



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE EMULSIONES CON ACEITES
ESENCIALES SOMETIDAS A pH SIMULANDO CONDICIONES
GASTROINTESTINALES**

Por:

Alondra Acuña Juanz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Alondra Acuña Juanz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias



Dr. Luis Quihui Cota
Director de Tesis



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Integrante de comité de tesis



Dr. Marco Antonio López Mata
Integrante de comité de tesis



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Caracterización y Evaluación de la Actividad Antibacteriana de Emulsiones con Aceites Esenciales Sometidas a pH Simulando Condiciones Gastrointestinales" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Alondra Acuña Juarez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Cairé Juvera", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Cairé Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo brindado a lo largo de mi formación de posgrado, sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

También extiendo mi agradecimiento al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por proporcionarme un entorno académico y científico excepcional, así como los recursos necesarios para llevar a cabo mi investigación.

De igual manera, agradezco profundamente a los miembros de mi comité, Dr. Luis Quihui Cota, Dr. Jaime Lizardi Mendoza, Dr. Marco Antonio López Mata, M. en C. Gloria Guadalupe Morales Figueroa y Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar por su invaluable orientación, sugerencias y apoyo a lo largo de este proceso.

Quiero reconocer el apoyo técnico y el invaluable trabajo en laboratorio de Nicolás González-González, Ildfonso Guerrero-Encinas, Cristian Tonopomea-Aragón, Ezequiel Hernández-Mendoza, Mónica A. Villegas-Ochoa y Melvin R. Tapia-Rodríguez quienes con su dedicación y compromiso contribuyeron significativamente al desarrollo de este proyecto.

Finalmente, a mis amigos Lina, Libertad, Jorge, Edith, Ilde y Shain, por su invaluable apoyo y por tomarse el tiempo de llevarme a casa después de largas jornadas. Gracias por estar presentes en cada momento y hacer posible que alcanzara esta meta. Especialmente a Cris, Nico y Ezequiel quienes fueron fundamentales para no rendirme en los momentos más difíciles. Gracias por ser mi motivación y por hacer de estos años una experiencia inolvidable.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, especialmente a mis padres, **Martha O. Juanz** y **Gusmaro Acuña**, a mis hermanos, **Emmanuel** y **Abigail**, quienes, a pesar de la distancia, siempre me han apoyado incondicionalmente y han creído en mí en cada paso de este camino, a mi **tía Mimy**, por su apoyo y siempre estar dispuesta a ayudarme.

A mi querida **abuelita Blanca**, que sé que estaría orgullosa de mí, y cuyo recuerdo me ha acompañado y dado fuerzas a lo largo de este proceso.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1.INTRODUCCIÓN	12
2.ANTECEDENTES	13
2.1 Problemática Asociada a la Resistencia Bacteriana.	13
2.1.1. Bacterias Patógenas Resistentes y Su Impacto en la Salud Pública	14
2.1.2. Infecciones Gastrointestinales Bacterianas: Epidemiología	15
2.2. Características Generales de Bacterias Patógenas de Este Estudio	15
2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	15
2.2.2. <i>Salmonella</i> entérica serovariedad Typhimurium	16
2.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	16
2.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.3. Tratamientos Contra Bacterias Resistentes	17
2.4. Aceites Esenciales Como Alternativas a los Tratamientos Convencionales.....	18
2.5. Emulsiones a Base de Aceites Esenciales de Canela, Clavo y Árbol de Té.....	19
2.6. Acción Antibacteriana, Ventajas y Desventajas de los Aceites Esenciales	21
2.7. Simulación Gastrointestinal.....	22
2.7.1. Fisiología del Tracto Gastrointestinal.....	23
2.7.2. Modelos	24
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo General.....	27
4.2. Objetivos Particulares	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Materiales	28
5.2. Preparación del Inóculo	28
5.3. Preparación de Emulsiones.....	28
5.4. Caracterización Físicoquímica de las Emulsiones.....	29
5.4.1. pH.....	29

CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

5.5. Determinación de CMI y CMB	30
5.6. Efecto del pH en la Actividad Antimicrobiana de las Emulsiones	30
5.7. Análisis Estadístico	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1. Caracterización de las Emulsiones	32
6.1.1. Tamaño de Partícula	32
6.1.2. Índice de Polidispersidad	33
6.1.3. Potencial Zeta	34
6.2. Determinación de CMI y CMB	35
6.3. Actividad Antimicrobiana de las Emulsiones Después de Haberse Sometido a Diferentes pH que Simulan a Aquellos del Tracto Gastrointestinal.....	37
7. CONCLUSIONES	40
8. REFERENCIAS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Curvas de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Salmonella</i> Typhimurium (B), <i>Staphylococcus aureus</i> (C) y <i>Listeria monocytogenes</i> (D) expuestas a las distintas emulsiones a base de aceite esencial de canela, clavo y árbol de té, después de ser sometidas a cambios de pH.....	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pagina
1	Diferentes estrategias para tratar bacterias resistentes.....	18
2	Tamaños de partículas de las emulsiones a base de aceite esencial de árbol de té, clavo y canela a diferentes tiempos.....	32
3	Índice de polidispersidad de las emulsiones a base de aceite esencial de árbol de té, clavo y canela a diferentes tiempos.....	34
4	Potencial zeta de las emulsiones a base de aceite esencial de árbol de té, clavo y canela a diferentes tiempos.....	35
5	Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los aceites esenciales libres de árbol de té, clavo y canela y en forma de emulsión.....	38

RESUMEN

La resistencia bacteriana es una creciente amenaza para la salud pública, exacerbada por la reducción en la eficacia de los medicamentos. Como alternativa, los aceites esenciales destacan por su actividad antibacteriana, pero deben procesarse como emulsiones para preservar sus propiedades y minimizar el daño a los tejidos del hospedero. También es de importancia clínica evaluar las actividades antimicrobianas de estas emulsiones después de una digestión gastrointestinal, sin embargo, son escasos los estudios de este tipo. El objetivo de este estudio fue determinar las propiedades fisicoquímicas y analizar la actividad antibacteriana de emulsiones elaboradas con aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té contra *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, a distintos niveles de pH (7.0, 3.0 y 6.5) que simularon a las condiciones del tracto gastrointestinal de un adulto sano. Para ello, se realizaron emulsiones de canela, clavo y árbol de té, se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS), y se determinaron las CMI y CMB de los aceites libres y sus emulsiones mediante el método de dilución en caldo. Las emulsión que mostró partículas de menor tamaño (137.75 ± 2.04 nm) y menor índice de polidispersidad (0.21 ± 0.02) fueron las de árbol de té, mientras que las de clavo tuvieron un valor más electronegativo de potencial zeta (-39.85 ± 0.49 mV). El aceite esencial que mostró mejor actividad antibacteriana fue el de clavo con CMI y CMB de 0.3 y 0.6 mg/mL contra *Escherichia coli*, >0.3 y 0.6 mg/mL contra *Salmonella* Typhimurium, 0.3 y 0.9 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*, y 0.3 y 1.5 mg/mL contra *Listeria monocytogenes*. Por otro lado, *Escherichia coli* (0.95 y 0.95 mg/mL) y *Staphylococcus aureus* (0.6 y 0.7 mg/mL) presentaron mayor sensibilidad a la emulsión de canela, mientras que *Salmonella* Typhimurium (0.6 y 0.7 mg/mL) y *Listeria monocytogenes* (0.7 y 0.9 mg/mL) a la de clavo. Igualmente, las emulsiones que exhibieron mejor actividad después de someterse a los distintos pH fueron las de canela y clavo. Este estudio demostró que las emulsiones a base de aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té poseen propiedades fisicoquímicas estables y buena actividad antibacteriana antes y después de haber sido sometidas a diferentes pH simulando a aquellos del tracto gastrointestinal.

Palabras clave: Aceites esenciales, emulsión, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Bacterial resistance is a growing threat to public health, exacerbated by reduced drug efficacy. Alternatively, essential oils are noted for their antibacterial activity but must be processed as emulsions to preserve their properties and minimize damage to host tissues. It is also of clinical importance to evaluate the antimicrobial activities of these emulsions after gastrointestinal digestion. However, studies of this type are scarce. This study aimed to determine the physicochemical properties and analyze the antibacterial activity of emulsions prepared with cinnamon, clove, and tea tree essential oils against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, at different pH levels (7.0, 3.0 and 6.5) that simulated the conditions of the gastrointestinal tract of a healthy adult. For this purpose, cinnamon, clove, and tea tree emulsions were prepared, characterized by dynamic light scattering (DLS), and the MIC and MBC of the free oils and their emulsions were determined by the broth dilution method. The emulsions that showed smaller particles (137.75 ± 2.04 nm) and lower polydispersity index (0.21 ± 0.02) were those of tea tree, while those of clove had a more electronegative zeta potential value (-39.85 ± 0.49 mV). The essential oil that showed the best antibacterial activity was clove with MIC and MBC of 0.3 and 0.6 mg/mL against *Escherichia coli*, >0.3 and 0.6 mg/mL against *Salmonella* Typhimurium, 0.3 and 0.9 mg/mL against *Staphylococcus aureus*, and 0.3 and 1.5 mg/mL against *Listeria monocytogenes*. On the other hand, *Escherichia coli* (0.95 and 0.95 mg/mL) and *Staphylococcus aureus* (0.6 and 0.7 mg/mL) showed greater sensitivity to the cinnamon emulsion, while *Salmonella* Typhimurium (0.6 and 0.7 mg/mL) and *Listeria monocytogenes* (0.7 and 0.9 mg/mL) to the clove emulsion. Likewise, cinnamon and clove were the emulsions that exhibited the best activity after being subjected to the different pH. This study demonstrated that emulsions based on cinnamon, clove, and tea tree essential oils have stable physicochemical properties and good antibacterial activity before and after being subjected to different pHs, simulating those of the gastrointestinal tract.

Key words: Essential oils, emulsion, antibacterial activity.

1.INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es uno de los problemas que más rápido avanza a nivel mundial y actualmente, se considera una de las amenazas más grandes a la salud pública (OMS, 2020). Debido a que, los antimicrobianos convencionales se vuelven cada vez menos eficaces por su uso indiscriminado, el tratamiento inapropiado y la automedicación, provocando una persistencia de las enfermedades infecciosas (Loureiro *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2019).

Como respuesta a la resistencia bacteriana a los antibióticos se ha impulsado la búsqueda de nuevos tratamientos para combatir las infecciones. Una opción serían los aceites esenciales, ya que cuentan con compuestos que han demostrado tener efecto antibacteriano. Sin embargo, es necesario realizar emulsiones de estos con el propósito de proteger y mantener intactas sus propiedades antibacterianas, y a su vez reducir al mínimo el daño que podrían provocar a los tejidos del hospedero.

La herramienta que ayuda a evaluar la eficacia y el comportamiento de diferentes compuestos expuestos al proceso digestivo es a través de un sistema de simulación gastrointestinal. Con esto, se pueden estimar las posibles transformaciones que sufrirían los alimentos, sustancias o inclusive fármacos al ser sometidos a un proceso de digestión, o conocer cómo se comportarían las emulsiones elaboradas a base de aceites esenciales. Las emulsiones permiten conservar las propiedades de los aceites esenciales (Shi *et al.*, 2012), pero son pocos los estudios en la literatura que aportan información sobre la actividad que presentan estos compuestos después de ser sometidos a condiciones gastrointestinales.

En este trabajo se propone determinar las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas, que tienen las emulsiones realizadas a base de aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té sobre bacterias patógenas, así como, evaluar sus propiedades después de ser sometidas a distintos niveles de pH simulando las distintas fases del tracto gastrointestinal en condiciones normales

2. ANTECEDENTES

2.1. Problemática Asociada a la Resistencia Bacteriana.

Existe una gran variedad de microorganismos en el suelo, agua, aire e incluso en otros seres vivos y en alimentos y algunos pueden provocar enfermedades. Actualmente, están adquiriendo resistencia a los antibióticos, provocando una de las mayores amenazas para la salud a nivel mundial.

Los antibióticos actúan mediante diferentes mecanismos de acción para combatir a las bacterias. Los más comunes son: 1) la inhibición de la síntesis de la pared celular, al impedir la síntesis de peptidoglicano; 2) la inhibición de la síntesis de proteínas, mediante la interferencia sobre la actividad de los ribosomas; 3) la alteración de la membrana citoplasmática, al producir cambios en la permeabilidad de la membrana; 4) la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y 5) la inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales. Los principales grupos de agentes antimicrobianos con actividad contra patógenos Gram-negativos son: antibióticos betalactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas y quinolonas (Martínez D. 2021)

Por otro lado, el uso indiscriminado de antibióticos potentes y de amplio espectro, el tratamiento inapropiado y la automedicación, han provocado tasas altas de resistencia antibacteriana. A su vez, estos mismos factores han sido identificados como responsables del incremento en las tasas de morbilidad, prolongación de estancias hospitalarias, y la reducción en la eficacia de los antibióticos, lo cual, ha conducido a la necesidad de tratamientos cada vez más agresivos e invasivos (OMS, 2020).

El conocimiento sobre la epidemiología de las bacterias patógenas resistentes a los antibióticos nos permitirá desarrollar estrategias más precisas de control y prevención. Para enfrentar este escenario, es importante el desarrollo de diferentes tratamientos como alternativas o coadyuvantes a los convencionales, ya que si este problema continúa, muchas de las enfermedades infecciosas que son relativamente fáciles de tratar actualmente, se podrían tornar potencialmente mortales (OMS, 2017).

Los mecanismos de acción por los cuales las bacterias pueden desarrollar dicha resistencia a

antibióticos son diversos, e incluyen los intrínsecos o adquiridos. Una misma bacteria puede presentar varios mecanismos entre los que describimos los siguientes: disminución de la permeabilidad de la envoltura celular de la bacteria, lo que limita la entrada del antibiótico, la expresión de proteínas transmembranales (bombas de flujo), alteración del sitio blanco para el antibiótico por mutaciones genéticas o modificaciones postraduccionales, cambio en la expresión de proteínas o enzimas que inactivan al antibiótico, modificando su estructura química o degradándolo, cambios en la expresión de estados fisiológicos específicos de baja susceptibilidad a los antibióticos, como la formación de biopelícula o la generación de células persistentes o tolerantes (Blair *et al.*, 2015; Wright, G.,2016; Balaban *et al.*, 2019; Téllez, A. 2020).

2.1.1. Bacterias Patógenas Resistentes y Su Impacto en la Salud Pública

Las bacterias patógenas son aquellas que pueden generar o provocar infecciones, intoxicaciones, y enfermedades. La OMS realizó en el 2017 un enlistado de bacterias patógenas que clasificó con base a prioridad de tratamiento crítico, alto o medio. Las bacterias de prioridad crítica comprende a las que han adquirido resistencia a un gran número de antibióticos como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (multirresistentes). Entre ellas se incluyen los géneros de *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias *Enterobacteriaceas* como *Klebsiella* sp. *Escherichia coli*, *Serratia* sp, y *Proteus*.

La categoría de prioridad alta y media incluye bacterias que exhiben una farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias. Esta lista desafortunadamente crece cada vez más y por eso la resistencia antimicrobiana fue considerada en la lista de “problemas sanitarios urgentes de dimensión mundial” en 2020 por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Diferentes estudios han exhibido las problemáticas sociales y económicas que desencadenan las infecciones por bacterias patógenas resistentes. El Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS), respaldado por la OMS, reveló la presencia generalizada de resistencia bacteriana a los antibióticos en muestras de 500.000 personas de 22 países, con un porcentaje de hasta un 82% en al menos uno de los antibióticos más utilizados. La Organización

para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), reportaba que este problema de salud es “un fenómeno de expansión inquietante, que podría costar alrededor de 3.500 millones de dólares anuales a las economías de sus países miembros” (OPS, 2021).

2.1.2. Infecciones Gastrointestinales Bacterianas: Epidemiología

Es importante prevenir y controlar las enfermedades causadas por bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal, debido a que pueden provocar desde enfermedades leves, como diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómitos, hasta la muerte. Las bacterias pueden ser transmitidas a través de los alimentos o por contacto con heces contaminadas. Algunas de las más comunes que causan infecciones gastrointestinales son *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* y *Campylobacter*.

Se estima que hay alrededor de 1.35 millones de casos de infecciones por *Salmonella* en los Estados Unidos cada año, las que son vinculadas a la carne de aves de corral y productos como el huevo, frutas y verduras frescas contaminadas (CDC, 2021) para el caso de la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 es aún alarmante en todo el mundo debido a su capacidad para causar enfermedades graves, como el síndrome urémico hemolítico (SUH), una complicación potencialmente mortal. Además, se han identificado nuevas cepas de *Escherichia coli* productoras de carbapenemasas (CPE).

2.2. Características Generales de Bacterias Patógenas de Este Estudio

2.2.1. *Escherichia coli*

Es una bacteria Gram-negativa asociada a muchas enfermedades intestinales y del tracto urinario. *Escherichia coli* es uno de los patógenos más comunes debido a su capacidad para adaptarse,

colonizar y proliferar en diferentes hábitats a través de una multitud de factores de virulencia adquiridos. Su presencia en la industria de procesamiento de alimentos es nociva y, en algunos casos, causa intoxicaciones alimentarias. Por lo tanto, es un problema importante para los sectores relacionado con la alimentación, agricultura y salud.

Escherichia coli puede adquirir y transmitir genes de resistencia contra los antibióticos, lo que plantea un problema para el tratamiento de estas infecciones (Ranjan *et al.*, 2017). Igualmente, tiene la capacidad de formar colonias resistentes en el intestino y otros entornos (Wells *et al.*, 2017). Si bien, existe gran variedad de cepas de *Escherichia coli*, la que genera mayor preocupación es *Escherichia coli* O157:H7 debido a su capacidad para causar enfermedades graves.

2.2.2. *Salmonella* entérica serovariedad Typhimurium

Salmonella Typhimurium es un importante patógeno que está ampliamente distribuido en la naturaleza y representa un grave peligro para los animales, y pueden transmitirse a los humanos a través de la cadena alimenticia causando infecciones gastrointestinales, amenazando la salud y potencialmente ocasionar la muerte (Du *et al.*, 2020). La bacteria utiliza una variedad de mecanismos para evadir y alterar la respuesta inmune del hospedero y es capaz de formar biopelículas en superficies lo que incrementa su resistencia a los mecanismos de eliminación por parte del hospedero (Wang *et al.*, 2018). Esta bacteria también puede adquirir y transmitir genes de resistencia a los antibióticos y se ha demostrado que *Salmonella* Typhimurium puede desarrollar una mayor resistencia térmica, por lo que las altas temperaturas y el tiempo de tratamiento solo podrían garantizar la inocuidad (Archer *et al.*, 1998; Beuchat *et al.*, 2013; Santillana *et al.*, 2013).

2.2.3. *Listeria monocytogenes*

Es un patógeno intracelular facultativo causante de listeriosis, una infección que puede llegar a ser mortal (Osek *et al.*, 2022). Forma biopelículas que aumentan su resistencia a los desinfectantes lo

que les permite mayor sobrevivencia sobre las superficies (Bucur *et al.*, 2018; Sibanda *et al.*, 2022). Es transmitido por alimentos, aunque la incidencia es menor comparado con otras bacterias como *Campylobacter* y *Salmonella*, tiene la tasa de letalidad más alta entre los patógenos transmitidos por los alimentos (Park *et al.*, 2022).

2.2.4. *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria Gram-positiva responsable de una amplia gama de infecciones intrahospitalarias, que van desde cutáneas leves hasta enfermedades más graves como neumonía y sepsis (Tong *et al.*, 2015). Es el agente etiológico más común de las infecciones purulentas.

La transmisión de *Staphylococcus aureus* puede deberse a la ingestión de agua y alimentos contaminados, ya sea por descuido en su manipulación o por refrigeración y cocción inadecuadas. Cuando crece en entornos con condiciones favorables para su desarrollo, este microorganismo produce toxinas, que causan intoxicación alimentaria. Además, *Staphylococcus aureus* es una causa importante de infecciones intestinales, foliculitis, mastitis puerperal y forúnculos, además de infecciones graves como sepsis, shock séptico, endocarditis y neumonía. Puede formar biopelículas en superficies y dispositivos médicos, lo que puede aumentar su resistencia a los desinfectantes y aumentar su capacidad de causar infecciones serias (Pasachova *et al.*, 2019).

2.3 Tratamientos Contra Bacterias Resistentes

Existen distintos tipos de tratamientos contra las bacterias resistentes, los cuales se muestran en el Cuadro 1. Las acciones principales usadas para contener la resistencia bacteriana son la educación comunitaria y prescripción adecuada. Sin embargo, es importante conocer los tratamientos para tomar medidas en caso de una infección, aunque algunos de ellos se encuentran en etapas tempranas de desarrollo o no están disponibles para su uso clínico general. Por lo tanto, se requiere de mayor investigación para determinar su seguridad y eficacia en la práctica clínica. Otra medida primordial

es la prevención que contribuye a la protección de la salud pública evitando la propagación de enfermedades.

Cuadro 1. Diferentes tratamientos para tratar bacterias resistentes.

Tratamiento	Descripción	Útil contra:	Referencias
Terapia con fagos	Virus antibacterianos. contra bacterias específicas.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a los antibióticos. <i>Escherichia coli</i>	Abedon <i>et al.</i> , 2011 Betancor, 2023 Cisek <i>et al.</i> , 2017
Modulación del microbioma	Trasplante de microbiota fecal (FMT) como enfoque terapéutico para modular el microbioma.	<i>Clostridioides difficile</i> resistente a los antibióticos.	Jácome <i>et al.</i> , 2023 Moreno del Castillo <i>et al.</i> , 2018
Péptidos antimicrobianos	Interacción electrostática entre el AMP catiónico a pH fisiológico y la membrana bacteriana aniónica.	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a los antibióticos.	Ayala, 2022
Terapias combinadas con antibióticos	Combinación de varios antibióticos.	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Giraldo, 2020

2.4 Aceites Esenciales como Alternativas a los Tratamientos Convencionales

La comunidad científica ha desarrollado interés por el uso de hierbas medicinales con propiedades antimicrobianas. Las plantas y otras fuentes naturales pueden proporcionar una amplia gama de compuestos complejos y estructuralmente diversos. Los extractos de plantas y los aceites esenciales poseen propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales, lo que ha llevado a considerarlos como fuentes potenciales de novedosos compuestos antimicrobianos, agentes que promueven la conservación de alimentos y alternativas para tratar enfermedades infecciosas (Safaei-Ghomi, 2010).

La industria alimentaria presenta una gran demanda de compuestos naturales con los cuales desarrolla nuevos productos que impulsan la innovación en el envasado y conservación de alimentos. La inmovilización de extractos de plantas o de aceites esenciales en sistemas coloidales

permite realizar numerosas formulaciones con nuevas aplicaciones, asegura la protección de los compuestos naturales como los aceites esenciales, y facilita la liberación controlada (Asbahani *et al.*, 2015).

Los aceites esenciales son de origen natural, y están constituidos por una mezcla de compuestos, sintetizados por las plantas aromáticas, como metabolitos secundarios con actividad biológica de amplio espectro (Asbahani *et al.*, 2015; Costa da Silva, *et al.*, 2023). Igualmente, tienen propiedades que brindan protección a las plantas contra agentes externos, como la luz ultravioleta, animales herbívoros, insectos y microorganismos. Estos compuestos han recibido especial atención debido a sus propiedades de eliminación de radicales (De Sousa Barros *et al.*, 2015).

2.5 Emulsiones a Base de Aceites Esenciales de Canela, Clavo y Árbol de Té

Las emulsiones son mezclas de dos líquidos inmiscibles, como el agua y el aceite, que se combinan mediante la ayuda de un agente emulsionante o emulsificador para crear una suspensión estable. Las emulsiones tienen amplia variedad de aplicaciones en diferentes industrias debido a sus propiedades físicas y químicas.

Los productos naturales que son utilizados en sistemas de inmovilización, como las emulsiones, exhiben una mejor estabilidad y liberación sostenida. Además, muestran una biodisponibilidad mejorada a dosis más bajas, lo que aumenta su seguridad a largo plazo (Bilia *et al.*, 2017; Chongsrimisirisakhol *et al.*, 2023). Esta estrategia ha hecho que los medicamentos naturales tengan un papel importante en las clínicas modernas porque son una alternativa viable que puede desplazar productos químicos sintéticos.

El aceite esencial de canela ha sido investigado por su acción antibacteriana contra patógenos. Se obtiene principalmente de *Cinnamomum zeylanicum* (familia *Lauraceae*) (Nabavi *et al.*, 2015). Se utiliza tradicionalmente en varios remedios herbales debido a su amplio espectro de actividades biológicas, como antiinflamatorias, antidiabéticas, carminativas, antivirales y antihipertensivas (Kumar *et al.*, 2019).

El aceite de canela está constituido por 38 fitoquímicos, de los cuales el compuesto predominante es el cinamaldehído (70-80%), seguido del eugenol (4-10%), limoneno (2.42%), acetato de cinamilo (2.03%), linalol (1.16%) y α -terpineol (0.87%). El cinamaldehído es una de las moléculas

de mayor interés como agente antimicrobiano alimentario debido a su amplio espectro contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Una técnica importante para facilitar la compatibilidad de los aceites esenciales con las formulaciones acuosas y reducir las pérdidas por evaporación es la inmovilización en forma de emulsión a nano o microescala (Coelho, 2021).

El aceite esencial de clavo es clasificado como "generalmente considerado seguro" (GRAS) por la FDA, y se obtiene principalmente del *Syzygium aromaticum* (familia *Myrtaceae*) (Mann *et al.*, 2022). Es utilizado en la cocina o como medicina tradicional por que se le atribuyen propiedades antisépticas, antimicrobianas, cicatrizantes y analgésicas. El aceite esencial de clavo contiene como principal compuesto el eugenol, y puede tener algún control sobre la microbiota nativa y patógenos (Goñi *et al.*, 2016).

Los principales constituyentes aromáticos de *Syzygium aromaticum* son el eugenol y el acetato de eugenilo, y el primero de ellos, tiene actividad antifúngica. Los aceites esenciales de clavo han sido ampliamente analizados, y se han reconocido alrededor de 18 compuestos diferentes. Las propiedades antioxidantes de estos componentes se han evaluado mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). También se ha demostrado que el aceite de clavo inactiva eficazmente los patógenos transmitidos por los alimentos, como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Oussalah *et al.*, 2007).

Por otro lado, el aceite esencial del árbol de té está compuesto por terpenos, principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos y alcoholes relacionados, que son hidrocarburos aromáticos volátiles. El principal componente del aceite esencial del árbol de té es terpineno-4-ol, al que se le atribuyen propiedades antimicrobianas. Por lo tanto, este aceite puede utilizarse como bactericida natural. Además, tiene efectos antivirales, antifúngicos, aumenta la actividad de las células inmunitarias, previene infecciones, promueve la cicatrización de heridas y ayuda a reducir la inflamación (Kennedy *et al.*, 2016; Garozzo *et al.*, 2011).

Para comprender el comportamiento de las emulsiones a base de aceites esenciales es necesario caracterizarlos adecuadamente para optimizar su formulación y garantizar su estabilidad y calidad en diversas aplicaciones, como la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y de productos químicos. La caracterización de emulsiones es el proceso mediante el cual se analizan y describen las propiedades físicas y químicas. Existen diferentes técnicas de caracterización de emulsiones que permiten evaluar su estabilidad, el tamaño y distribución de las gotas, la viscosidad y la carga superficial (Zou *et al.*, 2023).

2.6. Acción Antibacteriana, Ventajas y Desventajas de los Aceites Esenciales

El efecto antimicrobiano de los aceites esenciales está influenciado por la especie de bacteria y tipo de aceite empleado. En relación con la especie bacteriana, puede estimarse la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). El CMI se define como la concentración más baja de aceite esencial que inhibe parcialmente el crecimiento de la bacteria, mientras que la CMB representa la concentración mínima de aceite esencial necesaria para matar igual o más del 99,9 % de la población bacteriana (Bravo *et al.*, 2018; Pérez E. & Rivas A., 2021). Los aceites esenciales actúan directamente sobre la membrana bacteriana inhibiendo el crecimiento de microorganismos fúngicos y bacterianos. Tanto el contenido y la composición de los compuestos bioactivos en los aceites esenciales son muy diversos y dependen de su fuente de origen (Cava-Roda *et al.*, 2010).

Los aceites esenciales han mostrado actividad inhibitoria y bactericida similar tanto contra las bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Se han realizado diferentes estudios para entender su modo de acción, aunque no han sido dilucidados totalmente. Se ha sugerido que su capacidad para penetrar las membranas bacterianas es la responsable de su acción antimicrobiana, interrumpiendo las propiedades funcionales de las bacterias. Esto se logra al interactuar con los orgánulos en el citoplasma bacteriano y afectar el metabolismo celular (Bassanetti *et al.*, 2017; Yoo *et al.*, 2020). La exposición de los grupos hidrofílicos de las moléculas emulsionantes de los aceites esenciales puede potenciar su entrega efectiva a la célula bacteriana. Por otro lado, su acción también puede basarse en su hidrofobicidad molecular (Donsi y Ferrari, 2016).

La potente acción antimicrobiana del aceite esencial de canela se debe a la alteración que produce en la membrana del patógeno, lo cual favorece la fuga de componentes intracelulares resultando en el colapso celular (Yeon-Ji *et al.*, 2015). La actividad antibacteriana del aceite del árbol del té se atribuye al terpineno-4-ol, que es el principal componente de ese aceite esencial (Aljazy y Abdulstar, 2021). Aunque los aceites esenciales poseen propiedades beneficiosas, en su forma natural son sensibles a las condiciones medioambientales, lo que puede provocar su degradación y pérdida de sus propiedades.

2.7. Simulación Gastrointestinal

Los métodos *in vitro* que simulan los procesos de digestión se basan en conocimientos actuales sobre la fisiología humana y el funcionamiento del aparato digestivo. Estos conocimientos se aplican de manera extrapolada para simular las condiciones digestivas del cuerpo humano y así permitir la realización de ensayos de digestión en el laboratorio. De esta manera, se pueden estudiar los procesos de digestión de manera controlada y precisa, así como también cuestiones como la digestibilidad y la bioaccesibilidad, lo que resulta de gran utilidad en la investigación científica (González, 2016).

La simulación gastrointestinal replica diversas etapas del proceso de digestión humana, por lo general se suele incluir las fases oral, gástrica y del intestino grueso. En cada una de las fases se intenta imitar en lo posible a la realidad de las condiciones fisiológicas *in vivo* tales como: movimientos peristálticos, temperatura, pH, presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, el tiempo de digestión, concentraciones de sal, absorción de nutrientes (Riva, 2014). En la mayoría de este tipo de simulaciones se pone a prueba el compuesto bioactivo de interés.

Cuando un fármaco o compuesto entra en el tracto gastrointestinal, su solubilidad y disolución pueden ser afectadas por las sales biliares, fosfolípidos y los productos de la digestión lipídica, que tienen la capacidad de solubilizar sustancias lipofílicas (De waal *et al.*, 2023). Para mejorar la precisión de las herramientas de solubilidad y disolución *in vitro*, se han desarrollado modelos con fluidos intestinales simulados. Estos imitan la composición de los fluidos intestinales humanos de adultos sanos y contienen niveles de pH, capacidad tampón, sales biliares (por ejemplo, ácido taurocólico) y fosfolípidos (fosfatidilcolina) que son fisiológicamente relevantes. Los fluidos intestinales simulados reflejan el entorno gastrointestinal *in vivo* en condiciones de ayuno en adultos y mejoran el valor predictivo de solubilidad y disolución *in vitro* (Dressman *et al.*, 2007; y Dahlgren *et al.*, 2021). Dependiendo de la finalidad con la cual se utilice la simulación gastrointestinal, también se considera la complejidad y capacidad de imitar las condiciones reales. Durante este proceso las muestras se someten a las condiciones normales de temperatura y pH correspondientes a la fase bucal, estomacal e intestinal del tracto gastrointestinal de una persona adulta sana.

2.7.1 Fisiología del Tracto Gastrointestinal

La digestión humana es un proceso complejo y esencial para la salud. Mediante éste, los alimentos ingeridos son transformados en sustancias químicamente más pequeñas y sencillas (Rivas, 2014). La desintegración de los alimentos se lleva a cabo principalmente en la boca y estómago, mientras que la digestión enzimática y la posterior absorción tienen lugar en el intestino grueso y delgado (Andrés, A., 2019). El proceso digestivo comienza en la boca, donde los alimentos se mastican y se mezclan con saliva, que contiene enzimas que comienzan a descomponer los carbohidratos. En el caso de las emulsiones existen varios procesos que podrían contribuir a que presenten cambios fisicoquímicos, inclusive la presencia de mucina en la saliva lo que puede provocar su desestabilización lipídica por floculación (Silletti *et al.*, 2007). A medida que los alimentos pasan por el esófago, se activa el proceso de deglución y se dirigen hacia el estómago.

El estómago es un órgano muscular que tiene la capacidad de contraerse y mezclar los alimentos con ácido clorhídrico y enzimas digestivas. El ácido clorhídrico del estómago ayuda a descomponer las proteínas, mientras que las enzimas digestivas degradan los carbohidratos y las grasas. El tiempo de resistencia en el estómago de un alimento o compuesto, varía dependiendo de su origen, y puede ser desde unos minutos hasta algunas horas, aunque también existen factores externos como la salud del individuo, la edad y características del alimento. El estómago puede considerarse como el órgano donde se inicia el proceso de la lipólisis a partir de la lipasa gástrica, sin embargo, esta contribución se considera minoritaria, ya que se ha demostrado que solo alcanza niveles de hidrólisis del 10-30% de los componentes lipídicos (Liao *et al.*, 1983).

El intestino delgado completa la mayor parte de la digestión y la absorción de nutrientes. Las enzimas digestivas, producidas por el páncreas y el intestino delgado, descomponen los nutrientes en componentes más pequeños que se absorben a través de las paredes intestinales y se transportan al torrente sanguíneo. También es donde se lleva a cabo aproximadamente el 80% de la lipólisis total del organismo. Las sales biliares y los fosfolípidos producidos en el hígado, que llegan al intestino vía vesícula biliar, se adsorben al presentar actividad interfacial en la superficie de las gotas de lípidos para facilitar su digestión (Tso y Thomson, 2000). El intestino grueso es el lugar donde se absorbe agua y se forman las heces. Las bacterias intestinales también descomponen los residuos no digeridos produciendo vitaminas importantes (Andrés, 2019).

En resumen, el aparato digestivo humano es el conjunto formado por el tracto digestivo junto con otros órganos que ayudan al cuerpo a transformar y absorber los alimentos. La digestión es un proceso metabólico de transformación de alimentos ingeridos en sustancias químicamente más pequeñas y sencillas, para que puedan ser asimiladas fácilmente y utilizadas como fuente de energía.

Cuando el intestino se encuentra en homeostasis, nos indica que se están desempeñando funciones metabólicas, tróficas y de protección, que resultan benéficas para la salud del hospedador; sin embargo, existen factores como el estrés, los compuestos como antibióticos o constituyentes de la dieta, que pueden modificar la composición y/o funcionalidad de la microbiota intestinal. La dieta es uno de los factores que más influyen en la composición de la microbiota intestinal humana (De Filippo *et al.*, 2010).

2.7.2 Modelos

Los modelos de simulación gastrointestinal se emplean habitualmente para evaluar las transformaciones que sufren los alimentos y/o compuestos durante el tránsito por el tracto gastrointestinal, así como también, para determinar los posibles cambios en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal como consecuencia de la ingesta dietaria.

Existen varios modelos de simulación gastrointestinal y los más utilizados se pueden dividir en 3 tipos que incluyen el modelo de digestión estática, de digestión dinámica y el *in vitro* de membrana celular. Cabe destacar que se han desarrollado numerosas variaciones o precisiones en los mismos, que han contribuido a su mejoramiento a lo largo del tiempo y actualmente se siguen renovando.

El método de digestión estática utiliza proporciones constantes de la muestra y fluidos digestivos, y debe mantenerse un pH constante a cada paso de la digestión. Esto hace que el método sea sencillo de utilizar, pero no adecuado para simular la cinética de la digestión. En este método, las muestras a evaluar se someten a una digestión secuencial oral, gástrica e intestinal, mientras que parámetros como electrolitos, enzimas, bilis, dilución, pH y tiempo de digestión se basan en los datos fisiológicos disponibles. Este método se usa para evaluar los productos finales resultantes de la digestión de las muestras (Chongsrimisirakhol *et al.*, 2023).

El simulador gastrointestinal dinámico se compone de varios compartimentos, en los cuales se incluyen estómago, intestino y colon. El estómago está constituido por dos paredes flexibles rodeadas por una camisa de metacrilato en la que se bombea agua manteniendo el mezclado del contenido estomacal a una temperatura constante mediante movimientos peristálticos. El sistema permite cambiar el pH y el tiempo de vaciado al intestino delgado. El intestino delgado es un reactor en condiciones anaeróbicas, pH controlado, y la mezcla del contenido gástrico con las secreciones intestinales mantenidas en agitación mecánica son regulables. El colon se compone de tres reactores (colon ascendente, transversal y descendente) que operan en condiciones de anaerobiosis, con agitación mecánica y pH controlado (Tamargo *et al.*, 2017). Sin embargo, debido a su enorme complejidad, así como al elevado coste de instalación y puesta a punto, son simuladores poco comunes.

El modelo “*in vitro*” de membrana celular es una simulación del estómago hecho de silicona fabricado con tecnología de impresión 3D, produce contracciones peristálticas con ayuda de un instrumento electromecánico compuesto por una serie de motores, rodillos y ruedas excéntricas. El sistema estomacal simulado es capaz de generar proporciones de vaciado gástrico de las fracciones sólida y líquida como las reales. (Wang, 2019).

Los modelos semidinámicos de digestión “*in vitro*” permiten simular el comportamiento de emulsiones O/W o matrices alimentarias durante la digestión gástrica con la adición gradual de ácido, fluidos gástricos y enzimas, así como simular el vaciado gástrico (GE) (Mulet-Cabero, 2020; Molet-Rodríguez *et al.*, 2023).

Las simulaciones gastrointestinales permiten tomar muestras ya procesadas en regiones de difícil acceso y monitorear las distintas variables fisiológicas, movimientos peristálticos, tiempos de retención, variaciones de pH y composición de los fluidos gastrointestinales (Tamargo *et al.*, 2017). Estas simulaciones requieren de una amplia gama de condiciones que a menudo tienen poca relevancia fisiológica, lo que impide la comparación significativa de los resultados (Brodkorb, 2019).

3. HIPÓTESIS

Las emulsiones formuladas con aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té sometidas a pH de simulación gastrointestinal tienen actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar las propiedades fisicoquímicas y antibacterianas de las emulsiones a base de aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té sometidas a pH de simulación gastrointestinal.

4.2. Objetivos Particulares

- Determinar las propiedades fisicoquímicas de emulsiones a base de aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té.
- Determinar las propiedades antibacterianas “*in vitro*” de las emulsiones a base de aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té contra *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar y comparar las propiedades antibacterianas de emulsiones a base de aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té después de ser sometidas a distintos niveles de pH simulando fases del tracto gastrointestinal de una persona en condiciones normales contra *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Los aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té fueron proporcionados por el laboratorio de nutrición-infección de CIAD A.C. (Hermosillo, Son) de la marca comercial Sigma-Aldrich Corp. Para la preparación de las emulsiones de aceite en agua (O/W), se utilizó tween 80 de la marca comercial Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO) como surfactante. Las cepas bacterianas usadas fueron: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, que fueron proporcionadas por el cepario del laboratorio de microbiología de alimentos del CIAD A.C. (Hermosillo, Sonora).

5.2 Preparación del Inóculo

Las bacterias *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 25922), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), se cultivaron y se mantuvieron en agar Trypticase de Soya como medio de enriquecimiento (TSA; Becton Dickinson, Sparks, MD). Antes de iniciar cada ensayo, se transfirió una colonia aislada al medio TSA y se incubó a 35 ± 2 °C por 20 ± 2 h. De aquí, se transfirieron a alícuotas de 1 mL al sustrato de trabajo poco antes de los ensayos “*in vitro*”, las cuales se ajustaron a una cuenta de aproximadamente 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) / mL.

5.3 Preparación de Emulsiones

Se prepararon emulsiones, cada una con un aceite esencial diferente como base, (canela, clavo y

árbol de té), y por triplicado. La fase continua de las emulsiones O/W fue formulada por una solución acuosa que contenía 3% (p/p) de Tween 80. Se utilizó una concentración al 10% de la fase oleosa para formular las emulsiones, y se añadió la misma concentración de aceite esencial con base a la CMI o CMB. Se realizó el mismo protocolo para cada emulsión. Las emulsiones se prepararon con un homogeneizador ultrasónico (Ningbo Scientz Biotechnology Co., Ltd), con amplitud de onda de 84 μm durante 15 min. El tiempo de homogeneización se determinó en función de la concentración del aceite esencial en cada sistema como lo marca la metodología descrita por Dávila-Rodríguez *et al.*, (2020).

5.4 Caracterización Fisicoquímica de las Emulsiones

Las distribuciones del tamaño, polidispersidad y potencial zeta. fueron medidas a través de un equipo con dispersión dinámica de luz (DLS) y un detector de potencial zeta (Wyatt Co, EE. UU.). Se realizaron las mediciones durante un periodo de 28 días para registrar posibles variaciones en sus características.

5.4.1 pH

El pH de cada emulsión se midió utilizando un potenciómetro (OHAUS, STARTER 3100), con un intervalo de medición de pH de -2.00 a 16.00 y de temperatura de -5 °C a 110 °C, con una precisión de ± 0.01 unidades de pH. Las mediciones se realizaron utilizando un electrodo de vidrio que fue previamente calibrado con tampones a pH 3.0 y 7.0. Así mismo, se utilizó durante el proceso de simulación de pH gastrointestinales.

5.5 Determinación de CMI y CMB

Se utilizó el método de dilución en caldo como test de susceptibilidad microbiana descrito por Ramírez, *et al.*, 2009. Para ello se utilizó una microplaca de 96 pocillos, en la cual se añadió 5 μ L del inóculo bacteriano (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*) y 295 μ L de emulsión (previamente diluidas en caldo Müller-Hilton) a un rango de concentraciones de 0.5 a 2.5 mg/mL (mediciones realizadas por triplicado). También se montaron controles positivos y negativos que correspondieron a kanamicina y al inóculo bacteriano, respectivamente, en un medio enriquecido. Se incubaron las placas a 37 °C durante 18 ± 2 h. Después se inocularon 20 μ L de cada tratamiento por triplicado en agar Mueller-Hinton y se incubaron nuevamente a 37 °C durante 22 ± 2 h. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es aquella que inhibe parcialmente el crecimiento de la bacteria, mientras que la concentración mínima bactericida (CMB) es aquella que ha matado el 99% del inóculo original.

5.6. Efecto del pH en la Actividad Antimicrobiana de las Emulsiones

Las emulsiones fueron sometidas a una simulación gastrointestinal “*in vitro*” en la que se replicaron las condiciones de temperatura, los movimientos peristálticos y los valores de pH gastrointestinales de una persona adulta sana en ayuno. La metodología se basó en la descrita por Naissinger da Silva, *et al.*, (2021) con algunas modificaciones. Para el experimento, se prepararon soluciones de cada una de las emulsiones a la concentración mínima inhibitoria (CMI) correspondiente a cada bacteria y emulsión.

Se colocó en un vaso de precipitado 50 mL de emulsión, situado sobre una placa de calentamiento con agitación constante. Se utilizó un potenciómetro para medir los valores de pH en cada fase del proceso: fase inicial, fase bucal (1 minuto de duración), fase estomacal (30 minutos de duración) y fase intestinal (90 minutos de duración). De igual manera, se empleó un termómetro para garantizar que la temperatura se mantuviera a 37°C durante todo el experimento. Se realizó el mismo protocolo para cada una de las emulsiones de canela, clavo y árbol de té.

Inicialmente, se midió el pH de las emulsiones, ajustándolo a 7.0 con NaHCO₃ (1M) y HCl (0.1M) para simular el pH de la cavidad oral. Tras un minuto, se realizó un nuevo ajuste de pH a 3.0 con un potenciómetro (OHAUS, STARTER 3100) para reproducir las condiciones de la fase estomacal, la cual duró 30 minutos. Posteriormente, el pH se ajustó nuevamente a 7.0, correspondiente a la fase intestinal, que duró 90 minutos a una temperatura constante de 37°C y con agitación continua. Finalmente, el producto remanente de cada emulsión fue cultivado junto con las bacterias correspondientes, con el objetivo de determinar la actividad microbiológica de las emulsiones sobre las bacterias, basándonos en el método de dilución en caldo descrito por Ramírez, *et al.*, (2009). Se utilizó la densidad óptica (D.O.) medida a 620 nm, como indicador del crecimiento bacteriano. El tiempo del ensayo fue de 18 horas. Todas las muestras se evaluaron bajo las mismas condiciones y las mediciones se realizaron por triplicado.

5.7. Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar en los datos sobre caracterización. Se utilizó un ANOVA de una vía y la prueba de Tukey-Kramer a una $p < 0,05$ para realizar la comparación entre par de tratamientos sobre las bacterias analizadas. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 10, se graficaron los valores de densidad óptica (D. O.) en función del tiempo. Las curvas de crecimiento se ajustaron utilizando el complemento DMFit.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización de las Emulsiones

6.1.1. Tamaño de Partícula

Las propiedades de las emulsiones están determinadas por el tamaño de las micelas o gotas y su distribución. Dependiendo del diámetro de las gotas, las emulsiones se pueden dividir en nanoemulsiones (20 a 500 nm) y microemulsiones (0,5 a 100 μm). Entre más pequeñas sean las partículas en general obtendremos una emulsión con mayor estabilidad. Las nanoemulsiones, a diferencia de las microemulsiones, son cinéticamente estables, pero termodinámicamente no, y no se forman espontáneamente (Tadros TF., 2013). Sin embargo, la estabilidad física de las nanoemulsiones a largo plazo (sin aparente floculación o coalescencia) las hacen únicas (Wulff-Pérez *et al.*, 2009; Cardoso-Ugarte, *et al.*, 2017). Cuando hablamos de estabilidad cinética nos referimos a que la emulsión se mantiene en su estado disperso por un tiempo significativo sin que las gotas se agreguen o se separen rápidamente. Esta estabilidad es gracias a la energía que se añadió durante su preparación, con ultrasonido, y al decir que es termodinámicamente inestable nos referimos a que al no encontrarse en el estado de mínima energía el sistema tenderá a la desestabilización y a la separación de fases con el tiempo (Marfisi S. 2005). Los resultados muestran que las emulsiones con aceites esenciales de árbol de té, clavo y canela se mantuvieron dentro del rango nanométrico (20 a 500 nm) durante los 28 días de estudio. Sin embargo, la emulsión de árbol de té presentó un aumento ($p < 0.05$) en el tamaño de partícula a los 28 días (de 137.09 ± 0.10 a 144.97 ± 1.75 nm), lo que sugirió una ligera pérdida de estabilidad. En el Cuadro 2 se muestran los tamaños de partícula (gota) obtenidos para las emulsiones a base de aceite esencial de árbol de té, clavo y canela, durante un período de 28 días.

Cuadro 2. Tamaños de partículas de las emulsiones a base de aceite esencial de árbol de té, clavo y canela a diferentes tiempos.

Emulsión	Tamaño de partícula (nm)		
	Días		
	0	14	28
TTO	137.75 ± 2.04 ^a	137.09 ± 0.10 ^a	144.97 ± 1.75 ^b
CLO	224.64 ± 10.38 ^a	211.34 ± 11.32 ^a	201.41 ± 6.85 ^a
CO	463.34 ± 32.37 ^a	427.33 ± 8.32 ^a	426.63 ± 30.78 ^a

TTO: Aceite de árbol de té; CLO: Aceite de clavo; CO: Aceite de canela. Los valores indican la media ± desviación estándar. Literales iguales en el mismo renglón indican que no hay diferencias entre las medias de las emulsiones con respecto al tiempo n=3. (Tukey-Kramer; p < 0,05)

6.1.2. Índice de Polidispersidad

La polidispersidad en las emulsiones nos indica la uniformidad en el tamaño de las gotas de la fase dispersa y como ya se mencionaba anteriormente el tamaño de partícula está relacionado a la estabilidad de la emulsión. Las emulsiones polidispersas pueden experimentar coalescencia, donde las gotas más grandes tienden a fusionarse con las más pequeñas, lo que puede llevar a la separación de fases. En una emulsión ideal, todas las partículas tendrían el mismo tamaño. Sin embargo, en la realidad, es común encontrar emulsiones donde las gotas tienen tamaños diferentes (polidispersas). En el Cuadro 3 se pueden observar los valores de polidispersidad de las emulsiones de árbol de té, clavo y canela en un periodo de 28 días. La emulsión de árbol de té mostró un aumento (p < 0.05) en el índice de polidispersidad entre el día 0 (0.21 ± 0.02) y el día 14 (0.32 ± 0.02), indicando una mayor variabilidad en el tamaño de las gotas. Sin embargo, las emulsiones de clavo y canela no presentaron diferencias (p < 0.05) en los valores de índice de polidispersidad, lo que indica una distribución de tamaño más homogénea. Estos resultados nos indican que una menor uniformidad en la emulsión de árbol de té podría contribuir a una estabilidad reducida, en concordancia con estudios que muestran que emulsiones más homogéneas tienden a ser más estables (Tadros TF, 2013; Yazgan H., 2020.). Nuestros resultados muestran valores similares a los obtenidos por Campolo *et al.*, (2020) y Jiménez *et al.*, (2018), quienes trabajaron con emulsiones a base de aceites esenciales utilizando como surfactante tween 80, y obtuvieron resultados entre 0.20 ± 0.01 y 0.55 ± 0.05.

Cuadro 3. Índice de polidispersidad de las emulsiones a base de aceite esencial de árbol de té, clavo y canela a diferentes tiempos.

Emulsión	Índice de polidispersidad		
	Días		
	0	14	28
TTO	0.21 ± 0.02^b	0.32 ± 0.02^a	0.32 ± 0.01^a
CLO	$0.57 \pm 4.46 \times 10^{-9}^a$	$0.57 \pm 9.99 \times 10^{-9}^a$	$0.57 \pm 8.24 \times 10^{-10}^a$
CO	$0.57 \pm 9.53 \times 10^{-11}^a$	$0.57 \pm 7.48 \times 10^{-9}^a$	$0.57 \pm 3.25 \times 10^{-9}^a$

TTO: Aceite de árbol de té; CLO: Aceite de clavo; CO: Aceite de canela. Los valores indican la media \pm desviación estándar. Literales iguales en el mismo renglón indican que no hay diferencias entre las medias de las emulsiones con respecto al tiempo n=3. (Tukey-Kramer; $p < 0,05$)

6.1.3. Potencial Zeta

El potencial zeta indica el potencial de carga en la interface de una suspensión coloidal, lo que nos permite evaluar su estabilidad física. Se considera que un potencial zeta superior a +30 mV o inferior a -30 mV indica una carga fuertemente catiónica o aniónica, respectivamente. Esto quiere decir que, cuanto mayor sea el valor absoluto del potencial zeta, mayor será la estabilidad de la emulsión (Rahman *et al.*, 2010; Clogston & Patri, 2011; Ramírez-Nieto *et al.*, 2019; y McClements, 2004). En el Cuadro 4 se pueden observar los resultados medidos con un equipo de dispersión dinámica de luz, durante los días 0, 14 y 28. La emulsión de canela mostró una disminución ($p < 0.05$) en el potencial zeta (de -43.85 ± 1.86 a -22.45 ± 0.71 mV) después del día 14, lo que sugiere una disminución en la estabilidad. En comparación, las emulsiones de árbol de té y clavo se mantuvieron más estables con menores fluctuaciones en el potencial zeta ($p > 0.05$). Estos resultados son consistentes con el estudio de Wei L. *et al.*, (2021) quienes trabajaron con combinaciones de diferentes aceites esenciales entre las cuales se encontraban trans-cinamaldehído (compuesto que se encuentra en la canela) y citral quienes mostraron resultados de potencial Z similares a los de este estudio con valores que oscilaban entre -25.3 a -42.7 mV, exhibiendo un alto potencial zeta negativo como el de nuestras formulaciones, este resultado podría estar relacionado con las interacciones fisicoquímicas que ocurren entre sus constituyentes.

Cuadro 4. Potencial zeta de las emulsiones a base de aceite esencial de árbol de té, clavo y canela a diferentes tiempos.

Emulsión	Potential Zeta (mV)		
	Días		
	0	14	28
TTO	-37.84 ± 4.32 ^{ab}	-47.41 ± 5.36 ^b	-32.82 ± 0.76 ^a
CLO	-39.85 ± 0.49 ^b	-40.99 ± 1.27 ^b	-30.52 ± 1.95 ^a
CO	-36.70 ± 1.30 ^b	-43.85 ± 1.86 ^c	-22.45 ± 0.71 ^a

TTO: Aceite de árbol de té; CLO: Aceite de clavo; CO: Aceite de canela. Los valores indican la media ± desviación estándar. Literales iguales en el mismo renglón indican que no hay diferencias entre las medias de las emulsiones con respecto al tiempo n=3. (Tukey-Kramer; p < 0,05).

6.2 Determinación de CMI y CMB

El Cuadro 5 nos muestra los datos de CMI y CMB de los aceites en su forma libre y en emulsión. Se observó que el aceite de clavo fue el que presentó mejor actividad antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, mientras que *S. Typhimurium* presentó mayor sensibilidad al aceite de canela. Por otro lado, la emulsión de canela tuvo mejor actividad contra *E. coli*, y *S. aureus*, y la de clavo contra *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*.

Cuadro 5. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los aceites esenciales libres de árbol de té, clavo y canela y en forma de emulsión.

AE Libre	Concentraciones (mg/mL)							
	<i>E. coli</i>		<i>S. Typhimurium.</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
CO	0.9	1.2	0.3	0.6	0.3	0.9	0.9	>0.9
CLO	0.3	0.6	> 0.3	0.6	0.3	0.9	0.3	1.5
TTO	1.1	1.2	> 0.9	1.2	0.9	1.5	0.9	1.5
Emulsión								
CO	0.95	0.95	0.9	0.9	0.6	0.7	0.8	1
CLO	0.9	1.5	0.6	0.7	0.7	0.8	0.7	0.9
TTO	1.1	1.5	1.5	1.6	2.3	2.5	2.5	2.8

AE: Aceite esencial; TTO: Aceite de árbol de té; CLO: Aceite de clavo; CO: Aceite de canela

Algunos autores atribuyen la actividad antibacteriana de los aceites esenciales a su componente mayoritario debido a su capacidad para alterar la integridad de la membrana celular y desnaturalizar proteínas esenciales (Park J-B, Kang J-H, Song KB, 2018). Por ejemplo, en el caso de la canela, es el cinamaldehído; en el clavo, el eugenol; y en el árbol de té, el terpineno-4-ol. Por otro lado, también se ha demostrado que otros compuestos presentes en estos aceites, aunque en menor concentración, pertenecientes a los grupos de terpenos, terpenoides, compuestos aromáticos y alifáticos, también pueden conferir actividad antibacteriana (sinérgica) al aceite esencial (Kumar *et al.*, 2019; Oussalah *et al.*, 2007; y Kennedy *et al.*, 2016). Algunos terpenos y terpenoides actúan como agentes bacteriostáticos al interferir con procesos metabólicos clave de las células bacterianas. Por otro lado, compuestos como los fenoles y alcoholes presentes en los aceites esenciales pueden tener propiedades bactericidas, causando daño directo a las membranas celulares bacterianas o interfiriendo con su capacidad para reproducirse. Con base a su composición, se ha hipotetizado que cada aceite puede contar con varios mecanismos de acción distintos para combatir a las bacterias, esto debido a que al ser una mezcla de compuestos cada uno puede actuar de forma distinta, por lo que, no se ha reconocido resistencia bacteriana a los aceites esenciales (Costa da silva, *et al.*, 2023).

Los aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té presentaron mayor actividad sobre *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, lo que concuerda con los estudios de; Raeisi, *et al.*, 2015; Oussalah, *et al.*, 2007 y Lopéz, *et al.*, 2017, y si bien algunos de estos estudios no se realizaron con las mismas metodologías, se observa la buena actividad antibacteriana por parte de estos aceites con CMI y CMB bajas en su forma libre y en emulsiones contra bacterias similares a este estudio (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* y *L.monocytogenes*).

En el estudio realizado por Navikaite-Snipaitiene, *et al.*, (2024) en el cual trabajan con emulsiones a base de aceite de clavo, eugenol y cinamaldehído inmovilizadas con octenil succinato de sodio de almidón, se reportaron valores de CMI y CMB cercanos a los de este estudio para las bacterias *E. coli* (0.50 y 1.00 mg/mL), *S. aureus* (0.50 y 4.00 mg/mL) y *L. monocytogenes* (0.5 y 0.2 mg/mL) lo que aumenta su validez y efectividad de nuestras emulsiones.

También observamos que se requiere de concentraciones ligeramente más altas de emulsiones que del aceite libre para inhibir el crecimiento de las bacterias a pesar de tener como base el mismo aceite. Existen estudios con resultados contradictorios en los cuales las emulsiones tienen mejor actividad en comparación con los aceites libres, por ejemplo, en el estudio de Dávila-Rodríguez *et*

al., (2020), donde para el aceite de canela se obtuvieron CMI y CMB de 1.2 y 1.2 (% v/v) para *L. monocytogenes*, y 1.0 y 1.0 (% v/v) para *E. coli* mientras que en su forma de emulsión 0.5 y 1.0 (% v/v) para *L. monocytogenes* y 0.2 y 0.8 (% v/v) para *E. coli*. Por lo tanto, estas diferencias podrían asociarse al grado de dispersión y encapsulamiento de los aceites en la emulsión, que pueden forzar a usar una mayor concentración de emulsión para igualar la actividad a aquella del aceite esencial puro. También podrían considerarse otros factores como el método de medición o el grado de homogeneidad de la muestra (Qiumin *et al.*, 2016).

6.3 Actividad Antimicrobiana de las Emulsiones Después de Haberse Sometido a Diferentes pH que Simulan a Aquellos del Tracto Gastrointestinal.

En la Figura 1 se presentan las curvas de crecimiento bacteriano de *E. coli* (A), *S. Typhimurium* (B), *S. aureus* (C) y *L. monocytogenes* (D) expuestas a los tratamientos de emulsiones a base de aceites esenciales, así como los controles positivos (kanamicina a 1 mg/mL) y negativo (sin agente antimicrobiano) sometidos a diferentes pH simulando a los del tracto gastrointestinal. En cada gráfico, la curva de color naranja representa el crecimiento natural bacteriano, que muestra un incremento significativo con valores de 0.8 para *E. coli* (A), 0.9 para *S. Typhimurium* (B), 1.2 para *S. aureus* (C) y 0.9 para *L. monocytogenes* (D), en ausencia de agentes antimicrobianos.

La línea azul corresponde al tratamiento con emulsión a base de canela, el cual inhibió completamente el crecimiento de las bacterias evaluadas ($p < 0.05$). En los cuatro casos, la curva se mantiene cercana a 0.0 a lo largo del ensayo, evidenciando la alta actividad antimicrobiana de la emulsión de canela.

En cuanto a la emulsión de clavo (línea roja), se observan altibajos en su actividad dependiendo de la bacteria con la que se exponía. Inhibió parcialmente a *E. coli* (A), con una fase estacionaria a una D.O. de 0.5, mientras que inhibía completamente a *S. Typhimurium* (B) y *S. aureus* (C) a una D.O. cercana a 0.0. Por otro lado, también inhibió parcialmente a *L. monocytogenes* (D) con una D.O. final de 0.7 ($p < 0.05$).

La emulsión a base de árbol de té (línea verde) inhibió parcialmente el crecimiento de las bacterias analizadas. Para *E. coli* (A) y *S. Typhimurium* (B), se observaron valores entre 0.4 y 0.5, indicando

una reducción significativa de crecimiento ($p < 0.05$), aunque no de inhibición total. Para *S. aureus* (C) y *L. monocytogenes* (D), también se observaron crecimientos parciales con D.Os. cercanas a 0.5.

Por último, kanamicina (línea morada) inhibió completamente el crecimiento de las bacterias evaluadas, con curvas que se mantienen cercanas a 0.0 durante todo el periodo experimental, confirmando la eficacia del antibiótico bajo las condiciones evaluadas.

En un estudio realizado por Liang D *et al.*, (2022), se evaluó el efecto antibacteriano de una emulsión basada en aceite esencial de canela contra *E. coli*, *S. aureus* y *S. Typhimurium*, y después de ser sometidas a una simulación gastrointestinal, reportaron valores de CMI y CMB entre 0.118 y 0.355 $\mu\text{g/mL}$, y 0.355 a 0.710 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Sin embargo, en el presente estudio se requirieron concentraciones que tendieron a ser menores para inhibir a estas bacterias, lo que demostró la preponderancia de nuestra formulación en términos de actividad antibacteriana. Por otro lado, Haro-González, *et al.*, (2023) trabajaron con emulsiones optimizadas a base de aceite de clavo, y reportaron valores de CMI y CMB similares a los de este estudio contra *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

En otro estudio realizado por, Li, X. *et al.*, (2023) reportaron que las emulsiones basadas en árbol de té mantenían su actividad antibacteriana después de ser sometidas a diferentes condiciones de pH (3.0, 5.0, 7.0, 9.0 y 11.0). Este comportamiento sugirió una notable estabilidad, lo cual es congruente con los resultados obtenidos en el presente estudio. Además, el uso del método de difusión en pozos de agar ha revelado que dichas emulsiones son muy activas tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Wei, S., *et al.*, 2021 & Malik, P. y Upadhyay, P., 2023), lo que coincidió con los resultados obtenidos en este estudio.

Debemos mencionar que existen muy pocos estudios que exponen emulsiones a base de aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té a distintos cambios de pH simulando condiciones gastrointestinales contra las cepas usadas en este trabajo. Se recomienda realizar estudios adicionales que nos permitan obtener más información sobre el comportamiento de las emulsiones sometidas a las condiciones mencionadas, porque nos pueden proporcionar información más precisa que nos permitan elaborar formulaciones que sea capaces de mantener su integridad estructural a las condiciones presentes en el sistema gastrointestinal y actuar con mayor eficacia en el sitio que demanda atención.

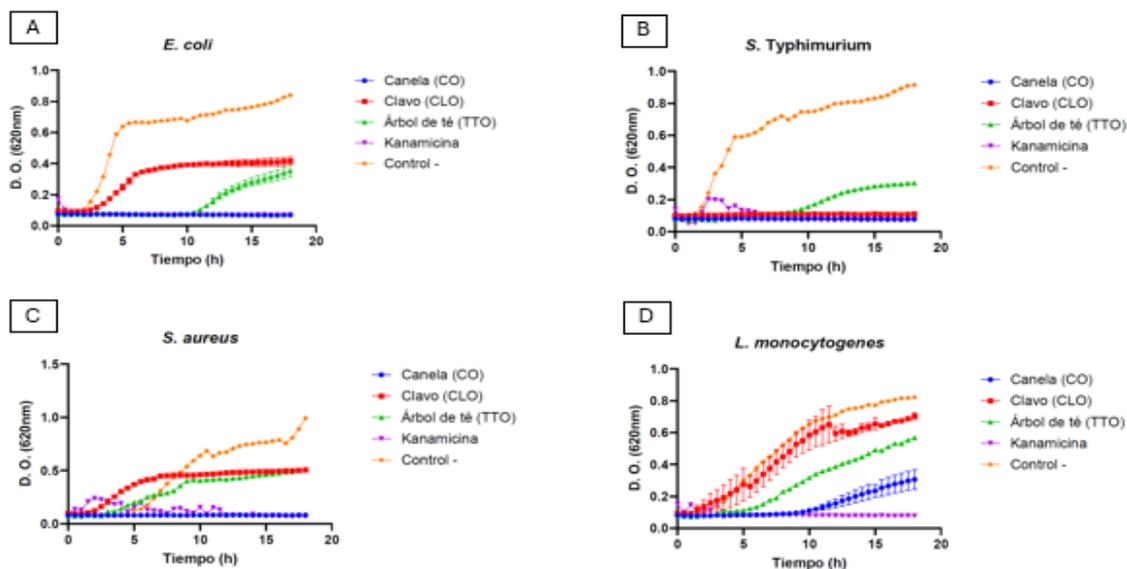


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* (A), *Salmonella Typhimurium* (B), *Staphylococcus aureus* (C) y *Listeria monocytogenes* (D) expuestas a las distintas emulsiones a base de aceite esencial de canela, clavo y árbol de té, después de ser sometidas a cambios de pH (3.0 a 7.0) que simulan a aquellos del tracto gastrointestinal. La curva de control negativo corresponde al desarrollo bacteriano en ausencia de tratamiento y el control positivo a la exposición con kanamicina a 1 mg/mL. Los datos se expresan como media \pm EE (n = 3).

7. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que las emulsiones a base de aceites esenciales de canela, clavo y árbol de té poseen propiedades fisicoquímicas estables y efectivas, y buena actividad antibacteriana antes y después de haber sido sometidas a diferentes pH simulando condiciones del tracto gastrointestinal. Las propiedades como el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y el potencial zeta fueron factores clave en la estabilidad de las emulsiones. También demostraron notable estabilidad frente los cambios de pH, manteniendo sus propiedades funcionales garantizando su efectividad. Las emulsiones de clavo y canela mostraron una mayor estabilidad a lo largo del tiempo en comparación con la emulsión de árbol de té. Además, las emulsiones demostraron tener buena actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, siendo especialmente destacables las formulaciones con aceites esenciales de canela, que inhibieron completamente el crecimiento de las bacterias analizadas. Los resultados subrayan el potencial de estas emulsiones como alternativas eficaces contra patógenos bacterianos, abriendo nuevas posibilidades para su aplicación en productos alimentarios o farmacéuticos que requieran estabilidad y actividad antimicrobiana bajo condiciones gastrointestinales. No obstante, estudios adicionales podrían centrarse en la optimización de estas formulaciones para mejorar aún más su estabilidad a largo plazo y explorar su actividad en sistemas biológicos complejos (*in vitro* e *in vivo*).

8. REFERENCIAS

- Abedon S., Kuhl S. J., Blasdel B. G. y Kutter E. 2011. Phage Treatment of Human Infections. *Bacteriophage*, U.S. National Library of Medicine. 1(2): 66–85.
- Aljazy N.A.S., y Abdulstar A.R. 2011. Potential effects of natural antioxidants in the treatment of some viral diseases. *Al-Qadisiyah Journal For Agriculture Sciences*, 11: 1-11.
- Andrés, A. (2019). Desarrollo de un sistema de digestión in vitro para la determinación de la bioaccesibilidad de componentes bioactivos (Trabajo fin de grado). Universidad Politècnica de València. Valencia, España.
- Archer J., Jervis E., Bird J. y Gaze J. 1998. Heat Resistance of Salmonella Weltevreden in Low-Moisture Environments. *Journal of Food Protection*, 61: 969-973.
- Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala M., Addi E., Casabianca H., Mousadik A., Hartmann D. Jilale A., Renaud F. y Elaissari A. 2015. Essential Oils: From Extraction to Encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 483: 220-43.
- Ayala, M. (2022). Péptidos antimicrobianos: Melitina (Trabajo fin de grado). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Balaban N., Helaine S. Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D. Brynildsen M., Bumann D., Camilli A., Collins J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J., Wolf-Dietrich H., Harms A., Heinemann M., Hung D., Jenal U., Levin B., Michiels J., Storz G., Man-Wah T., Tenson T., Melderer L. y Zinkernagel A. 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology* 17: 441-448.
- Bassanetti I., Carcelli M., Buschini A., Montalbano S., Leonardi G., Pelagatti P., Tosi G., Massi P., Fiorentini L. y Rogolino D. 2017. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. *Food Control*. 73: 606-612.
- Betancor L. 2023. Virus bacterianos para controlar infecciones. *Revista bordes*. 27: 2524-9290.
- Beuchat L, Komitopoulou E., Beckers H., Betts R., Bourdichon R., Fanning S., Joosten H. y Ter Kuile B. 2013. Low-Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*. 76: 150-172.
- Bilia A., Piazzini V., Guccione C., Risaliti L., Asprea M., Capecchi G. y Bergonzi M. 2017. Improving on Nature: The Role of Nanomedicine in the Development of Clinical Natural Drugs. *Planta Medica*. 83: 366-381.
- Blair, J., Webber M., Baylay A., Ogbolu D. y Piddock L. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 13: 42-51.
- Bravo M., Preston G., Van der Hoorn R., Townley H. y Thompson I. 2018. Species-Specific Antimicrobial Activity of Essential Oils and Enhancement by Encapsulation in Mesoporous Silica Nanoparticles. *Industrial Crops and Products*. 122: 582 – 590.
- Brodkorb A., Egger L., Alminger M., Alvito P., Assunção R., Ballance S., Bohn T., Bourlieu-Lacanal C., Boutrou R., Carrière F., Clemente A., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Edwards C., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka

- A., Mackie A., Martins C., Marze S. y Recio I. 2019. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*. 14: 991-1014.
- Bucur, F., Grigore-Gurgu L., Crauwels P., Riedel C. y Nicolau A. 2018. Resistance of *Listeria Monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and Food Processing Environments. *Frontiers*. 9.
- Campolo O., Giunti G., Laigle M., Michel T. y Palmeri V. 2020. Essential oil-based nano-emulsions: Effect of different surfactants, sonication and plant species on physicochemical characteristics. *Industrial Crops and Products*. 157: 112935.
- Cardoso-Ugarte G., Ramírez-Corona N., López-Malo A., Palou E., San Martín-González M., y Jiménez-Munguía, M. 2017. Modeling phase separation and droplet size of W/O emulsions with oregano essential oil as a function of its formulation and homogenization conditions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 39(7): 1065–1073.
- Cava-Roda R., Taboada-Rodríguez A., Valverde-Franco M. y Marín-Iniesta F. 2010. Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Food and bioprocess Technology*. 5: 2120-2131.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. (2021). *Escherichia coli* (*E. coli*). Recuperado de <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. (2021). *Salmonella*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
- Chongsrimisirisakhol O. y Pirak T. 2023. Polyphenol Release and Antioxidant Activity of the Encapsulated Antioxidant Crude Extract from Cold Brew Spent Coffee Grounds under Simulated Food Processes and an In Vitro Static Gastrointestinal Model. *Foods*, 12: 1000.
- Cisek A., Dąbrowska I., Gregorczyk K. y Wyżewski Z. 2017. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years after the Discovery of Bacteriophages - Current Microbiology. *SpringerLink*. 74: 277–283.
- Clogston J. & Patri A. 2011. Zeta Potential Measurement. In: McNeil, S. (eds) *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. 697: 63-70
- Coelho S., Estevinho B. y Rocha F. 2021. Encapsulation in the food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying: A review. *Food Chemistry*. 339: 127850.
- Costa da Silva M., Bezerra de Araújo J., Lucas A., Oliveira-Tintino C., Justino de Araújo A., Ramos P., Everson da Silva L., Amaral W., Deschamps C., Azevedo F., Gonçalves C., Golubkina N., Calixto-Júnior J., Ribeiro-Filho J., Douglas H., Caruso G. y Relison S. 2023. Antibiotic-Potentiating Activity of the *Schinus Terebinthifolius* Raddi Essential Oil against MDR Bacterial Strains. *MDPI*, 12: 1587.
- Dahlgren D., Venczel M., Ridoux J.-P., Skjöld C., Müllertz A., Holm R., Augustijns P., Hellström P.M. y Lennernäs H. 2021. Fasted and Fed State Human Duodenal Fluids: Characterization, Drug Solubility, and Comparison to Simulated Fluids and with Human Bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Elsevier. 163: 240-251.
- Dávila-Rodríguez M., López-Malo A., Palou E., Ramírez-Corona N., y Jiménez-Munguía M. T.

2020. Essential oils microemulsions prepared with high-frequency ultrasound: physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Food Science and Technology*. 57(11): 4133–4142.
- De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J., Massart S., Collini S., Pieraccini G. y Lionetti P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 14691-14696.
- De Sousa Barros A., De Morais S., Travassos P., Pinto I., Aragão A., Dos Santos R., Silva J., Ferreira F. y Araújo H. 2015. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*, 76: 557-564.
- De Waal T., Brouwers J., Berben P., Flanagan T., Tack J., Vandenberghe W., Vanuytsel T. y Augustijns P. 2023. Characterization of Aspirated Duodenal Fluids from Parkinson's Disease Patients. *Pharmaceutics*. 15(4): 1243.
- Donsi F., & Ferrari G. 2016. Nanoemulsions of essential oils as antimicrobial agents in foods. *Journal of Biotechnology*, 233: 106-120.
- Dressman J., Vertzoni M., Goumas K. y Reppas C. 2007. Estimating Drug Solubility in the Gastrointestinal Tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 591-602.
- Du F., Liao C., Yang Y., Yu C., Zhang X., Cheng X. y Zhang C. 2020. *Salmonella* enterica serovar Typhimurium gene sseK3 is required for intracellular proliferation and virulence”. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 84(4): 302-309.
- Garozzo A., Timpanaro R., Stivala A., Bisignano G. y Castro A. 2011. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. *Antiviral Research*, 89: 83-88.
- Giraldo A. Aristizábal-Suárez D., Diez-Valencia A., Tobón-Calle D. y Arias-Londoño A. (2020). Evaluación in vitro de la concentración inhibitoria mínima de varios agentes antimicrobianos solos y en combinación para el *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). (Tesis de grado). Universidad de Centros de Estudios en Salud. Colombia, Medellín.
- Goñi, M., Roura S., Ponce A. y Moreira M. 2016. Chapter 39 - Clove (*Syzygium aromaticum*) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier. 349-357.
- González, R. (2016). Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro (Tesis de doctorado). *Revista Doctorado UMH*. Valenciana, España.
- González-González N., Guerrero-Encinas I., Acuña-Juanz A., González-Aguilar G., Ayala-Zavala J., Astiazarán-García H., López-Mata M., Lizardi-Mendoza J., Pérez-Morales R. y Quihui-Cota L. 2024. Microemulsions of clove, tea tree and cinnamon using different tweens: physical properties and antimicrobial activity against *E. coli* O157:H7. *Journal of Food Science and Technology*.
- Haro-González J., Schlienger de Alba B., Martínez-Velázquez M., Castillo-Herrera G. y Espinosa-Andrews H. 2023. Optimization of Clove Oil Nanoemulsions: Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, and Anticancer Properties. *Colloids and Interfaces*. 7(4): 64.
- Jácome C., Altuna J., Castillo D., Camacho D. y León D. 2023. Uso de probióticos en función de mejorar actividad inmunitaria y digestiva. *Revista latinoamericana de ciencias sociales y humanidades*. 4(1):3658–3669.

- Jiménez M., Dominguez J., Pascual-Pineda L., Azura E. y Beristáin C. 2018. Elaboration and characterization of O/W cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and black pepper (*Piper nigrum*) emulsions. *Food Hydrocolloids*. 77: 902-910.
- Kennedy D., Lupattelli A., Koren G. y Nordeng H. 2016. Safety classification of herbal medicines used in pregnancy in a multinational study. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 16:1-9.
- Kumar, S., Kumari, R., & Mishra, S. 2019. Pharmacological properties and medicinal uses of *Cinnamomum*: A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71: 1735-1761.
- Li X., Liu Y., Chen F., Liu L. y Fan Y. 2023. Facile modification of nanochitin in aqueous media for stabilizing tea tree oil-based Pickering emulsion with prolonged antibacterial performance. *International Journal of Biological Macromolecules*. 242(3): 124873.
- Liang D., Feng B., Li N., Su L., Wang Z., Kong F. y Bi Y. 2022. Preparation, characterization, and biological activity of *Cinnamomum cassia* essential oil nano-emulsion. *Ultrasonics Sonochemistry*. 86:106009.
- Liao T., Hamosh P. y Hamosh M. 1983. Gastric lipolysis in the developing rat. Ontogeny of the lipases active in the stomach". *Biochim Biophys Acta*, 754(1): 1-9.
- Lima, G., Ramos-Alves, M., y Soares, A. 2019. From psychiatric disorders to antibiotic therapy: repositioning of chlorpromazine as an antibacterial agent. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*. 48: 5-28.
- López-Mata M., Valbuena-Gregorio E., Quihui-Cota L., Morales-Figueroa G., Ruiz-Cruz S., Campos-García J., Díaz-Meza E. y Pablos-Rodríguez D. 2017. Efecto de Microemulsiones de Aceites Esenciales Sobre el Eritrocito Humano y Bacterias Patógenas. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*. 38: 247-254.
- Loureiro R., Roque F., Rodrigues A., Herdeiro M. y Ramalheira E. 2016. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: Breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 34: 77-84.
- Malik P. y Upadhyay P. 2023. Formulation and Evaluation of Tea tree/ Rosemary Essential oil-based Microemulsion for Antimicrobial Activity. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 20(1): 229-239.
- Mann B., Singh R., Athira S., Kumar R., y Sharma R. 2022. Chapter 7 - Chemistry and functionality of clove oil nanoemulsions. Elsevier. 81-101.
- Marfisi, S. (2005). Estabilidad de emulsiones relacionada con el proceso de deshidratación de crudos (Tesis de doctorado). Universidad de los Andes, Merida, Venezuela.
- Martínez D. 2021. Caracterización de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Escherichia coli* aisladas de humanos y cerdos (Tesis de grado). Facultad De Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Del Estado De Morelos.
- McClements, D. 2004. *Food Emulsions*. Taylor & Francis. 2nd Edition. Boca Raton. 632.
- Minekus M., Alminger M., Alvito P., Ballance S., Bohn T. Bourlieu C., Carrière F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Egger L., Golding M., Karakay S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A., Marze S., McClements D., Ménard O., Recio I., Santos C., Singh R., Vegarud G., Wickham M., Weitschies W. y Brodtkorb A. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus.

Food & Function. 5: 1113-1124.

- Molet-Rodríguez A., Torcello-Gómez A., Salvia-Trujillo L., Martín-Belloso O. y Mackie A. 2023. In vitro digestibility of O/W emulsions co-ingested with complex meals: Influence of the food matrix. *Food Hydrocolloids*. 135: 108121.
- Moreno del Castillo M., Valladares-García J. y Halabe-Cherem J. 2018. Microbioma Humano.” *Revista De La Facultad De Medicina (México)*. 61: 7-19.
- Mulet-Cabero A., Egger L., Portmann R., Ménard O., Marze S., Minekus M., Le Feunteun S., Sarkar A., Grundy M., Carrière F., Golding M., Dupont D., Recio I., Brodkorb A. y Mackie A. 2020. A standardised semi-dynamic: In vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food & Function*, 11(2): 1702-1720.
- Nabavi S., Di Lorenzo A., Izadi M., Sobarzo-Sánchez E., Daglia M. y Mohammad S. 2015. Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*. 7: 7729-7748.
- Naissinger da Silva M., Lago B., Amaral V. y Pereira N. 2021. In vitro test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Current Research in Food Science*. 4:320-325.
- Navikaite-Snipaitiene V., Spirikavice K., Siugzdaite J., Grigonyte E. y Rutkaite R. 2024. Preparation and Biological Activity Studies of Octenyl Succinic Anhydride Starch-Based Emulsions Containing Natural Essential Oils and Their Components. *Applied sciences*. 14(10): 4050.
- OMS. 2017. La OMS publica la lista de bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos Antibióticos. World Health Organization, World Health Organization. www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed#:~:text=Entre%20tales%20bacterias%20se%20incluyen,la%20corriente%20sangu%C3%ADnea%20y%20neumon%C3%ADas.
- OMS. 2020. Resistencia a los Antibióticos. World Health Organization, World Health Organization. www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos.
- OPS. 2021. Patógenos Multirresistentes que son prioritarios para la OMS. OPS/OMS | Organización Panamericana De La Salud, Mar. www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms
- Osek J., Lachtara B. y Wieczorek K. 2022. *Listeria Monocytogenes* – How This Pathogen Survives in Food-Production Environments? *Frontiers*. 13.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. y Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18(5):414-420.
- Park JB., Kang JH. y Song K.B. 2018. Antibacterial activities of a cinnamon essential oil with cetylpyridinium chloride emulsion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in basil leaves. *Food Science and Biotechnology* 27:47.
- Park M., Horn L., Lappi V., Boxrud D., Hedberg C. y Jeon B. 2022. Antimicrobial Synergy between Aminoglycosides and Licorice Extract in *Listeria Monocytogenes*. *Pathogens*.

11(4): 440.

- Pasachova J., Ramírez S. y Muñoz L. 2019. *Staphylococcus aureus*: Generalidades, Mecanismos De Patogenicidad y Colonización Celular. Nova. 17: 25-38.
- Pérez E. y Rivas A. 2021. Evaluación de la actividad bactericida de un antimicrobiano de origen natural. Artículo Docente. Universitat Politècnica de València.
- Qiumin M., Davidson P. y Zhong Q. 2016. Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. International Journal of Food Microbiology. 226:20-25.
- Raeisi M., Tajik H., Yarahmadi A. y Sanginabadi S. 2015. Antimicrobial Effect of Cinnamon Essential Oil Against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus*. Health Scope. 4(4):21808.
- Rahman Z., Zidan A., Habib M. y Khan M. 2010. Understanding the quality of protein loaded PLGA nanoparticles variability by Plackett – Burman design”, Int. J. Pharm., 389(1-2): 186-94.
- Ramírez L. y Marin D. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica. 42: 263-268.
- Ramírez-Nieto N., Baena Y. y Osorio C. 2019. Physicochemical Characterization of O/W Emulsions from Goldenberry (*Physalis peruviana*) as an Ingredient for Food Industry. Información tecnológica, 30(3): 147-156.
- Ranjan A., Shaik S., Nandanwar N., Hussain A., Tiwari S., Semmler T., Jadhav S., Wieler L., Alam M., Colwell R. y Ahmed N. 2017. Comparative Genomics of *Escherichia Coli* Isolated from Skin and Soft Tissue and Other Extraintestinal Infections. MBio. 15: 01070-17.
- Rivas, E. (2014). Desarrollo de un prototipo simulador del tracto gastrointestinal mediante reactores químicos automatizados (Tesis Doctoral). Universidad de Málaga.
- Safaei-Ghomi J. y Atefeh A. 2010. Antimicrobial and Antifungal Properties of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Eucalyptus Largiflorens* and *Eucalyptus Intertexta*. Pharmacognosy. 6: 172-175.
- Santillana S., Frank J. y Schaffner D. 2013. Modeling the Influence of Temperature, Water Activity and Water Mobility on the Persistence of *Salmonella* in Low-Moisture Foods. International Journal of Food Microbiology. 166: 280-293.
- Shi F., Zhao J., Liu Y., Wang Z., Zhang Y. y Feng N. 2012. Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Frankincense and Myrrh Oil. International Journal of Nanomedicine. 7: 2033–2043.
- Sibanda T., y Elna M. 2022. *Listeria Monocytogenes* Pathogenesis: The Role of Stress Adaptation. Microorganisms. 10(8): 1522.
- Silletti E., Vingerhoeds M., Norde W. y Van Aken G. The role of electrostatics in saliva-induced emulsion flocculation. Food Hydrocolloids, 21(4): 596-606.
- Tadros TF. 2013. Emulsion formation and stability. Wiley
- Tamargo A., Gil-Sánchez I., Miralles B., Martín D., García-Risco M., Fornari T., Bartolomé B., Moreno-Arribas M. y Cueva C. 2017. Simulador gastrointestinal dinámico (simgi®): una herramienta potencialmente útil en nutrición clínica. ” Nutrición Hospitalaria, 34(6): 1489-

1496.

- Téllez, A. (2020). Actividad antibacteriana de dos extractos comerciales de plantas (cítricos y canela) contra cepas de *Acinetobacter baumannii* y *Salmonella Typhimurium* (Tesis de grado). Facultad De Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Del Estado De Morelos.
- Tong S., Davis J., Eichenberger E., Holland T. y Fowler V. 2015. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(3): 603-63.
- Tso P. y Thomson A. 2000. Overview of digestion and absorption. In K. D. Crissinger y M. H. Stipanuk (Eds.). *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. 75–90 pp.
- Wang C., Yu Z., Shi X., Tang X., Wang Y., Wang X., An Y., Li S., Li Y., Wang X., Luan W., Chen Z., Liu M. y Yu L. 2018. Triclosan Enhances the Clearing of Pathogenic Intracellular Salmonella or Candida Albicans but Disturbs the Intestinal Microbiota through Mtor-Independent Autophagy. *Frontiers*. 8.
- Wei L. Dumas E., Ghnim, Elaissari A. y Gharsallaoui A. 2021. Effect of emulsifier and droplet size on the antibacterial properties of emulsions and emulsion-based films containing essential oil compounds. *Food Processing and Preservation*. 45(12): 16072
- Wei S., Zhao X., Yu J., Yin S., Liu M., Bo R. y Li J. 2021. Characterization of tea tree oil nanoemulsion and its acute and subchronic toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 124: 104999.
- Wells J., Brummer R., Derrien M, MacDonald T., Troost F., Cani P., Theodorou V., Dekker J., Méheust A., De Vos W., Mercenier A., Nauta A. y Garcia-Rodenas C. 2017. Homeostasis of the Gut Barrier and Potential Biomarkers. *American Journal of Physiology*. 312(3): 171-193.
- Wright G. 2016. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends in Microbiology*. 24: 862- 871
- Wulff-Pérez M., Torcello-Gómez A., Gálvez-Ruíz M. y Martín-Rodríguez A. 2009. Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. *Food Hydrocolloids*. 23(4): 1096-1102.
- Yazgan H. 2020. Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. *LWT*. 130: 109669.
- Yeon-Ji J., Ji-Yeon C., Yun-Joong K., Sang-Gi M., Geun-Pyo H. y Mi-Jung C. 2015. Physical and antimicrobial properties of transcinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. *Journal of Food Science and Technology*. 60: 444–451.
- Yoo J., Baek K., Heo Y., Yong H. y Jo C. 2020. Synergistic bactericidal effect of encapsulated clove oil and atmospheric pressure plasma against *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* and its mechanism of action. *Food Microbiology*. 93: 103611.
- Zou Y., Zhang s., Liu Y., Liu Y., Yu J. y Fan Y. 2023. In vitro digestion properties of different chitin nanofibrils stabilized lipid emulsions. *Food Hydrocolloids*. 139: 108512.