3. Zones of inhibition of AN, LN, 5x, 10x, 20x against foodborne pathogens by a disk diffusion assay.

Tabla 3. Zonas de inhibición del AN, LN, 5x, 10x, 20x contra patógenos transmitidos por alimentos mediante ensayo de difusión en disco.

Oil	Zone of inhibition (mm)			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhi</i>
AN	13 ± 1 <sup>a</sup>	13 ± 1 <sup>d</sup>	12 ± 0.7 <sup>d</sup>	16 ± 0.7 <sup>e</sup>
LN	15.4 ± 1.1 <sup>d</sup>	17 ± 1 <sup>e</sup>	14 ± 0.7 <sup>d</sup>	17 ± 0.7 <sup>e</sup>
5x	23.4 ± 2.0 <sup>f</sup>	17.4 ± 0.5 <sup>e</sup>	24.4 ± 1.3 <sup>cd</sup>	28 ± 1.4 <sup>f</sup>
10x	28 ± 1.2 <sup>g</sup>	20.4 ± 2.4 <sup>d</sup>	22.6 ± 1.8 <sup>c</sup>	27.2 ± 1.6 <sup>f</sup>
20x	27.8 ± 1.3 <sup>g</sup>	18.6 ± 0.8 <sup>cd</sup>	26.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	24.8 ± 1.1 <sup>b</sup>
Gentamicin	45.2 ± 0.8 <sup>h</sup>	37 ± 1.4 <sup>f</sup>	35.2 ± 0.8 <sup>f</sup>	28 ± 0.7 <sup>f</sup>

Zone of inhibition are average values of three replicates ± the standard deviation of the mean. <sup>a-h</sup>Mean values with different letter in the same column are significantly different ( $p \leq 0.05$ ).

Zona de inhibición son valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar de la media. <sup>a-h</sup>Los promedios en una columna con diferente letra difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

Table 4. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) (mg/mL) of AN, LN, 5x, 10x, 20x.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) (mg/mL) de AN, LN, 5x, 10x, 20x.

Oil	Microorganisms							
	<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. typhi</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
AN	1.5 ± 0.3 <sup>ab</sup>	>2 <sup>a</sup>	1 ± 0.3 <sup>b</sup>	>2 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	2 ± 0.3 <sup>b</sup>	2 ± 0.5 <sup>a</sup>	>2.5 <sup>a</sup>
LN	>2 <sup>a</sup>	>2 <sup>a</sup>	2 ± 0.2 <sup>a</sup>	>2 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	>2 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	>2.5 <sup>a</sup>
5x	1 ± 0.3 <sup>bc</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	1 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.3 <sup>ab</sup>
10x	1 ± 0.3 <sup>bc</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	2 ± 0.3 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	1 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.3 <sup>ab</sup>
20x	0.5 ± 0.3 <sup>c</sup>	1 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	< 0.25 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.1 <sup>c</sup>	1 ± 0.6 <sup>b</sup>	2 ± 0.3 <sup>b</sup>

MIC and MBC are average values of three replicates ± the standard deviation of the mean. <sup>a-c</sup>Mean values with different letter in the same column are significantly different ( $p \leq 0.05$ ).

CMI y CMB son valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar de la media. <sup>a-c</sup>Los promedios en una columna con diferente letra difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

Table 5. Antioxidant activity of AN, LN, 5x, 10x, 20x.

Tabla 5. Actividad antioxidante de AN, LN, 5x, 10x, 20x.

Method	$\mu\text{mol TE/mL CO}$				
	AN	LN	5x	10x	20x
ABTS	23.25 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	ND	86.02 $\pm$ 1.12 <sup>c</sup>	141.53 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	156.25 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>
DPPH	3.01 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	ND	7.69 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>	16.96 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	21.24 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>

Mean values of three replicates  $\pm$  the standard deviation of the mean. <sup>a-c</sup>Mean values with different letter in the same row are significantly different ( $p \leq 0.05$ ). ND = Not detected.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar de la media. <sup>a-c</sup>Los promedios en la misma fila con diferente letra difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ). ND: No detectado.

from orange EO (Liu et al., 2012), a different variety of orange (Settanni et al., 2012; Singh et al., 2010) and a different variety of citrus EOs (Espina et al., 2011; Frassinetti et al., 2011; Settanni et al., 2012). However, there are no studies about folded oils (5x, 10x and 20x) from AN obtained by vacuum distillation, as studied in this work.

### Antioxidant activity

The antioxidant activity values obtained for AN, LN, and folded orange oils were evaluated by the methods of ABTS and DPPH (Table 5). These were expressed as  $\mu\text{mol Trolox equivalent (TE)/mL citrus oil (CO)}$ . The values obtained by ABTS method were 23.25–156.25  $\mu\text{mol TE/mL CO}$  and DPPH method showed values between 3.01 and 21.24  $\mu\text{mol TE/mL CO}$ . The folded orange oil 20x showed the highest concentration equivalent Trolox with 156.25  $\mu\text{mol TE/mL CO}$  in ABTS and 21.24  $\mu\text{mol TE/mL CO}$  with DPPH, followed by 10x and 5x with values 141.53 and 86.02  $\mu\text{mol TE/mL CO}$ , respectively, for ABTS, and 16.96 and 7.69  $\mu\text{mol TE/mL CO}$ , respectively, for DPPH. In the case of AN, it showed values of 23.25 and 3.01  $\mu\text{mol TE/mL CO}$  in ABTS and DPPH, respectively. Finally, in LN, activity for any of the two methods was not detected. The  $\text{IC}_{50}$  values are shown in Table 6, where the folded orange oil 20x showed higher antioxidant activity with values of 3.80 and 10.25  $\text{mg/mL}$  to inhibit 50% of ABTS and DPPH radicals, respectively, followed by 10x and 5x with values 6.49 and 16.27  $\text{mg/mL}$ , respectively, for ABTS while 15.50 and 37.25  $\text{mg/mL}$ , respectively, for DPPH. The AN showed values of 68.40 and 70.17  $\text{mg/mL}$  for ABTS and DPPH, respectively. The LN did not present antioxidant activity for inhibiting the radicals studied. The results showed significant differences in antioxidant activity between 20x, 10x, and 5x with respect to AN and LN, highlighting the best antioxidant activity for 20x compared to the others oils studied. The folded orange oils (5x, 10x and 20x) are mainly used in the food and cosmetics pharmaceutical industries for their flavor and fragrance; however, few studies have determined their antimicrobial and antioxidant activities. According to the results obtained in this work, the folded orange

Table 6. Inhibition concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of AN, LN, 5x, 10x, 20x.Tabla 6. Concentración Inhibitoria ( $\text{IC}_{50}$ ) de AN, LN, 5x, 10x, 20x.

Method	$\text{IC}_{50}$ (mg/mL)				
	AN	LN	5x	10x	20x
ABTS	68.40 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	ND	16.27 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	6.49 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	3.80 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>
DPPH	70.17 $\pm$ 5.15 <sup>a</sup>	ND	37.25 $\pm$ 2.85 <sup>b</sup>	15.50 $\pm$ 1.20 <sup>c</sup>	10.25 $\pm$ 0.50 <sup>d</sup>

Mean values of three replicates  $\pm$  the standard deviation of the mean. <sup>a-d</sup> Mean values with different letter in the same row are significantly different ( $p \leq 0.05$ ). ND = Not detected.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar de la media. <sup>a-d</sup>Los promedios en la misma fila con diferente letra difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ). ND: No detectado.

oils showed better antioxidant activity than AN. This could be attributed to the potentiation of minority compounds and reduction of LN, which in normal conditions remain at 90%.

In some studies, it has been proposed that the antioxidant activity of citrus essential oils could be related to the presence of LN and other monoterpenes as  $\gamma$ -terpinene and terpinolene (Choi, Song, Ukeda, & Sawamura, 2000; Frassinetti et al., 2011). However, in this study the best results were obtained by the folded orange oils (5x, 10x and 20x), which according to the chromatographic profile, the amount of LN decreased while other compounds such as decanal and linalool increased. These results agree with Choi et al. (2000), who found that although LN was the majority compound in ANs, it would not play the main role in determining antioxidant activity.

Some investigations have studied the antioxidant activity of individual compounds. According to Liu et al. (2012), the antioxidant activity of AN was major compared to individual compounds, such as linalool, decanal, octanal, and valencene; this evidence could confirm, based on the results obtained in this study, that antioxidant activity is not due to a single compound as LN, but a mixture of compounds, that alter their amount when the orange EO is processed by vacuum distillation. Some of them were found in lesser proportion while others increased their concentration; this effect could potentiate biological or synergistic action among compounds that derive in higher antimicrobial and antioxidant activities. In that case, the folded orange oil could provide different biological characteristics of those found in the AN.

A major concern in this context is the toxicity of the compounds. A variety of EO components have been registered by the European Commission for being used as flavorings in food-stuffs. Therefore, presently no risk to human health, including the AN and LN (LN), which are GRAS. Meticulous studies of toxicology support the safety of the substance for its intended use (Gavarić et al., 2015). Studies in rats revealed the oral  $\text{LD}_{50}$  for AN and LN and is established at  $>5$  g/kg, also for the concentrated oils used in this study. According to the health hazard definition, the AN and its folded oils are classified as non-toxic (Tisserand & Young, 2014).

In addition, further research could address these results' focus on strategic applications of these compounds, considering their efficiency in antimicrobial and antioxidant activities (Choi et al., 2000).

### Conclusions

The folded orange oils showed the best potential as antimicrobials, as well as in their antioxidant activity. The food-borne pathogens were affected at significant low concentrations than the AN and LN when treated with the concentrated oils, attributing these differences to their chemical composition. The results of this research may provide the knowledge of the antimicrobial and antioxidant potential of folded orange oils obtained from AN, and these could be used for control of foodborne pathogens as an alternative to replace the additives used today. Finally, the study of the enormous range of biological activities of essential oils and their prospective industrial applications in order to increase the food safety is suitable; at the same time, it may provide alternatives for the development of new, safer products that are accepted by consumers who prefer natural ingredients rather than synthetic ingredients.

## Acknowledgements

We would like to thank Frutec Internacional (N.L., Mexico) for providing the commercial EO samples and Juan José Ledezma for his support and the technical information provided.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) [No. 269983/275113].

## ORCID

C. Torres-Alvarez <http://orcid.org/0000-0001-6664-2063>  
 A. Núñez González <http://orcid.org/0000-0002-7415-0736>  
 J. Rodríguez <http://orcid.org/0000-0001-8924-2644>  
 S. Castillo <http://orcid.org/0000-0001-8354-3200>  
 C. Leos-Rivas <http://orcid.org/0000-0002-3626-7263>  
 J. G. Báez-González <http://orcid.org/0000-0003-0509-4678>

## References

- Beneti, S.C., Rosset, E., Corazza, M.L., Frizzo, C.D., Luccio, M.D., & Oliveira, J.V. (2011). Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. *Journal of Food Engineering*, 102, 348–354. doi:10.1016/j.foodeng.2010.09.011
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Castillo, S.L., Heredia, N., Contreras, J.F., & García, S. (2011). Extracts of edible and medicinal plants in inhibition of growth, adherence, and cytotoxin production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Food Science*, 76, 421–426. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02229.x
- Char, C., Cisternas, L., Pérez, F., & Guerrero, S. (2016). Effect of emulsification on the antimicrobial activity of carvacrol. Efecto de la emulsificación sobre la actividad antimicrobiana del carvacrol. *CyTA-Journal of Food*, 14, 186–192. doi:10.1080/19476337.2015.1079558
- Choi, H.-S., Song, H.S., Ukedu, H., & Sawamura, M. (2000). Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4156–4161. doi:10.1021/jf000227d
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 896–902. doi:10.1016/j.foodcont.2010.11.021
- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156–164. doi:10.1016/j.tfs.2007.11.006
- Fisher, K., & Phillips, C.A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1232–1240. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03035.x
- Frassinetti, S., Caltavuturo, L., Cini, M., DellaCroce, C.M., & Maserti, B.E. (2011). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from *Citrus* spp. *Journal of Essential Oil Research*, 23, 27–31. doi:10.1080/10412905.2011.5700427
- Gawariż, N., Kovač, J., Kretschmer, N., Klader, N., Možina, S.S., Bucar, F., ... Božin, B. (2015). Natural products as antibacterial agents — Antibacterial potential and safety of post-distillation and waste material from *Thymus vulgaris* L., Lamiales. In V. Bobbarala (Ed.), *Concepts, compounds and the alternatives of antibacterials* (pp. 123–151). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.5772/60869>
- Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Xi, W., Guan, Y., ... Zhou, Z. (2014). Antifungal activity of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 3011–3033. doi:10.1021/jf5006148
- Kim, J., Marshall, M.R., & Wei, C. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2839–2845. doi:10.1021/jf00059a013
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S.S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81, 121–126. doi:10.1016/j.mimet.2010.02.004
- Liu, K., Chen, Q., Liu, Y., Zhou, X., & Wang, X. (2012). Isolation and biological activities of decanal, linalool, valencene, and octanal from sweet orange oil. *Journal of Food Science*, 77, C1156–C1161. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02924.x
- Lopes, D., Rega, A.C., Stuart, G.R., & Oliveira, J.V. (2003). Influence of vacuum distillation parameters on the chemical composition of a five-fold sweet orange oil (*Citrus sinensis* Osbeck). *Journal of Essential Oil Research*, 15, 408–411. doi:10.1080/10412905.2003.9698624
- López-Muñoz, G.A., & Balderas-López, J.A. (2014). Photothermal characterization of citrus essential oils and their derivatives. *Thermochimica Acta*, 579, 40–44. doi:10.1016/j.tca.2014.01.009
- Nannapaneni, R., Chalova, V.J., Crandall, P.G., Ricke, S.C., Johnson, M.G., & O'Bryan, C.A. (2009). *Campylobacter* and *Aerobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 43–49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.008
- Njoroge, S.M., Koaze, H., Karanja, P.N., & Sawamura, M. (2005). Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 80–85. doi:10.1002/ffj.1377
- O'Bryan, C.A., Crandall, P.G., Chalova, V.J., & Ricke, S.C. (2008). Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *Journal of Food Science*, 73, M264–M267. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00790.x
- Olmedo, R., Nepote, V., & Grosso, N.R. (2014). Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. *Food Chemistry*, 156, 212–219. doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.087
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Rivera, G., Bocanegra-García, V., & Monge, A. (2010). Traditional plants as source of functional foods: A review. *Plantas tradicionales como fuente de alimentos funcionales: una revisión*. *CyTA-Journal of Food*, 8, 159–167. doi:10.1080/19476330903322978
- Ruiz, B., & Flotats, X. (2014). Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. *Waste Management*, 34, 2063–2079. doi:10.1016/j.wasman.2014.06.026
- Settanni, L., Palazzolo, E., Guarrasi, V., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G., & Germanà, M.A. (2012). Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*, 26, 326–330. doi:10.1016/j.foodcont.2012.01.050
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P.K., & Dubey, N.K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiplateletogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1734–1740. doi:10.1016/j.fct.2010.04.001
- Tisserand, R., & Young, R. (2014). *Essential oil safety: A guide for health care*. Retrieved from <https://www.amazon.com/Essential-Oil-Safety-Health-Professionals/dp/1044306242>
- Tranchida, P.Q., Bonaccorsi, I., Dugo, P., Mondello, L., & Dugo, G. (2012). Analysis of Citrus essential oils: State of the art and future perspectives. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 98–123. doi:10.1002/ffj.2089
- Velázquez-Núñez, M.J., Avila-Sosa, R., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31, 1–4. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.02

## CONGRESOS

Torres-Alvarez C, Núñez-González A, Báez-González JG, García-Díaz C, Rodríguez-Rodríguez J, Medina-Lozano I. **Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial de naranja obtenida por dos tipos de extracciones.** Ponencia *Oral*. 1<sup>er</sup>. Congreso internacional de alimentos funcionales y nutraceuticos. 11-13 Junio del 2014. Tecnológico de Monterrey con CIAD. Monterrey, N.L. México.

Torres-Alvarez C, Báez-González JG, Amaya-Guerra CA, Núñez-González A, Alanís-Guzmán MG. **Desarrollo de emulsiones con aceite esencial de naranja formuladas con diferentes biopolímeros.** Ponencia en *Poster*. XVII Congreso nacional de ciencia y tecnología de alimentos y 2<sup>do</sup>. Congreso internacional sobre innovación y tendencias en procesamiento de alimentos. 27-29 de mayo del 2015. UANL - UG. San Nicolás de los Garza, N.L. México.

Torres-Alvarez C, Baez-Gonzalez JG, Nuñez-Gonzalez MA, Amaya-Guerra CA, Gallardo-Rivera CT. **Microencapsulación de aceite esencial de naranja y sus concentrados con ciclodextrinas.** Ponencia *Oral*. 2<sup>do</sup>. Congreso internacional de alimentos funcionales y nutraceuticos. 22-24 de Junio del 2016. Universidad Autónoma de Querétaro con AlfaNutra. Querétaro, México.