

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**Evaluación del Efecto de Microemulsiones de Aceites  
Esenciales de Romero y Árbol de Té Sobre el Eritrocito  
Humano y Microorganismos de Interés Clínico**



**TESIS PROFESIONAL**

Que para obtener el Título de

TODOS · LO · ILUMINAN

**QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

Presentan:

**Diana Erika Pablos Rodríguez  
Estivaliz Díaz Meza**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Diana Erika Pablos Rodríguez y Estivaliz Díaz Meza** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de **Químico Biólogo Clínico**.

Atentamente:

---

Dr. Marco Antonio López Mata  
Director de Tesis

---

Dra. Luz Angélica Ávila Villa  
Secretario

---

Dr. Julio Cesar Campos García  
Vocal

---

Dra. María del Rosario Martínez Macías  
Suplente

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por estar siempre a mi lado y no dejarme vencer, por guiarme por el camino correcto de esfuerzo y dedicación para alcanzar mis metas.

A la Universidad de Sonora, por ser la pieza fundamental en mi formación académica y darme la oportunidad de ser parte de su grandeza.

Dr. Marco Antonio López Mata, sin su apoyo, paciencia (sobre todo paciencia), y confianza, esto no sería posible ¡Muchas Gracias!

A mis maestros, por brindarme sus conocimientos no solo a nivel académico, sino también a nivel persona.

Al Instituto Tecnológico de Sonora y Dr. Saúl Ruiz Cruz por brindar su apoyo incondicional.

Al Hospital General de Sonora y a las personas que en laboran, por el apoyo proporcionado que ayudo a la realización de este trabajo.

A mis compañeros, porque compartimos una misma meta y por los buenos y malos momentos que pasamos juntos, pero que me ayudaron a crecer como persona.

Q.B.C. Diana Erika Pablos Rodríguez, mi compañera de tesis, amiga, hermana (porque los amigos son la familia que se elige)... muchas gracias, sin ti esto simplemente no sería lo que es y no hubiera disfrutado cada uno de los pasos que dimos juntas por este largo camino. ¡Te quiero mucho!

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron para que esto fuera posible.

***Estivaliz Díaz Meza***

## DEDICATORIAS

A mis padres, por su apoyo incondicional, su confianza, su amor y consejo, ustedes me brindaron la seguridad en mi misma para poder lograr lo que me proponga y seguir adelante hasta alcanzar cada una mis metas. Los amo.

A mis hermanas, por siempre estar a mi lado para apoyarme y no dejarme llorar; por sus consejos y sus enseñanzas; mis maestras particulares, las mejores. Las amo.

A mis sobrinos, su cariño y su hermosa sonrisa me hace seguir adelante. Los amo.

A mis abuelos que ya no están físicamente conmigo, pero que siempre estarás en mi corazón, y mi abuela Consuelo a quien tengo aquí conmigo y agradezco su inmensa confianza en mí. Los amo.

***Estívaliz Díaz Meza***

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por prestarme vida y salud para poder culminar una etapa más en mi vida, por abrir las puertas justo en el momento preciso y por darme una familia maravillosa.

Al Dr. Marco Antonio López Mata, por haber confiado en mí, por sus consejos, su tiempo, su sabiduría y por saber guiarnos para poder sacar adelante este proyecto.

A mi alma mater por abrirnos sus puertas cuando nadie lo esperaba, por confiar en Cajeme y por su compromiso ante la sociedad de preparar profesionistas.

A mis maestros, gracias por compartir sus conocimientos, por su paciencia y entrega en cada clase, gracias por alimentar mi amor a la ciencia.

Al Instituto Tecnológico de Sonora en especial al Dr. Saúl Ruiz Cruz y al Hospital General de Obregón por su confianza y por dejarnos llevar a cabo en sus instalaciones parte de nuestro proyecto.

Al personal técnico de la Universidad de Sonora campus Cajeme, por su tiempo, paciencia y por todas las facilidades otorgadas a lo largo de este proyecto.

A Estívaliz, mi amiga, confidente, compañera, y hermana por elección. Doy gracias a Dios por haberme dado la oportunidad de compartir esta experiencia contigo, porque creíste y confiaste en mí, y porque sin ti, los momentos de estudio no hubieran sido tan divertidos. ¡Te quiero!

***Diana Erika Pablos Rodríguez***

## DEDICATORIAS

A mis padres, por confiar en mí, por ser mi ejemplo, mis guías, por inculcarme valores, por consentirme y amarme, por aconsejarme y porque gracias a su apoyo y sacrificios hoy cumplo uno más de mis objetivos. ¡Los amo!

Al mejor regalo que mis padres pudieron haberme dado, mi hermano Daniel, gracias por dar a mis días alegrías, enojos y esos sentimientos que solo tú podrías provocar. ¡Te amo hermano!

A mi familia por estar siempre conmigo, a mi tía Ana por auxiliarme cada que lo necesito, a mi tía Adriana por ser mi segunda madre, a mis tíos, primos y abuelos que compartieron mi sueño desde el principio, a Hernán por acompañarme en todo momento, por demostrarme su cariño y apoyo incondicional.

A mis compañeros, que hoy forman parte de mi vida, con quienes compartí sueños, fiestas, alegrías, tristezas, logros y viajes, siempre en mi corazón 1<sup>ra</sup> Generación QBC.

***Diana Erika Pablos Rodríguez***

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
OBJETIVOS.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Particulares.....	15
REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	16
Orígenes de los Aceites Esenciales y las Emulsiones.....	16
Emulsiones.....	18
Uso y Aplicaciones de Aceites Esenciales en la Conservación de Alimentos.....	19
Uso y Aplicaciones de Aceites Esenciales en la Salud.....	21
Aceite de Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ).....	23
Aceite de Árbol de Té ( <i>Melaleuca alternifolia</i> ).....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Preparación de las Microemulsiones.....	27
Prueba de Porcentaje de Hemólisis.....	28
Prueba de Porcentaje de Inhibición de Hemólisis.....	29
Determinación del Tamaño de las Micelas.....	31
Actividad Antibacteriana.....	31
Propiedades Ópticas (Color).....	33
Análisis Estadístico.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
Prueba de Porcentaje de Hemólisis.....	35
Prueba de Porcentaje de Inhibición de Hemólisis.....	38
Determinación del Tamaño de las Micelas.....	40
Actividad Antibacteriana.....	43
Propiedades Ópticas (Color).....	45
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

ANEXOS.....	58
-------------	----

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Selección de especies, hierbas y condimentos con efecto antibacteriano.....	19
2	Propiedades de algunos aceites esenciales.....	21
3	Principales componentes del aceite esencial de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )....	24
4	Principales componentes del aceite esencial de árbol de té ( <i>Melaleuca alternifolia</i> )	26
5	Actividad antibacteriana de las microemulsiones estudiada.....	43

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ).....	24
2	Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de árbol de té ( <i>Melaleuca alternifolia</i> ).....	26
3	Diagrama general de la preparación de las emulsiones.....	27
4	Diagrama para la prueba de porcentaje de hemólisis.....	29
5	Diagrama para la prueba de porcentaje de inhibición de hemólisis.....	30
6	Diagrama para la determinación del tamaño de micelas.....	31
7	Diagrama de método de difusión en agar.....	32
8	Espacios de color CIE ( $L^*$ $a^*$ y $b^*$ ).....	33
9	Efecto de las microemulsiones a diversas concentraciones de TO sobre la célula eritrocitaria.....	36
10	Efecto de las microemulsiones a diversas concentraciones de RO sobre la célula eritrocitaria.....	37
11	Porcentaje de inhibición de hemólisis del aceite de árbol de té (TO) y romero (RO).....	39
12	Porcentaje de la distribución de tamaños de micelas en diferentes concentraciones de aceite esencial de romero.....	40
13	Microemulsiones de aceite de romero vistas en microscopio a 40x.....	41
14	Porcentaje de la distribución de tamaños de micelas en diferentes concentraciones de aceite esencial de árbol de té.....	42
15	Microemulsiones de aceite de árbol de té vistas en microscopio a 40x.....	42
16	Actividad antibacteriana producida por las microemulsiones de aceite esencial de árbol de té sobre <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	44
17	Actividad antibacteriana producida por las microemulsiones de aceite esencial de romero sobre <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	45
18	Diferentes concentraciones de microemulsiones de aceite esencial de romero...	46
19	Diferentes concentraciones de microemulsiones de aceite esencial de árbol de té	46

20	Parámetros de color de $L^*$ .....	47
21	Parámetros de color de $a^*$ .....	48
22	Parámetros de color de $b^*$ .....	49

## RESUMEN

A los aceites esenciales de romero y árbol de té, se le han atribuido importantes propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Pero su naturaleza hidrofóbica e inestabilidad química (volátil, fotosensible y oxidación atmosférica) han sido limitantes importantes en sus usos y aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Por esos motivos, actualmente se ha impulsado la búsqueda de nuevas tecnologías de conservación de sus propiedades en diversos tipos de materiales y sistemas, como las emulsiones. En el presente trabajo se evaluó el efecto de microemulsiones de aceite esencial de romero y árbol de té sobre el eritrocito y microorganismos de interés clínico. Se valoraron las microemulsiones de aceites esenciales de árbol de té (TO) y romero (RO) a 8.0% (v/v), 5.0% (v/v) y 2.5% (v/v). Las emulsiones fueron evaluadas mediante su porcentaje hemólisis y el porcentaje de inhibición de hemólisis, actividad antibacteriana contra *E. coli* O157:H7 (ATCC43890) y *S. aureus* (ATCC9144). Además de las propiedades físicas de color  $L^*a^*b^*$  y el tamaño de cada una de las microemulsiones utilizadas. Las microemulsiones con TO (5.0 y 8.0 %) fueron las que presentaron una mayor actividad hemolítica ( $\approx 70$  %), siendo las microemulsiones de RO las que presentaron el menor daño y fue la del 2.5 %. También se observó que las microemulsiones con RO fueron las más efectivas en proteger al eritrocito contra la presencia de radicales libre, comparada con TO ( $p < 0.05$ ). Con respecto al tamaño en diámetro promedio fue de 35  $\mu\text{m}$  y el color fue con una blancura variable, con tendencia a la coloración amarilla. Los efectos antibacterianos tanto para *E. coli*O157:H7 (ATCC 43890) y *S. aureus* (ATCC 9144) se observaron para las microemulsiones con TO al 8.0 %, mientras que para RO 8.0 % se observó solo efecto para *E. coli* O157:H7. Las emulsiones RO fueron las más efectivas para proteger al eritrocito, pero la menos efectiva como antibacteriana.

## INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son las partes líquidas volátiles e insolubles, que son responsables del aroma de las plantas (Martínez, 2001). Estos aceites son una mezcla de sustancias químicas complejas con un perfil fuertemente aromático (Ortuño, 2006). Los aceites esenciales y sus extractos, han sido principalmente utilizados por la medicina popular. Aunque actualmente la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria han aumentado su interés por este tipo de productos naturales (Farah y col., 2008).

Las principales limitantes en el uso y aplicación de los aceites esenciales, debido a su naturaleza generalmente fotosensible, volátil e hidrofóbica, ha desencadenado la búsqueda de nuevos sistemas de conservación. Uno de los sistemas a los que se le han puesto atención son los sistemas de encapsulación por emulsión. El objetivo de una emulsión es lograr que los compuestos de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica puedan coexistir de manera más estable. Las mezclas entre sustancias acuosas y oleosas, es donde mayormente se aplica la formación de emulsiones (Heinzl y col., 2012).

Una gran ventaja que poseen los aceites esenciales, es que pueden ser obtenidos de materiales vegetales, los cuales se han consumido históricamente como alimentos y como tal, tienen demostrada una supuesta inocuidad en humanos. Por ejemplo, los aceites esenciales ricos en terpenos y compuestos fenólicos, poseen actividad antioxidante y actividad antimicrobiana alta. Algunos de los aceites esenciales con estas propiedades incluyen a los extraídos de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) (Castaño, 2012).

En la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria el uso de los aceites esenciales para fines y aplicaciones diversas se ha complicado, por su elevada volatilidad a temperatura ambiente, la sensibilidad a la luz, al oxígeno atmosférico y su insolubilidad en agua. Además de las posibles interacciones que pudiera presentar, con otros componentes moleculares durante su aplicación. Por esos motivos, es importante buscar alternativas, como la formación de microemulsiones, que nos ayuden conservar las propiedades del árbol de té y romero y evaluar el efecto de sus posibles aplicaciones en la salud humana.

Sin embargo, también es necesario demostrar que los aceites de romero y árbol de té en forma de microemulsiones, pueden ser una alternativa inocua para las células humanas, pero efectiva contra microorganismos patógenos. Por lo anterior, es importante evaluar el comportamiento de estas microemulsiones en base a sus propiedades físicas (tamaño, índice de blancura y estabilidad de la emulsión), hemolítica, como protector del eritrocito y antibacterial. Se considera que este estudio generará conocimiento básico al aplicarse como un modelo de conservación y transporte de compuestos bioactivos. Así como para entender el efecto de los aceites de romero y árbol de té microemulsionados, sobre las células humanas y los microorganismos de interés clínico.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto de microemulsiones de aceite esencial de romero y árbol de té sobre el eritrocito y microorganismos de interés clínico.

### **Objetivos Particulares**

1. Caracterizar microscópicamente los tamaños de las microemulsiones de árbol de té y romero.
2. Determinar el porcentaje de hemólisis de las microemulsiones de los aceites de árbol de té y romero en diversas concentraciones.
3. Determinar el porcentaje de inhibición de hemólisis de las microemulsiones de los aceites de árbol de té y romero.
4. Determinar la actividad antibacteriana (*S. aureus* y *E. coli*O157:H7) de las microemulsiones de los aceites de árbol de té y romero.

## REVISIÓN DE LA LITERATURA

### Orígenes de los Aceites Esenciales y las Emulsiones

Los aceites esenciales de las plantas han sido utilizados desde la antigüedad en una gran cantidad de aplicaciones, tales como perfumes, cosméticos, ambientadores, medicinas, alimentos, entre otros. Se tienen evidencias de manuscritos de diferentes civilizaciones como la egipcia y los chinos, así como también alrededor de 200 citas bíblicas relacionadas con estos aceites esenciales y sus aportaciones a la vida de la población de aquella época (Ortuño, 2006).

La civilización egipcia fue la primera cultura, que dejó evidencia suficiente sobre la extracción de aceites esenciales, mediante un proceso de destilación, los cuales eran utilizados para fines medicinales, cosmética y para rituales religiosos. En base a los conocimientos aportados por los egipcios, los griegos mejoraron el sistema de destilación, pues para ellos, los aceites esenciales eran una forma de vida ya que los añadían en alimentos, a sus baños, ritos y magia. En el siglo XI, los árabes introdujeron el sistema de refrigeración al proceso de destilación, dando como resultado aceites esenciales con mayor pureza (Plazas, 2011).

Entre los siglos XVI y XVII fueron los años de mayor auge en la obtención de aceites esenciales, ya que en estos siglos se prepararon la gran mayoría de los aceites esenciales que se utilizan en la actualidad. Aunque su aplicación venía siendo bien aceptada por la medicina tradicional, la llegada de la medicina moderna y de la implementación de vacunas y antibióticos, los remedios tradicionales y naturales en los que se empleaban los aceites esenciales, fueron sustituidos y en algunos casos se dejaron en el olvido. Así que, fue hasta el siglo XIX, que los aceites esenciales volvieron a tener gran demanda en sus diferentes ámbitos, por lo que su estudio se hizo más frecuente e importante (Ortuño, 2006).

En los últimos años las plantas medicinales han adquirido gran importancia en terapias alternativas o complementarias en varias regiones del mundo (Avila-Sosa y col., 2011). Muchos de los aceites que existen en la actualidad se sabe que poseen propiedades antisépticas, es

decir, propiedades antimicrobianas, bactericidas, antivirales, fungicidas y otras propiedades medicinales no asociadas con microorganismos (Aboizeid y col., 2013).

Por su naturaleza química, los aceites esenciales son normalmente volátiles a temperatura ambiente, por lo tanto, si se desea trabajar con ellos, es muy importante conocer su concentración efectiva, para de esta forma minimizar su capacidad de evaporarse, al mismo tiempo generar una sistema de protección al aceite contra las temperaturas altas, la oxidación y la luz ultravioleta, ya que esto reduce su calidad y efectividad, dependiendo de su uso (Rodríguez y col., 2012). Un método que se ha utilizado para la conservación de aceites han sido las emulsiones.

Las emulsiones datan de 1878, desde esa fecha, Johannes Gad observó que soluciones de ácido láurico podían mezclarse ligeramente en una fase acuosa y sin ayuda mecánica, la cual fue registrada como una emulsión espontanea. En 1888 Quincke, sugirió que la formación de emulsiones espontaneas se daba debido a que había un cambio en el gradiente de tensión de las interfaces, debido a una distribución no uniforme de las moléculas. En 1927 se reportó por vez primera el uso de la energía de ultrasonido para la formación de emulsiones, y se observó que existían diversos mecanismos de formación de micelas que podría aplicarse (López-Montillo y col., 2002). Pese a esto, no se ha encontrado información suficiente sobre el origen de las emulsiones formadas con ayuda de energía mecánica y del uso de tensoactivos.

Sin embargo, se considera que la limitación en la aplicación de los aceites esenciales es su naturaleza hidrofóbica, es por eso que se ha buscado un camino alternativo como son las emulsiones, ya que estos sistemas pueden ayudar a mantener estables compuestos bioactivos de naturaleza hidrofóbica, además la preparación es relativamente fácil y proporcionan una mejor solubilidad en soluciones acuosas (Kim y col., 2009).

## Emulsiones

Las emulsiones son consideradas un sistema, que está compuesto como mínimo por dos fases líquidas inmiscibles, donde una de las fases está dispersa en la otra (Landfester, 2003). La estabilidad de la emulsión de ambas fases puede originarse por la adición de surfactantes o tensoactivos (agente químico que permite la convivencia de dos sustancias inmiscibles) idóneo, mismo que generan estabilidad electrostática o estérica de las micelas. Las micelas son consideradas polímeros de asociación, donde un surfactante empleado llega a alcanzar una posición propicia. El efecto hidrófobo es la principal fuerza motriz que ayuda a la formación de las micelas, este efecto es generado por la sustracción de la zona apolar del surfactante que tiene contacto con las moléculas de agua (Salager, 1992).

Para crear una emulsión muy estable de gotas o micelas se requiere de energía mecánica (López-Montilla y col., 2002) y se debe de buscar la estabilización de las gotitas contra la maduración de Ostwal o degradación de difusión molecular. Este proceso unimolecular contra la fusión por colisión, puede transformarse en un proceso bimolecular mediante la adición de un surfactante (Landfester, 2003).

Existen dos términos empleados para referirse a la formación de emulsiones. El primero de los términos es “emulsificación espontánea” mismo que hace referencia al hecho de que dos líquidos inmiscibles tengan contacto y formen una emulsión sin recibir ayuda de ningún tipo de energía mecánica de fuente externa, sin embargo este tipo de emulsión no tiene un tiempo definido de formación, ya que puede tardar desde unos pocos minutos hasta varios días. La otra forma de llamar a la formación de las emulsiones es la “autoemulsificación”, la cual se refiere a la formación de emulsiones con ayuda del uso de surfactante, y aunque el término utiliza el prefijo “auto” realmente recibe ayuda de algún tipo de energía mecánica, misma que puede ser agitación, vibración, mezcla, entre otros (López-Montilla y col., 2002).

## Uso y Aplicaciones de Aceites Esenciales en la Conservación de Alimentos

Gran cantidad de aceites esenciales han sido utilizados en la industria alimentaria como saborizantes para realzar el sabor del platillo, y también como bioconservadores (Tabla 1). Esto último, para aumentar la vida útil de los alimentos, por medio de la disminución o erradicación de bacterias patógenas. Además, se han utilizan también como inhibidores de la oxidación de los alimentos, basados en la capacidad antioxidante presente en algunos aceites esenciales (Ojeda-Sana y col., 2012).

Tabla 1. Selección de especies, hierbas y condimentos con efecto antibacteriano.

Nombre común	Nombre científico
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>
Laurel	<i>Laurus nobilis</i>
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>
Canela	<i>Cinnamomun zeylanicum</i>
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>
Te-limón	<i>Cymbopogon citratus</i>
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>
Menta	<i>Mentha vulgaris, M. spicata</i>
Mostaza	<i>Brassica hirta, B. juncea, B. nigra</i>
Cebolla	<i>Allium cepa</i>
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>
Perejil	<i>Petrocelinum crispum</i>
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>

Rosas-Gallo y col., (2010).

Seenivasan y col. (2006), investigaron algunos aceites esenciales con efecto antibacteriano sobre bacterias gram-positivos y gram-negativo. Tal es el caso del aceite esencial de canela, clavo, limón, romero, entre otros, los cuales resultaron con poder inhibitorio significativo antibacteriano y antifúngico; demostrando que los aceites esenciales pueden tomar un papel importante como bioconservadores y antioxidantes, ya que con respecto a este último concepto, el aceite de limón y romero tuvieron gran actividad.

Algunas de las alternativas para un mejor uso y aplicaciones de los alimentos de consumo habitual y de naturaleza hidrofóbica, han sido las emulsiones. La mayonesa, aderezos y algunos aceites esenciales, son un ejemplo de la importancia del uso de emulsión. Este sistema se ha caracterizado en la industria alimentaria por la estabilidad que brinda a los alimentos que lo requieren por su naturaleza hidrofóbica (Ruiz-Márquez y col., 2010). Una de las alternativas tecnológicas en esta misma industria, ha sido el uso de microemulsiones, cada vez presentan un mayor auge, debido a que las microemulsiones presentan la ventaja de mejorar el valor nutricional de los productos alimenticios y optimizar la absorción de nutrientes (Almengor, 2009). El empleo de emulsiones también ha sido considerada una herramienta útil en la encapsulación de compuestos bioactivos de los alimentos, debido a su gran estabilidad, fácil preparación y costo bajo en su elaboración (Jiménez, 2012).

Se ha documentado la utilización de extractos de romero en salchichas de cerdo precocidas y congeladas crudas comparado con un antioxidante sintético, a concentraciones de 1500 y 2500 ppm en las salchichas de cerdo congeladas y en las salchichas frescas a 500 y 3000 ppm, con el fin de evaluar su capacidad antioxidante. Se observó que los extractos de romero tuvieron un efecto antioxidante similar al antioxidante sintético, también se han realizado estudios de este tipo en carnes de res y pollo teniendo resultados que favorecen al uso del romero como antioxidante natural (Ávila-Sosa y col., 2011). Por otro lado, las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales son las que más se han aprovechado en la conservación de alimentos evitando el crecimiento de microorganismos patógenos, que perjudican el alimento y son precursores de enfermedades transmitidas por los alimentos que afectan a los humanos (Hyltdgaard y col., 2012).

## Uso y Aplicaciones de Aceites Esenciales en la Salud

Actualmente, los estudios sobre los aceites esenciales en relación con los efectos benéficos en la salud han aumentado, tomando como parte fundamental los compuestos bioactivos que contienen, sus propiedades funcionales y sus efectos contra microorganismos de interés clínico (Tabla 2). Por ello, se han propuesto como tratamiento alternativo contra diversas enfermedades infecciosas (Ávila-Sosa y col., 2011), debido a que el uso inadecuado e irracional de los antibióticos tradicionales, actualmente está creando condiciones favorables para la aparición, propagación y persistencia de microorganismos resistentes (OMS, 2013). Dentro de los aceites esenciales con mayores propiedades antimicrobianas y antioxidantes que se han reportado se encuentra la pimienta, laurel, eucalipto, tomillo, albahaca, paprika, orégano, romero y árbol de té.

Tabla 2. Propiedades de algunos aceites esenciales.

Nombre común	Nombre botánico (Familiar)	Propiedades
Aceite de anís	<i>Pimpinella anisum</i> (Umbelíferas)	Expulsión de gases, estimulante, expectorante, condimento y aromatizante.
El aceite de canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Lauraceae)	Expulsión de gases, estomacal, astringente, estimulante y antiséptico.
El aceite de limón	<i>Citrus limon</i> (Rutaceae)	Expulsión de gases, estimulante, aromatizante y saborizante.
El aceite de romero	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Labiatae)	Expulsión de gases, estimulante y aromatizante.
Aceite de albahaca	<i>Ocimum sanctum</i> (Labiatae)	Antibacterial, insecticida, estimulante.

Seenivasan y col. (2006).

En investigaciones realizadas en albahaca, canela, anís y otras plantas, donde se han separado diferentes compuestos de los aceites esenciales, se ha encontrado que contienen fenilpropanos, los cuales presentan actividad antibacteriana sobre bacterias como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y hongos como *Tricophyton mentagrophytes*. Los estudios en los que se ha evidenciado sus efectos antimicrobianos han abierto el panorama de la investigación más profunda en el laboratorio, para contribuir al cuidado de la salud (Beltrán y col., 2010).

En Japón, en los años 20 inició el estudio del uso de las emulsiones de lípidos para uso clínico, principalmente para su administración por vía parenteral. A partir de entonces se han realizado un sin número de investigaciones en diversos países sobre el empleo de este tipo de terapia, teniendo como base los aceites de semillas de algodón, girasol, soya y cártamo. Pero hasta 1962 Schuberth y Wretlind, lograron por primera vez introducir en el mercado farmacéutico emulsiones oleosas para uso intravenoso, mismas que fueron bien aceptadas originando en este mismo año la primera terapia con nombre comercial en Suecia (Rodríguez, 1999).

Hoy en día, las emulsiones están tomando cada vez más importancia para su uso como sistemas de liberación de medicamentos o fármacos, ya que son mayormente estables en fluidos biológicos y tienen una mejor respuesta sobre la captación celular del medicamento (Goncalves y col., 2014). La fabricación de emulsiones ha demostrado ser una opción útil para la formulación de fármacos con afinidad hacia los lípidos (lipófilos). En las cuales, el ingrediente activo del fármaco se disuelve en un aceite y se homogeniza utilizando un tensoactivo para formar la emulsión, donde el ingrediente activo del fármaco es encerrado dentro de las micelas formadas por la emulsión. El uso de estas emulsiones terapéuticas se puede ver principalmente en la aplicación intravenosa de fármacos (en función del tamaño de formación de las micelas); este tipo de métodos permite además la liberación continua y prolongada dentro de un periodo de tiempo establecido del medicamento o la terapia que se esté administrando, controlando de esta manera la difusión del fármaco depositado en las micelas (Salmela y col., 2014).

### **Aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*)**

La planta de romero ha sido reconocida por sus propiedades antioxidantes, es por eso, que diferentes extractos de esta planta (aceites) han sido utilizados ampliamente en la industria alimentaria como conservador de carnes, pescados o repostería; así como también en la industria farmacéutica y cosmética, y cada vez se relaciona más en el ámbito de la medicina, con la prevención de enfermedades producidas por estrés oxidativo (Vicente, 2012). Estudios previos han demostrado que el aceite esencial de romero contiene propiedades antibacterianas *in vitro*, sin embargo aún no se ha demostrado si este aceite esencial puede tener el mismo efecto *in vivo* (Ehrlich, 2011).

La actividad citotóxica del aceite esencial del romero afecta directamente en la fase mitótica de bacterias tales como *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *S. aureus* (Avila-Sosa y col., 2011). Estudios realizados por Rau y col. 2006 mostraron que los componentes de romero  $\alpha$ -pineno, 1,8 cineol, canfeno, alcanfor y borneol, presentan una actividad antibacteriana y citotóxica moderada contra bacterias gram positivas y gram negativas.

Este aceite, ha tenido diversos usos tradicionales en cuanto a medicina, debido a que se ha utilizado como analgésico, anti-inflamatorio, anti-reumatoide, espasmolítico, entre otros. Recientemente se han tenido resultados positivos en el tratamiento con aceites de romero y extractos de esta planta, sobre ratas con padecimiento inducido de colitis donde el aceite esencial de romero inhibió el índice de lesión ulcerosa tanto macroscópicamente y patológicamente, utilizando dosis de 400 mg/kg de peso (Minaiyan y col., 2011).

El aceite esencial de romero es una mezcla heterogénea de compuestos que le confieren diversas propiedades (Tabla 3).

Tabla 3. Principales componentes del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).

Componente	Formula	%
Cineol	$C_{10}H_{18}O$	23.8
$\alpha$ -Pino	$C_{10}H_{16}$	15.6
Alcanfor	$C_{10}H_{16}O$	15.6
Canfeno	$C_{10}H_{16}$	9.2
Acetato de bornilo	$C_{12}H_{20}O_2$	5.7
$\beta$ -Pino	$C_{10}H_{16}$	5.1
Borneol	$C_{10}H_{18}O$	4.4
Cariofileno	$C_{15}H_{24}$	3.9
Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	1.5

(Rodríguez col., 2012).

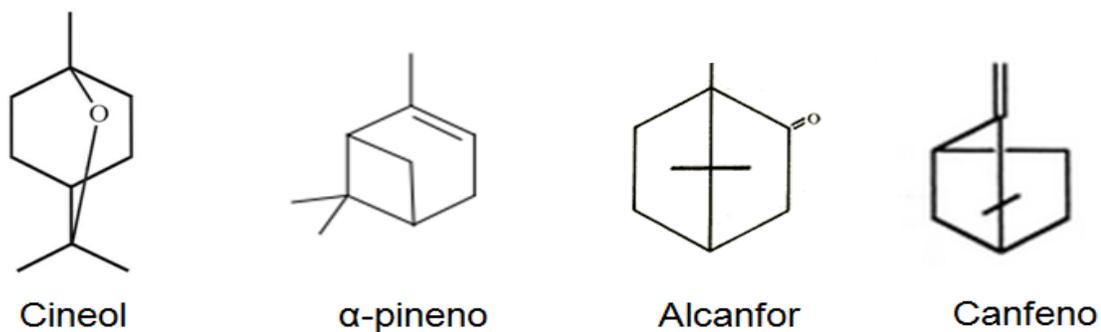


Figura 1. Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).

## **Aceite de Árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*)**

Algunos estudios realizados en la planta del árbol de té, han demostrado que poseen propiedades antimicrobianas y anti-inflamatorias; así como también propiedades tóxicas o repelentes sobre especies de artrópodos de interés agrícola (Benelli y col., 2013). Por eso, recientemente ha aumentado el interés por estudiar las propiedades antimicrobianas y su actividad antiséptica. Estudios previos del aceite esencial de árbol de té ha demostrado que también posee capacidad inhibitoria sobre la replicación del virus de la gripe (Garozzo, 2010).

Se ha comprobado que tres de los componentes principales del aceite esencial (1,8-cineol, terpinen-4-ol, y  $\alpha$ -terpineol) muestran actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, debido a su capacidad de alterar la membrana citoplasmática, provocando así la lisis celular (Carson y col., 2002).

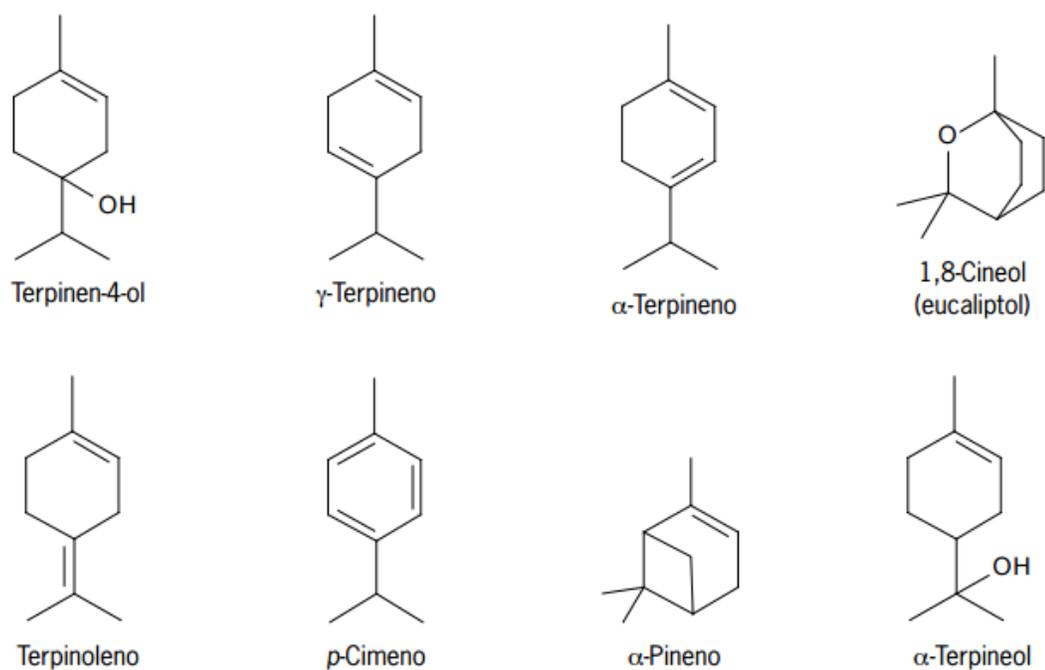
Aunado a lo anterior, Halcón y Milkus (2004) reportaron que las bacterias resistentes a antibióticos, especialmente *S. aureus* resistente a la meticilina, muestra sensibilidad al contacto con el aceite esencial de árbol de té, mejorando notablemente infecciones generadas por este microorganismo. Por otro lado, también establecen que dicho aceite es eficaz en tratamientos de heridas infectadas y además posee capacidad antiinflamatoria.

Sin embargo, experimentos en ratas donde se le han administrado 61.5 g de aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* han provocado efectos tóxicos, reflejados en daños neurológicos como: ataxia y depresión (Hammer, 2006). Sin embargo Carson y col. (2002) reportaron que la toxicidad oral en ratas se da una dosis letal 50% que va de 1.9 a 2.6 mL/kg; estableciendo que la exposición a grandes cantidades de aceite de árbol de té, podrían ocasionar daños. Sin embargo si el tratamiento es con cantidades moderadas la toxicidad es nula, de igual forma el mismo autor establece que la toxicidad dérmica se da en forma de reacción alérgica, supuestamente generada por el 1,8 – cineol, pero esto no ha sido comprobado científicamente.

El aceite esencial de árbol de té se compone de varios ingredientes activos, los cuales se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Principales componentes del aceite esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*).

Componente	Formula	%
Terpinen-4-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	40.1
γ-Terpineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	23
α-Terpineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	10.4
1,8-Cineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	5.1
Terpinoleno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	3.1
p-Cimeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	2.9
α-Pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	2.6
α-Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	2.4
Aromadendrene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1.5
δ-Cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1.3
Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1.0
Globulol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0.2
Viridiflorol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0.1



Hammer y col., (2005).Vila y Cañigueral, (2006).

Figura 2. Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de las Microemulsiones

Es necesario aclarar que una microemulsión no se refiere exactamente a una emulsión con muy pequeñas micelas o gotas, sino que es una solución micelar donde las micelas se encuentran hinchadas y se tocan unas con otras (Salager, 1992). Sin embargo, en este trabajo se empleará el término microemulsión para referirnos a emulsiones con micelas vistas a partir de un microscopio, ya que no pueden ser observadas a simple vista.

Las microemulsiones de aceite esencial de árbol de té y romero se realizaron en base a lo establecido por Roa y col. (2012), con ligeras modificaciones. Para ello, se prepararán tres microemulsiones, al 8 % (v/v), 5 % (v/v) y 2.5 % (v/v) tanto para el aceite esencial de árbol de té y de romero. Para iniciar las microemulsiones, se mezclarán los aceites esenciales de árbol de té (Sigma-Aldrich, No. CAS 68647-73-4, densidad relativa 0.898 g/cm<sup>3</sup> a 25 °C) y romero (Sigma-Aldrich, No. CAS 8000-25-7, densidad relativa 0.903 g/cm<sup>3</sup> a 25 °C), con tween 80 (polioxietilensorbitanmonooleato o Polisorbato 80) (1 % v/v) y una solución de buffer fosfato (PBS) a pH 7.4 fue agitada constante por 20 minutos hasta adquirir una consistencia lechosa y homogénea (Figura 1).

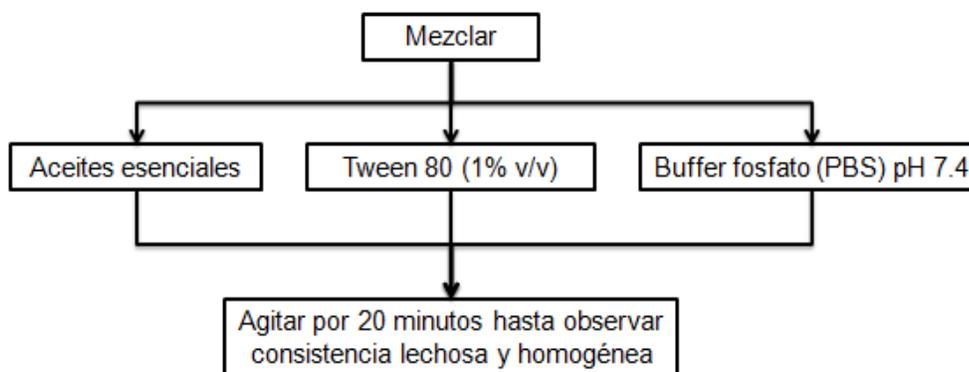


Figura 3. Diagrama general de la preparación de las emulsiones.

Una vez conseguida dicha consistencia, las emulsiones fueron guardadas en viales de vidrio color ámbar con tapón de rosca, se protegieron de la luz y el calor.

### Prueba de Porcentaje de Hemólisis

La prueba de hemólisis se realizó en base al procedimiento establecido por Sundaram y col. (2011), con algunas modificaciones como siguen; se utilizaron eritrocitos de sangre humana recolectados en un tubo con anticoagulante EDTA (ácido etildiaminotetraacético). La muestra se centrifugó a 350 g por 5 minutos, posteriormente se descartó el plasma y se recolectó el paquete eritrocitario. Estos eritrocitos fueron lavados en tres ocasiones con 3 mL de solución salina al 0.9 % (p/v), siendo centrifugados en cada lavado a 350g por 5 minutos. Después, se preparó una suspensión de eritrocitos al 5% (v/v). La suspensión de eritrocitos, fue confrontada con diversas proporciones de las microemulsiones de aceites de romero y árbol de té previamente preparadas. Una vez puestos en contacto se incubaron a 37 °C x 2 horas con agitación ocasional. Una vez transcurrido el tiempo se tomó el sobrenadante y se llevó a leer al analizador semi-automático SPINLAB (España) a 540 nm (Figura 2). Posteriormente se calculó el porcentaje de hemólisis, con la siguiente ecuación (1):

$$(1) \quad \% \text{ de Hemólisis} = \left( \frac{\text{Abs muestra} \times 100}{\text{Abs total}} \right)$$

Donde:

Abs muestra= absorbancia del preparado de suspensión de eritrocitos más microemulsión.

Abs total= total de hemólisis generada por agua más suspensión de eritrocitos.

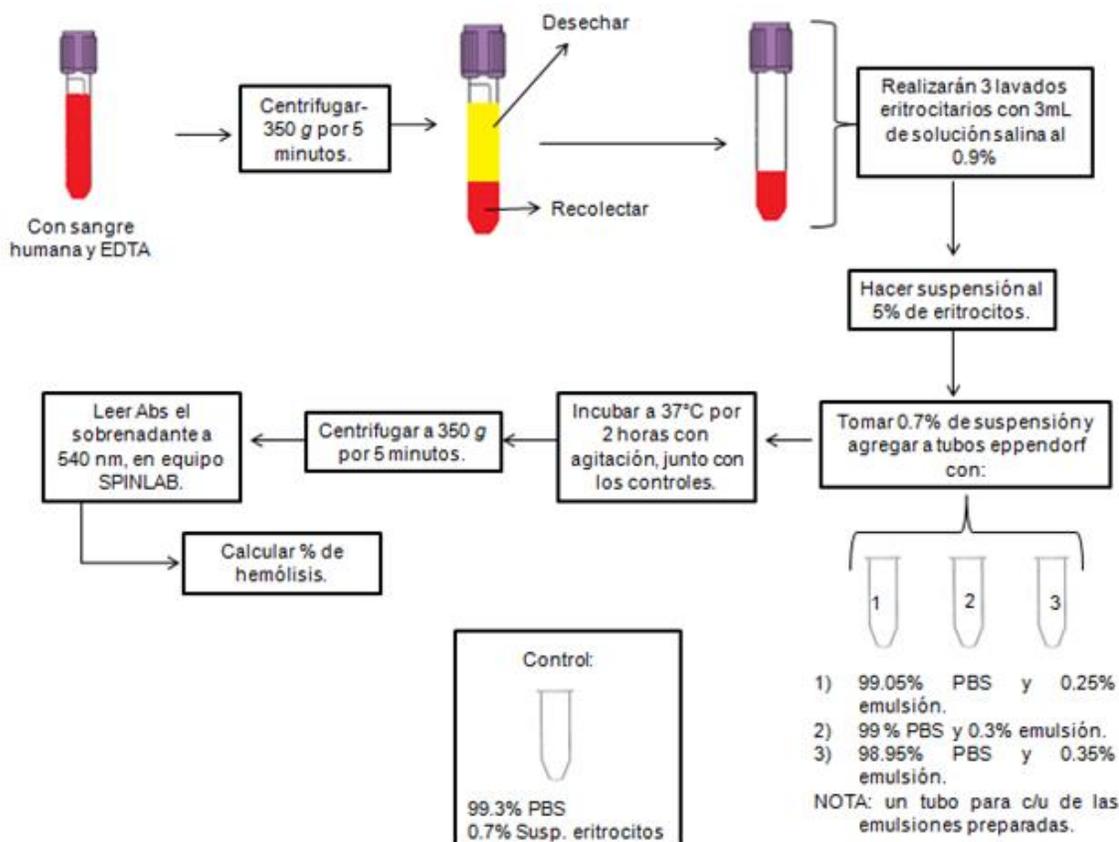


Figura 4. Diagrama para la prueba de porcentaje de Hemólisis.

### Prueba de Porcentaje de Inhibición de Hemólisis

Esta prueba consistió en preparar una suspensión de eritrocitos al 5 % (v/v) que se expusieron con los preparados de las microemulsiones y un oxidante conocido (peróxido de hidrógeno al 30%). Las cantidades de microemulsión utilizadas en el presente análisis, se basó en los resultados obtenidos en la prueba de hemólisis. También se utilizó un control de 100 % de hemólisis, que se preparó con agua y suspensión de eritrocitos. Una vez que se expuso el eritrocito, a la microemulsión y el oxidante, se llevaron a incubar a 37°C por 2 h. Posterior al

tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 350g por 5 minutos, se descartó el precipitado y se colectó el sobrenadante, el cual, se introdujo a un analizador semi-automático SPINLAB y se ajustó la lectura a 540 nm (Hapner y col., 2010;Slamenová y col., 2011).Para establecer el grado de protección al eritrocito por las microemulsiones se calculó el porcentaje de inhibición de hemólisis con la siguiente ecuación (2):

$$(2)\% \text{ de Inhibición de hemólisis} = \left( \frac{\text{Abs muestra} \times 100}{\text{Abs total}} \right) - 100$$

Abs muestra: absorbancia de la mezcla de suspensión de eritrocitos, más microemulsión y oxidante.

Abs total: absorbancia obtenida de la mezcla de agua, más suspensión de eritrocitos y oxidante.

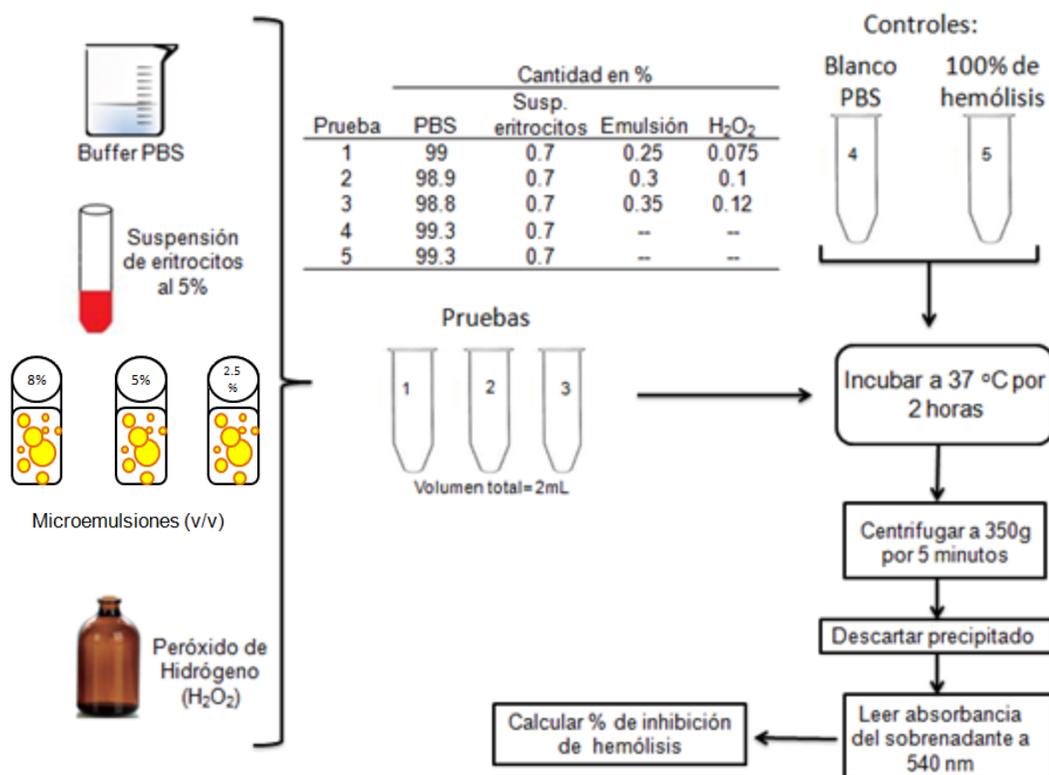


Figura 5. Diagrama para la prueba de porcentaje de inhibición de hemólisis.

## Determinación del Tamaño de las micelas

La determinación del tamaño de las micelas se realizó por medio del método modificado de Poyato y col. (2012) haciendo una medición del diámetro de las micelas en un microscopio óptico Zeiss Primo Star (Alemania), adicionado con una cámara AxioCamERc 5s Zeiss (Alemania), después, se realizó un caracterización por tamaño de micelas encontradas, esto se realizó en 3 campos. El tamaño de las microemulsiones fue reportado en  $\mu\text{m}$ .

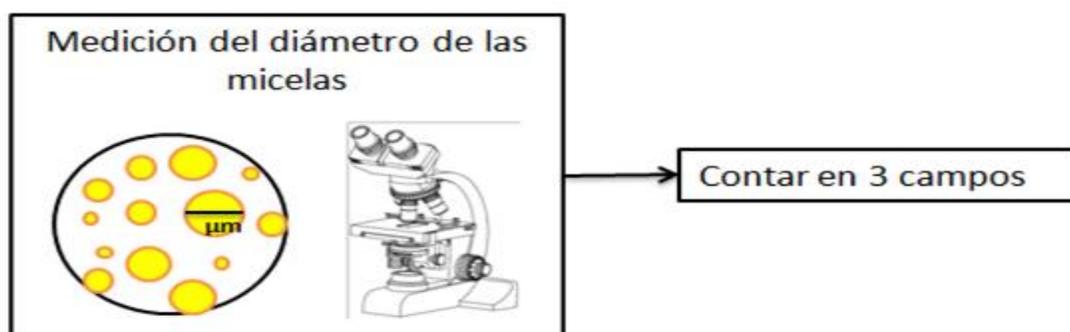


Figura 6. Diagrama para la determinación del tamaño de micelas.

## Actividad Antibacteriana

Se utilizó el método descrito por Hu y col. (2013) con ligeras modificaciones, donde se determinó la sensibilidad bacteriana en cepas de *E. coli* O157:H7 (ATCC43890) y *S. aureus* (ATCC9144) expuestas a las emulsiones preparadas de aceites esenciales de árbol de té y romero a diferentes concentraciones (8.0% (v/v), 5.0% (v/v) y 2.5% (v/v)). El ensayo para la determinación del efecto inhibitorio de las microemulsiones, se realizó por medio de la adición

de 0.1 mL de caldo nutritivo inoculado con aproximadamente  $1 \times 10^6$  ufc/ mL de cada cepa, a cada caldo se le adicionó microemulsiones en sus diferentes concentraciones, posteriormente el caldo se incubó a 37°C por 24 h, con agitación ocasional. Una vez finalizada la incubación, se prosiguió a sembrar el contenido de los caldos en placas de agar Muller-Hinton (por triplicado), dicha placa se incubó a 37°C por 24 horas y posteriormente se realizó el conteo de las colonias desarrolladas, con los datos obtenidos se realizó el cálculo para la determinación del efecto antibacteriano, utilizando la siguiente ecuación (3):

$$(3) \quad \text{Tasa de \% de inhibición} = \frac{(A - B) * 100}{A}$$

Donde:

A= Número de colonias en control.

B= Número de colonias desarrolladas.

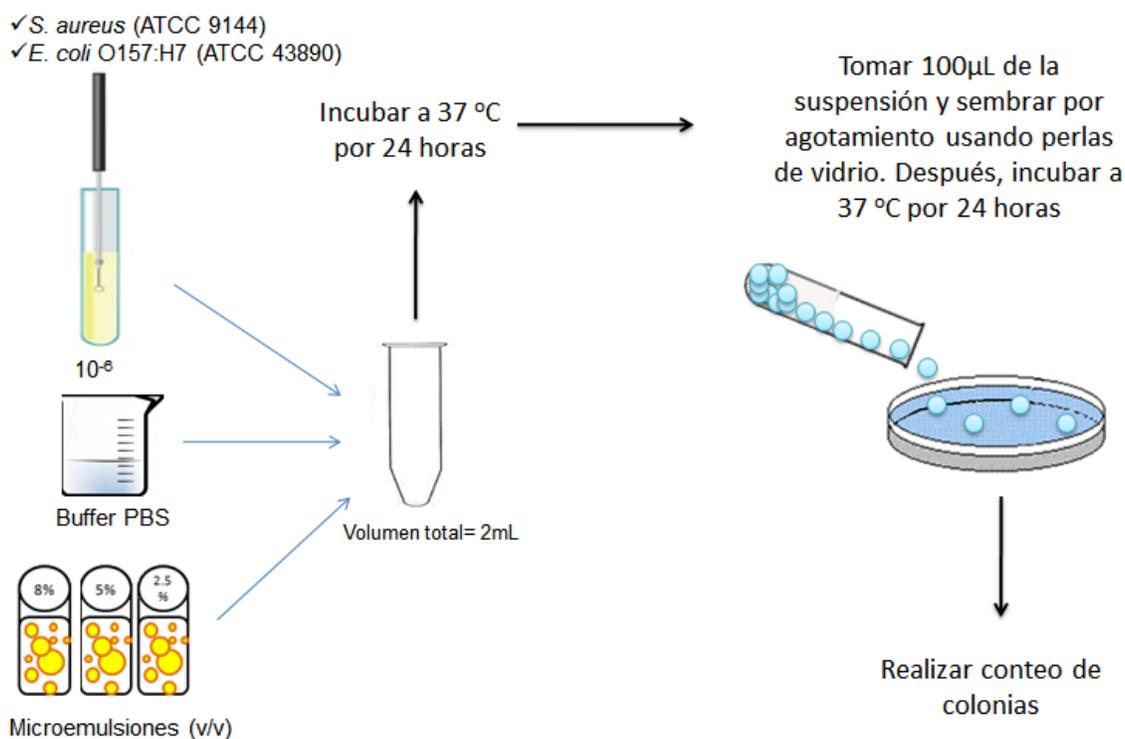


Figura 7. Diagrama de método de difusión en agar.

## Propiedades Ópticas (Color)

Los parámetros de color fueron evaluados por medio de un colorímetro (Espectrofotómetro de esfera portátil X-Rite, U.S.A.). El cual fue calibrado con un plato blanco de porcelana. Para la medición de color se realizaron cinco mediciones para cada concentración, de las cuales se tomó el promedio. El color de las microemulsiones se expresó en base al modelo de CIE ( $L^*$   $a^*$   $b^*$ ), dicho modelo es usado desde 1976, y fue creado como estándar en escala de color relativamente uniforme, de esta forma se podría utilizar en cualquier parte del mundo para comparar fácilmente diversos valores de color. En este modelo, cada espacio de color simboliza diferencias visuales entre los colores, y se representan gráficamente como un cubo, donde el eje  $L^*$  se extiende de arriba hacia abajo, tiene un máximo 100 que representa un perfecto difusor reflejante, su mínimo llega a cero, y este simboliza negro. Los ejes conocidos como  $a^*$  y  $b^*$  no tienen valores numéricos concretos, sin embargo para  $a^*$  los valores negativos son de color rojo y los valores positivos son de un tono verde. Para los valores de  $b^*$  positivos se genera una tonalidad amarilla, mientras que los valores  $b^*$  negativos son de color azul. (Hunter L, a, b, 2008).

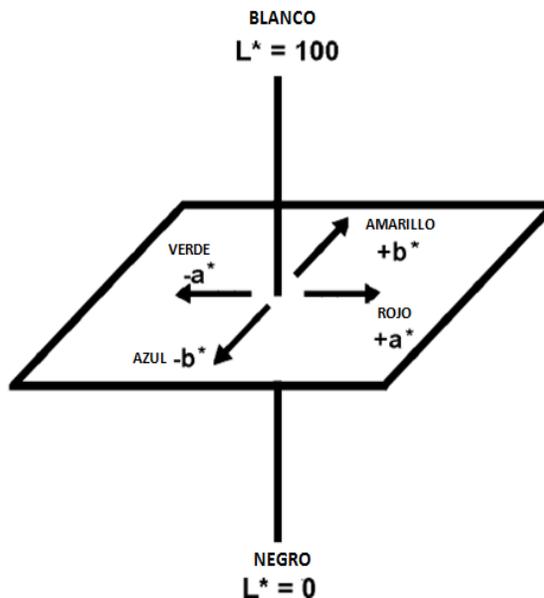


Figura 8. Espacio de color CIE ( $L^*$   $a^*$   $b^*$ )

## **Análisis Estadístico**

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza utilizando como factores las emulsiones y el porcentaje de hemólisis, porcentaje de inhibición de hemólisis y color fueron tomados como variables de respuesta. Para la toma de decisiones se utilizó la prueba de comparaciones de Duncan ( $\alpha= 0.05$ ). Los resultados obtenidos de las mediciones de los tamaños de emulsiones y de la actividad antibacteriana solo fueron presentados como estadística descriptiva. Todo lo anterior, se realizó mediante el paquete estadístico NCSS, 2000.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Prueba de Porcentaje de Hemólisis

El término hemólisis hace referencia al proceso de destrucción de los eritrocitos, que genera la liberación de los componentes intraeritrocitarios (Gómez y col., 2009), por lo tanto, la prueba de porcentaje de hemólisis se utiliza para conocer el efecto provocado sobre la célula eritrocitaria al enfrentarla con microemulsiones de aceites esenciales de árbol de té y romero en diversas concentraciones de aceites esenciales. En la Figura 9 podemos observar que conforme se aumenta la concentración de TO, se incrementa significativamente el efecto hemolítico de las células eritrocitarias ( $p < 0.05$ ). El máximo incremento de hemólisis fue de hasta el 70 % y fue observado para las microemulsiones cargadas con 5.0 y 8.0 % de TO, pero no existieron diferencias significativas entre las concentraciones antes mencionadas ( $p > 0.05$ ). Estos resultados también muestran que la microemulsión que representó el menor daño al eritrocitos, fue la cargada con 2.5 % de TO.

No se han encontrado reportes previos de los efectos del aceite de TO sobre los eritrocitos de animales o humanos. Pero otros estudios han evidenciado que TO puede tener la capacidad de desnaturalizar proteínas y alterar la estructura de la membrana celular (Cuaron, 2012). Otra parte importante que se ha estudiado de TO, ha sido su efecto sobre células epiteliales y fibroblastos (Söderberg y col., 1996). Donde se ha observado que a bajas concentraciones de TO, los efectos citotóxicos son bajos, pero estos efectos se incrementan cuando se aumenta la concentración y el tiempo de contacto de TO con las células. Los resultados antes mencionados concuerdan con lo encontrado en el presente estudio y que muestra en la Figura 9.

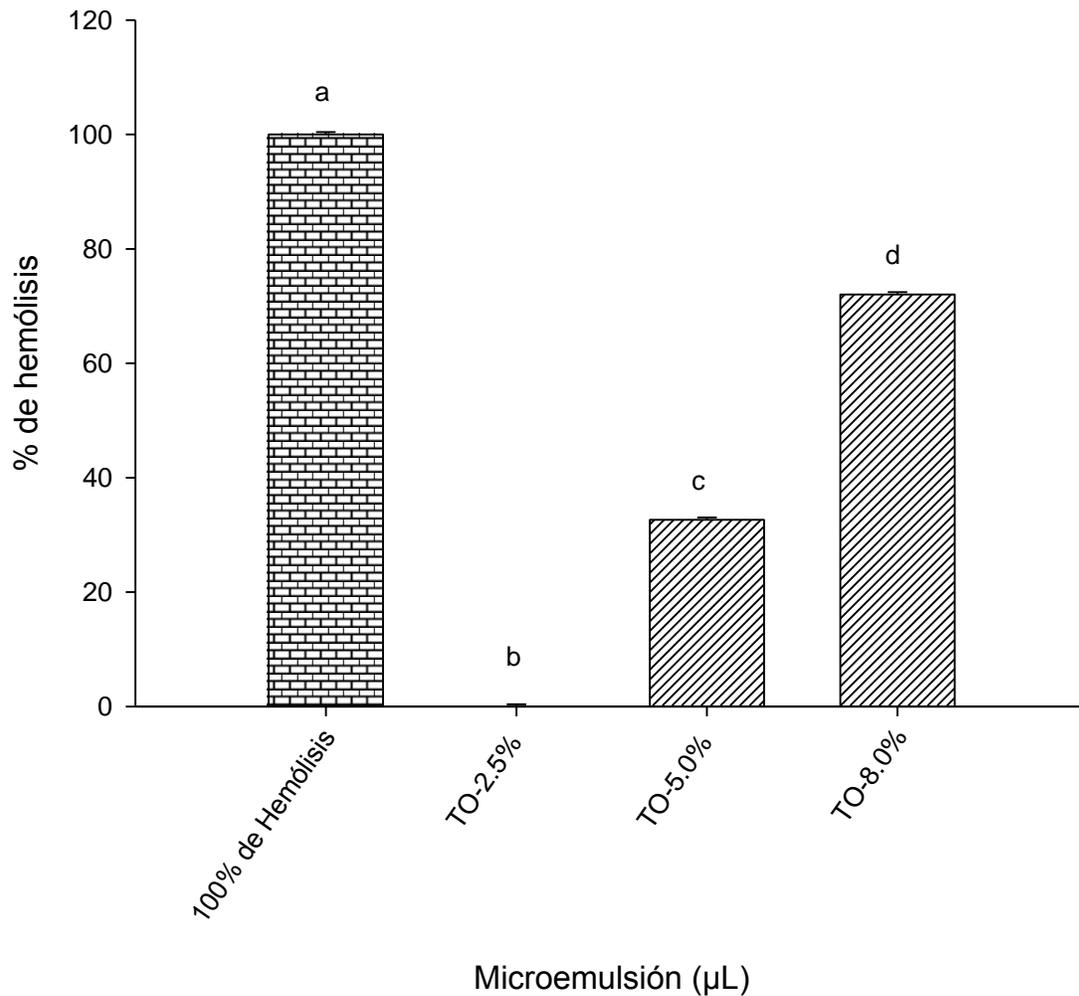


Figura 9. Efecto de las Microemulsiones a diversas concentraciones de TO sobre la célula eritrocitaria. Literales iguales muestran la ausencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), un significado contrario tienen las literales diferentes.

En el caso de las microemulsiones preparadas con RO, pudimos observar que el incremento en la concentración no representó un aumento significativo en la hemólisis (Figura 10). Esto nos indica que las concentraciones estudiadas no representan citotoxicidad para la célula eritrocitaria. A diferencia de nuestro estudio, otros autores han reportado que el RO

puede producir hemólisis en los eritrocitos en un 86 a 92 % dependiendo de la concentración de RO (Soltani y col., 2014). Aunque los autores citados previamente, indicaron que los componentes de RO que pudieran ser los responsables de inducir la hemólisis de los eritrocitos son aún desconocido.

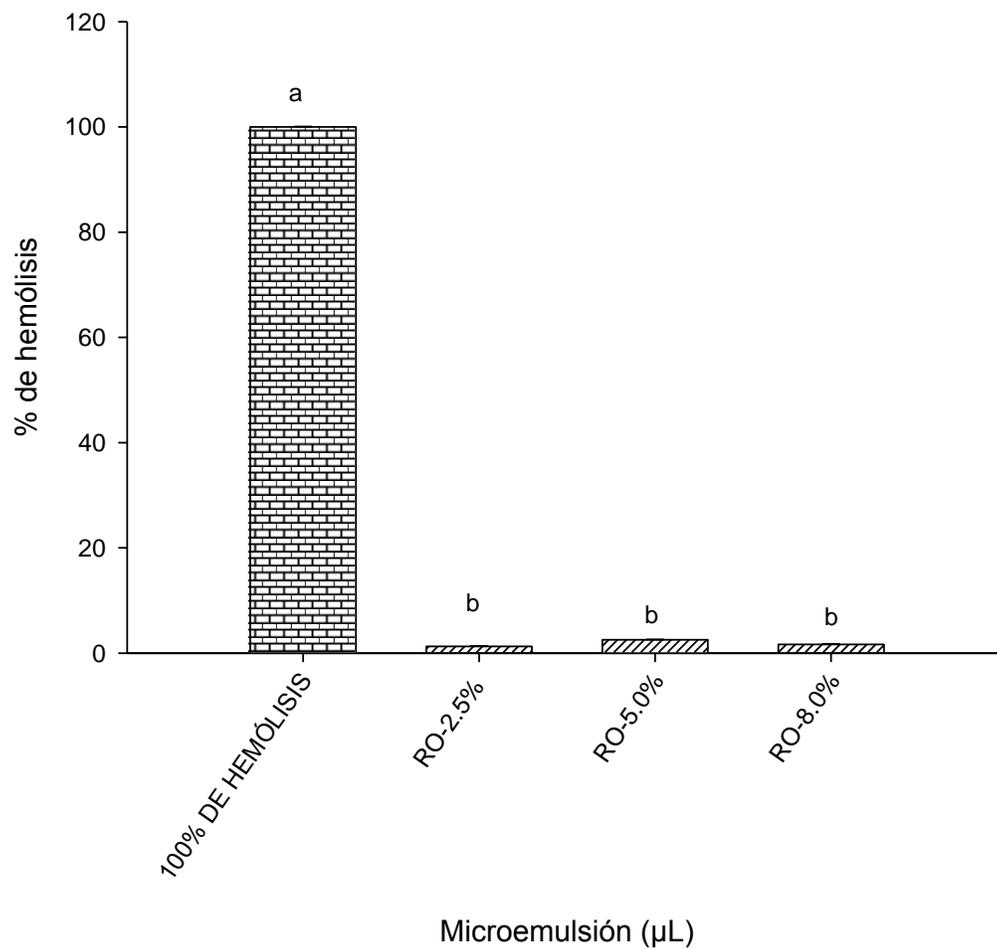


Figura 10. Efecto de las Microemulsiones a diversas concentraciones de RO sobre la célula eritrocitaria. Literales iguales muestran la ausencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), un significado contrario tienen las literales diferentes.

## Prueba de Porcentaje de Inhibición de Hemólisis

Contrario a la prueba de porcentaje de hemólisis, la determinación del porcentaje de inhibición de hemólisis tiene la finalidad de medir la capacidad que tienen ciertas sustancias (antioxidantes) para proteger al eritrocito, bajo condiciones de ataque a la membrana celular (oxidante). En el presente estudio se generó un proceso de peroxidación para producir radicales libres, que es una de las principales causas de daños y destrucción en la membrana eritrocitaria (Benites y col., 2011). En la Figura 11, se puede observar que la microemulsión cargada con RO presentó la mayor capacidad de inhibición de hemólisis en todas sus concentraciones comparadas con las microemulsiones con TO.

De manera específica se puede observar que las microemulsiones RO al 2.5% y al 8.0% muestran un porcentaje de inhibición de hemólisis de >70%. En cuanto a las microemulsiones de TO se observa que existe un porcentaje de inhibición de hemólisis de <40% expresado por microemulsiones de TO al 2.5% y 5.0%, mientras que para una concentración del 8.0% el porcentaje de inhibición de hemólisis fue >40%.

Como se pudo observar, las emulsiones con RO fueron más eficientes en la protección del eritrocito contra el ataque oxidativo, que las cargadas con TO. A diferencia de nuestro estudio, Yesil-Celiktas y col. (2007) monitorearon la capacidad de extractos de romero (diversas regiones y tiempos de cosecha) de inhibir el ataque oxidativo ( $H_2O_2$ ) a la membrana eritrocitaria, con la consecuente producción de malondialdehído, un componente mutagénico y carcinogénico que se produce con la inserción de un átomo de oxígeno en el componente lipídico de la membrana. Ellos observaron que los extractos de RO presentaban una baja protección a la peroxidación de la membrana del eritrocito (rango de 46.2 a 127  $\mu$ m de malondialdehído), con respecto a antioxidantes conocidos (BHT= 21.4  $\mu$ m de malondialdehído), que eran atribuidos a sus componentes hidrofóbicos. Es importante mencionar que en nuestro estudio, se evaluó las microemulsiones con aceites esenciales de RO y no extractos. Esto nos indica que las formas en las que se presentan a los antioxidantes puede estar en función de la disponibilidad de sus componentes bioactivos.

Por otro lado, podemos mencionar que TO ha sido reconocido por su capacidad antioxidante, principalmente por la presencia de  $\alpha$ -terpineno (Rudbäck y col., 2012). Pero no,

porque represente una adecuada capacidad antioxidante al ser evaluada por métodos como el DPPH o ABTS u otros métodos (reacciones químicas), siga el mismo sistema de capacidad antioxidante en modelos celulares. Pero independientemente de la capacidad antioxidante, TO se ha reconocido que exhibe cierta toxicidad en células humanas (no eritrocitarias) y que está en función de la concentración y el contacto. Basados en la figura 11, aquí podemos argumentar que TO si exhibe protección al eritrocito (baja), y está puede estar en función de la reacción con los componentes hemolíticos de la membrana de TO con el peróxido de hidrógeno, que en competencia podían estar reaccionando y bloqueando su acción contra la membrana, ya que, pudimos observar que las microemulsiones cargadas con mayor concentración de TO (8 %) protegieron más adecuadamente al eritrocito que las de bajas concentraciones ( $p < 0.05$ ).

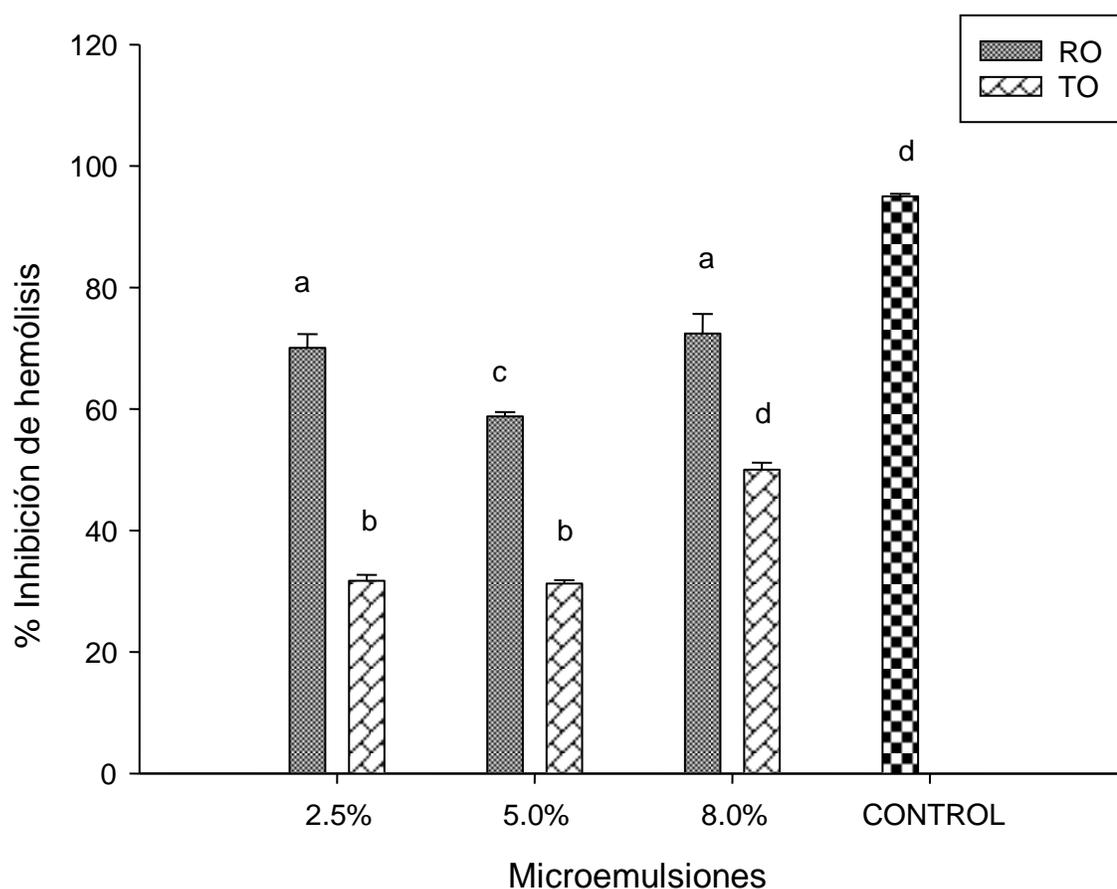


Figura 11. Porcentaje de inhibición de hemólisis del aceite de árbol de té (TO) y romero (RO). Literales iguales en diferentes columnas muestras que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## Determinación del Tamaño de las Micelas

Las micelas fueron clasificadas de acuerdo a los diferentes tamaños que presentaron en las distintas concentraciones de emulsiones. Para las emulsiones preparadas con aceite esencial de romero, se puede observar que el diámetro predominante de las micelas que componen la emulsión va de 2 a 35  $\mu\text{m}$ , existiendo sin embargo, cantidades muy bajas de micelas mayores a los 35  $\mu\text{m}$ .

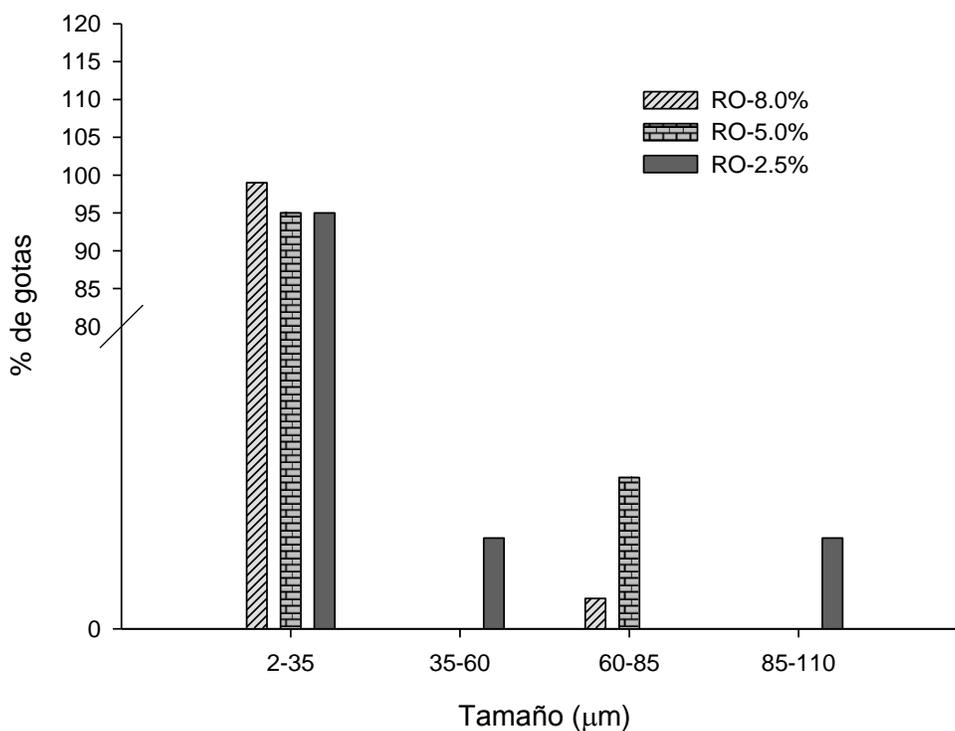


Figura 12. Porcentaje de la distribución de tamaños de micelas en diferentes concentraciones de aceite esencial de romero.

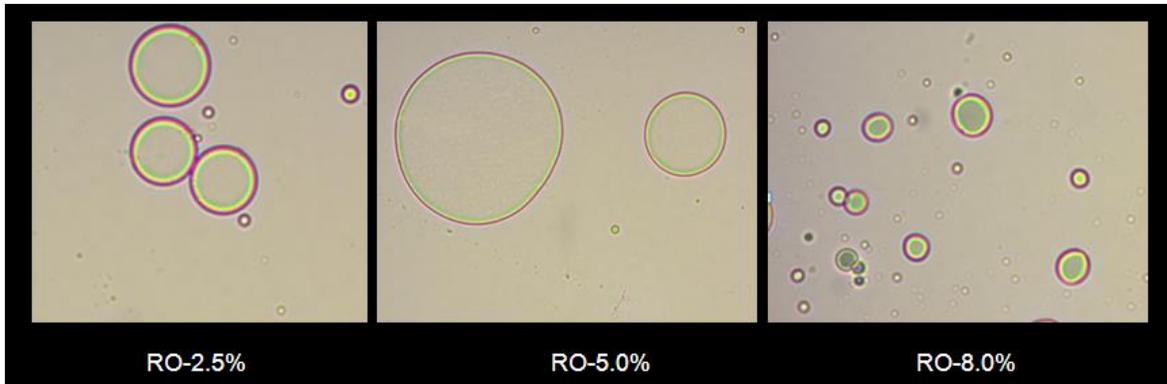


Figura 13. Microemulsiones de aceite de romero vistas en microscopio a 40x.

En las emulsiones preparadas con TO, presentaron micelas con diámetros más variados en cuanto a su tamaño, pero se distingue una mayor prevalencia de micelas con diámetros pequeños, en esta ocasión van  $\approx 15 \mu\text{m}$ , siguiendo las micelas que tienen diámetros de 15 a 30  $\mu\text{m}$ , y de igual forma que con las emulsiones con RO, existe una cantidad mínima de micelas con diámetros mayores de los rangos ya mencionados, ambos resultados se obtuvieron basados en el procedimiento modificado de Poyato y col. (2012).

Según Salager (1999), el tamaño de la gota y la distribución de tamaños son dos tipos de informaciones muy importantes, ya que por un lado dan lugar a características de las emulsiones, y por otro son útiles para definir propiedades físicas como viscosidad y estabilidad. En esta misma investigación se estableció la tendencia que siguen las emulsiones según su tamaño y distribución, mostrando que a menor tamaño de gota, mayor viscosidad y cuando es mayor tamaño de las gotas la viscosidad es menor.

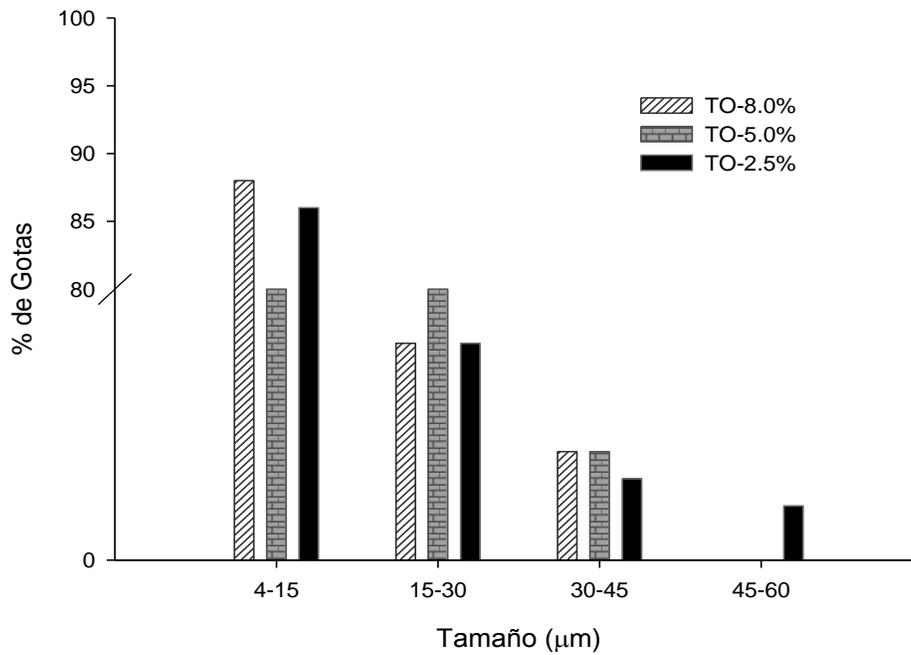


Figura 14. Porcentaje de la distribución de tamaños de micelas en diferentes concentraciones de aceite esencial de árbol de té.

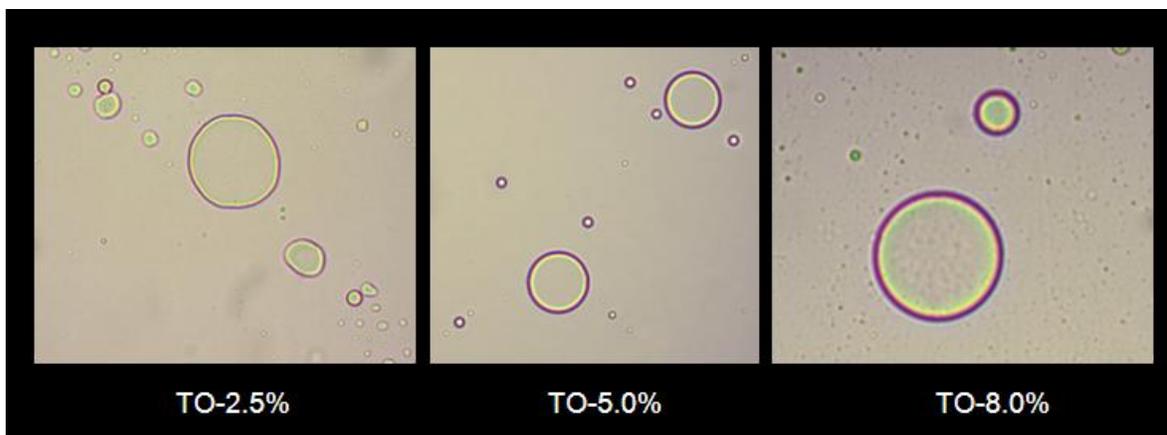


Figura 15. Microemulsiones de aceite de árbol de té vistas en microscopio a 40x.

## Actividad Antibacteriana

En la tabla 5, se puede observar que la emulsión de árbol de té al 8.0% y de romero al 8.0% presentaron alta inhibición en el porcentaje el crecimiento de *E. coli* O157:H7. Por otro lado el crecimiento de *S. aureus* fue inhibido en un 100% y 99% por la emulsión de árbol de té al 8.0% y 5.0% respectivamente. En cambio, ninguna emulsión cargada con RO, presentó efecto inhibitorio contra *S. aureus*.

Tabla 5. Actividad antibacteriana de las microemulsiones estudiadas.

Microemulsión	% de Inhibición	
	<i>E. coli</i> (ATCC43890)	<i>S. aureus</i> (ATCC9144)
TO-8.0%	99	100
TO-5.0%	NI	99
TO-2.5%	NI	NI
RO-8.0%	99	NI
RO-5.0%	NI	NI
RO-2.5%	NI	NI

\*NI= no inhibición

En el caso de TO, Orozco y col. (2011), también obtuvieron resultados favorables en la exposición de microemulsiones con TO contra cepas de *E. coli*. Otros estudios, también han evidenciado que TO puede ser efectiva para tratar problemas infecciones en animales ocasionados por *S. aureus*. Los principales componentes activos del TO, que se le han atribuido propiedades antibacteriales son el terpineno-4-ol, linalol y  $\alpha$ -terpineol. Se ha demostrado que

estos componentes (terpineno-4-ol principalmente) pueden afectar la pared celular bacteriana, interrumpiendo también con esto, la actividad de la membrana y provocando daño en el material nuclear (pérdida de 290 nm) (Halcón y Milkus, 2004). Por otro lado y con respecto al mecanismo de acción contra *E. coli* se han visto que los efectos celulares son muy similares (Gustafson y col., 1998).

Por otro lado, Ojeda-Sana y col. (2014), aseguran que los componentes de RO, en específico 1-8 cineol, alcanfor, verbenone y borneol pueden ser capaces de romper la membrana del celular de *E. coli* a  $\frac{1}{2}$  x MIC (4 mL/mL). Con respecto a su selectividad bacteriana, se ha considerado que RO suele ser más efectivo contra gram negativo, que contra gram positivos (Zaouali y col., 2010). Esto podría ser la causa de la ausencia de inhibición al probarse las emulsiones contra *S. aureus*.

Las emulsiones que no presentaron actividad antibacteriana, no necesariamente significa su ausencia. Ya que este fenómeno también puede estar en función de diversas covariables que no se evaluaron en el estudio, como la estabilidad de emulsión en el medio sólido, la eficiencia en la liberación del contenido de los aceites y de la cantidad liberada por área y densidad de microorganismos.

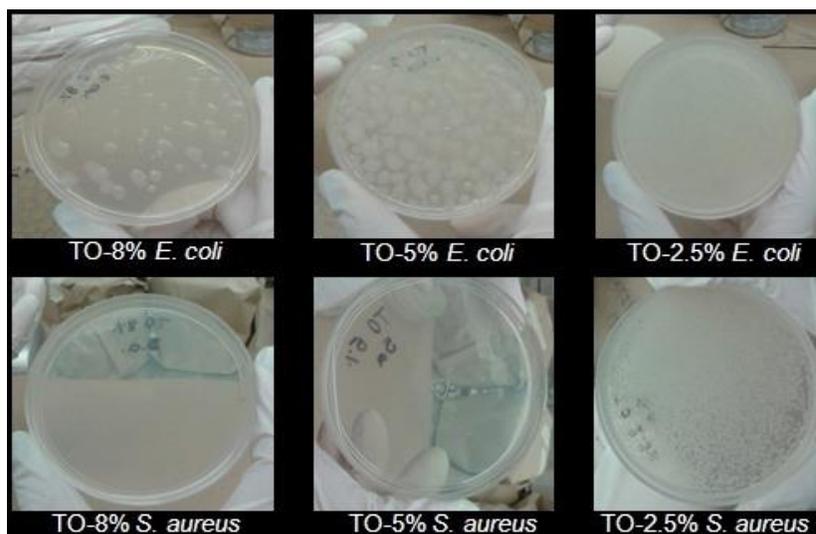


Figura 16. Actividad antibacteriana producida por las microemulsiones de aceite esencial de árbol de té sobre *E. coli* y *S. aureus*.

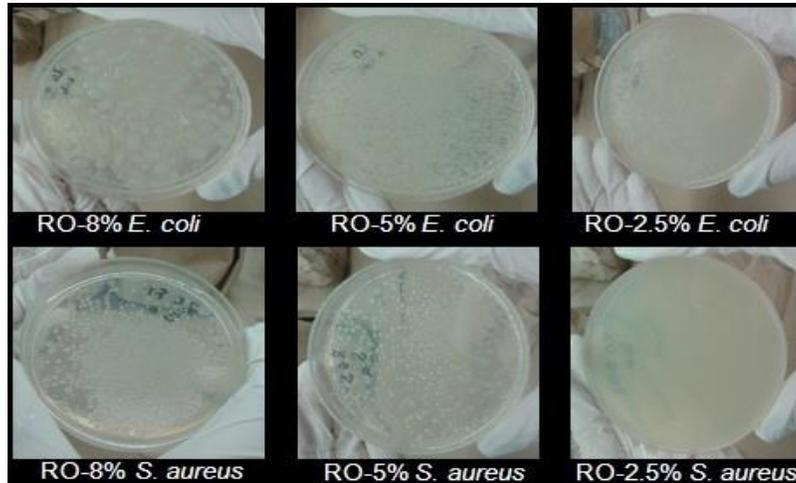


Figura 17. Actividad antibacteriana producida por las microemulsiones de aceite esencial de romero sobre *E. coli* y *S. aureus*.

### Propiedades Ópticas (Color)

Con la finalidad de representar de mejor manera la tendencia en color que presentaron las microemulsiones realizadas, se llevó a cabo un análisis de los parámetros de color de cada una de ellas. En la Figura 20, se muestran los valores de  $L^*$  distintas concentraciones de TO y RO en las microemulsiones. Donde se observaron diferencias significativas en los parámetros de  $L^*$  ( $p < 0.05$ ), lo cual nos indica, que las microemulsiones de RO mostraron una coloración más blanquecina que las de microemulsiones cargadas con TO ( $p < 0.05$ ), siendo la microemulsión con RO al 2.5 % con la mayor coloración blanca. Esta misma coloración fue disminuyendo significativamente con forme se fue incrementado la concentración del aceite esencial ( $p < 0.05$ ). Para las microemulsiones de TO se observaron valores más bajos de blancura, pero con tendencia muy similar a la blancura de las microemulsiones de RO. (Figura 19).

Algunos de los aceites esenciales a los que se le han evaluado la blancura en estado emulsionado, han encontrado que dicho parámetro depende del tipo de aceite utilizado. En

estudios realizados sobre aceites esenciales de hierba de limón y de palmarosa se ha observado que la variación de blancura puede ser diferente, desde un 47.9 % para el aceite de hierba de limón y 51.3 % para palmarosa. (Salvia-Trujillo y col., 2015). Estos estudios concuerdan con la variación obtenida entre tipos de aceites cargados a la microemulsión.

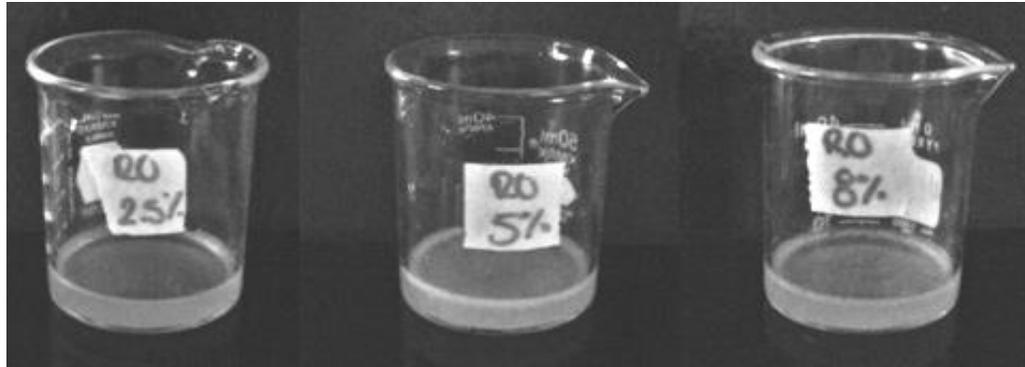


Figura 18. Diferentes concentraciones de microemulsiones de aceite esencial de romero.



Figura 19. Diferentes concentraciones de microemulsiones de aceite esencial de árbol de té.

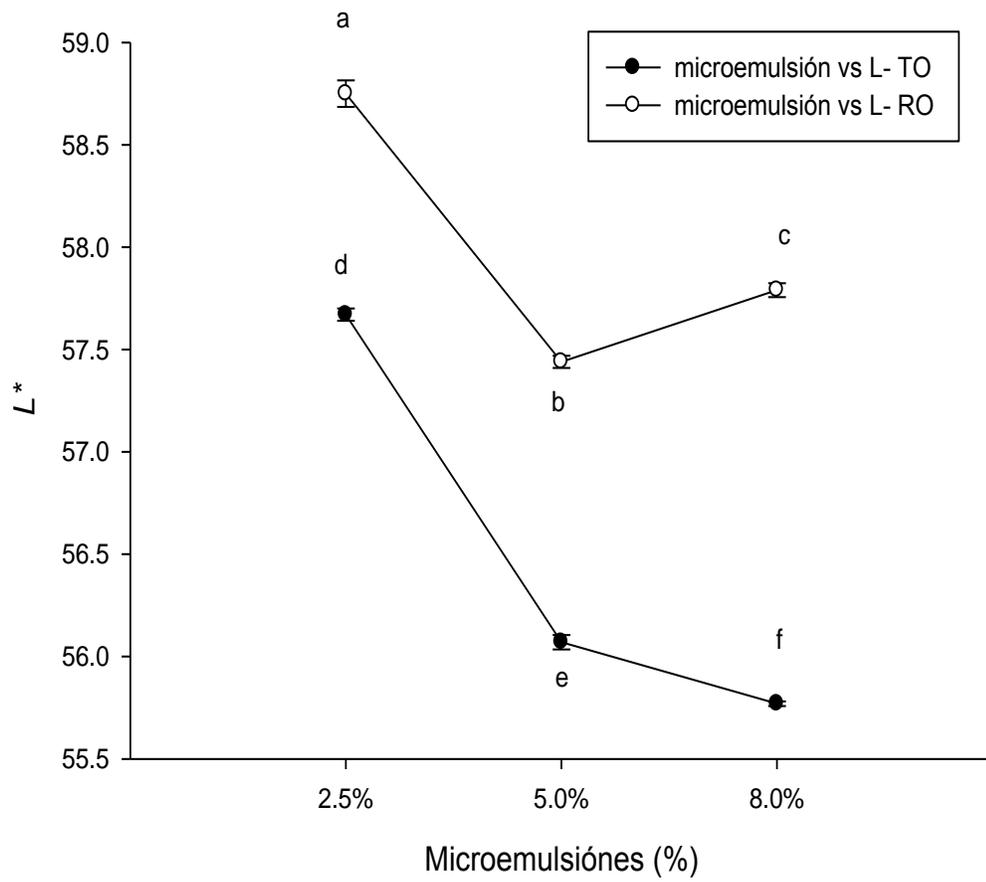


Figura 20. Parámetros de color de  $L^*$ . Literales distintas muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

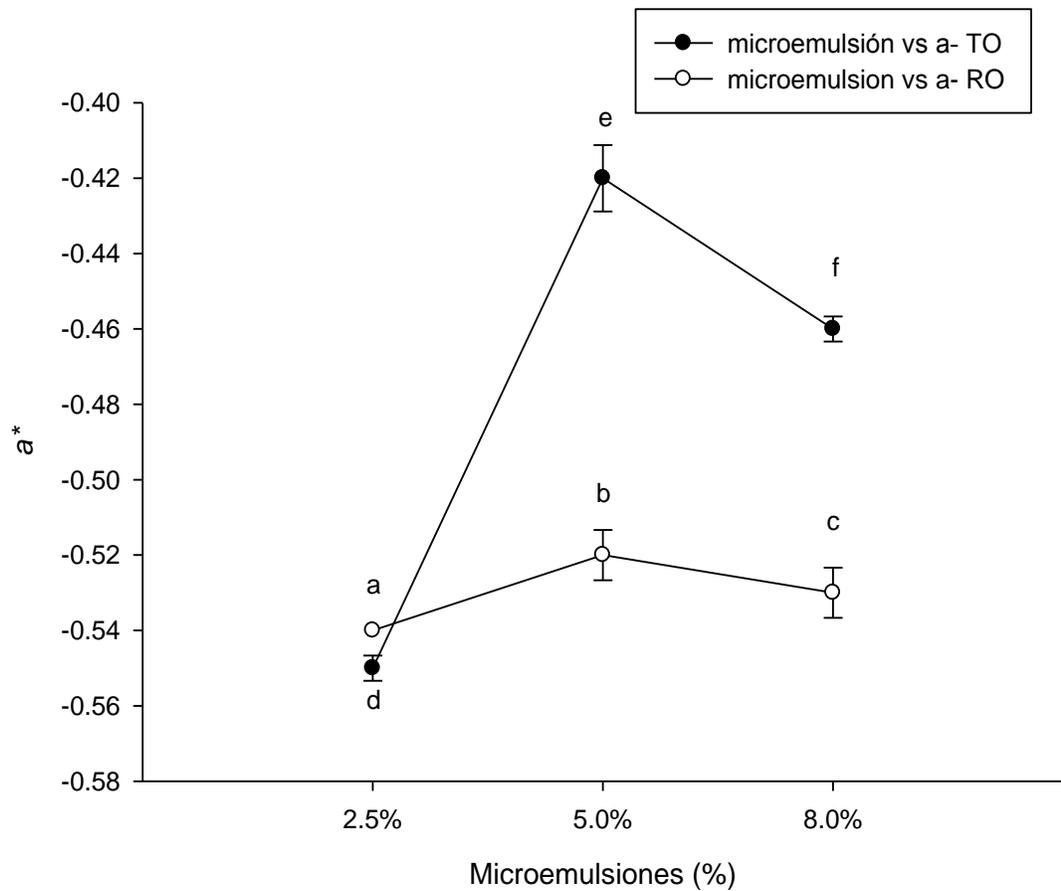


Figura 21. Parámetros de color de  $a^*$ . Literales distintas muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La consideración del parámetro  $a^*$  y  $b^*$  en la elaboración de emulsiones depende de la coloración del aceite esencial de origen. La coloración de los aceites esenciales evaluados en este estudio, estuvieron en función de un color amarillo claro. Por eso motivos, se tomará en consideración los valores de  $b^*$  (aunque se muestra el parámetro de  $a^*$  como información adicional).

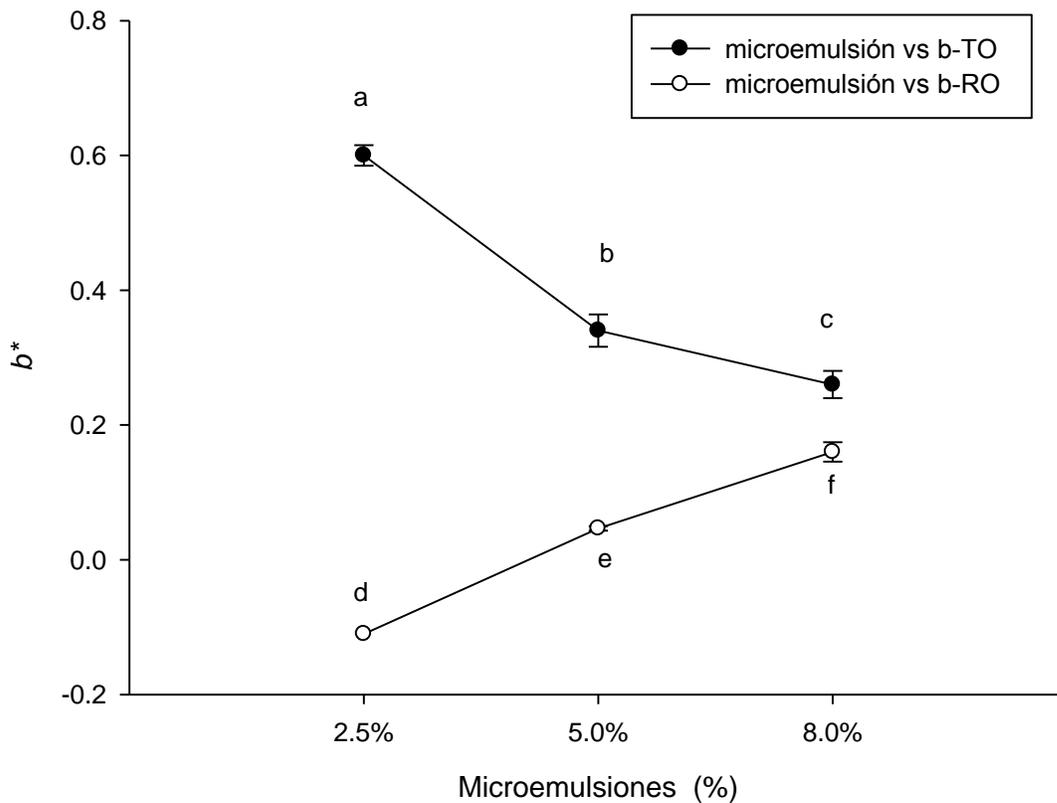


Figura 22. Parámetros de color de  $b^*$ . Literales distintas muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 22 se muestra los parámetros de color de  $b^*$  donde podemos observar que conforme se incrementa la concentración de RO en las microemulsiones, esta tiende a tomar una coloración amarilla. En el caso de las microemulsiones con TO se tuvo un efecto inverso. En general podemos establecer que las microemulsión cargadas con TO representan una mayor coloración amarilla que tiende a disminuir con forme se incrementa la concentración, siendo la más baja concentración la que presentó la mayor coloración amarilla ( $p < 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se pudo observar que las microemulsiones fueron de un tamaño aproximado de 35  $\mu\text{m}$ , con una coloración blanquecina con tendencia también al color amarillo. Con respecto al efecto de las microemulsiones sobre el eritrocito humano, las concentraciones de 2.5 a 8.0% de RO y solo la de 2.5% para TO, presentaron un bajo daño al eritrocito. La formulación de microemulsiones con concentraciones de 5.0 a 8.0% de TO representaron un aumento significativo en el daño eritrocitario. También observamos que las microemulsiones de RO son más efectivas en la protección de agresiones oxidativas al eritrocito humano, que las de TO en todas las concentraciones probadas. En cuanto a la actividad antibacteriana, las microemulsiones de RO a concentraciones altas (8.0 %) lograron inhibir a *E. coli* en un 99 %, mientras que a concentraciones menores, la inhibición de crecimiento bacteriano no es apreciable. Por otro lado, las microemulsiones de TO a 8.0 % y 5.0% lograron inhibir el crecimiento bacteriano en cepas de *E. coli* y *S. aureus* en un 99 % y 100 %, respectivamente.

## RECOMENDACIONES

1. Evaluar la capacidad antibacteriana de estos aceites esenciales separando sus componentes mayoritarios y minoritarios.
2. Exponer estos mismos aceites a otras células humanas, por ejemplos leucocitos, células de la epidermis, entre otras, para evaluar su efecto.
3. Probar esta misma metodología con otros aceites esenciales.
4. Realizar las pruebas estudiadas a diferentes concentraciones de las ya utilizadas.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aboizad M., Asker M. 2013. Chemical Composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of the thyme and rosemary. *Int J Acad Res.* 5(3): 186-195.
- Almengor L. 2009. Nanotecnología en la industria alimentaria. Facultad de Ingeniería, Universidad Rafael Landívar. *Revista Electrónica No. 13:* 35-52.
- Avila-Sosa R, Navarro-Cruz A, Vera-López O, Dávila-Márquez R, Melgoza-Palma N. Meza-Pluma R. 2011. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 15(43): 23-36.
- Beltrán C., Peláez G., Estrada J., Escobar J., Serna L., Ríos D. (2010) Estudio farmacológico para el cuidado de la salud a partir de aceites esenciales obtenidos por destilación de arrastre de vapor. *Investigaciones Andina.* 20: 12–100.
- Benelli G. Canale A. Flamini G. Cioni P. Demi F. Ceccarini L. Macchia M. Conti B. 2013. Biototoxicity of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) essential oil against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and its parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). *Industrial Crops and Products.* 50: 596-603.
- Benites J. Díaz R. López J. Gajardo S. Kush F. Rojas M. 2011. Actividad antioxidante y antimicrobiana de seis cáscaras de frutos de oasis de Pica. *Biofarbo.* 19(1): 1-7.
- Carson CF. Hammer K. Riley T. 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *ClinMicrobiol Rev.* 19(1): 50-62.
- Carson CF. Brian J. Riley T. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agentes Chemother.* 46(6): 1914-1920.
- Castaño M. 2012. Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*), sobre la levadura (*Rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada. Universidad Nacional de Colombia. 4-81.

- Catanzano O. Straccia M, Miro A. Ungaro F. Romano I. Mazzarella G. Santagata G. Quaglia F. Laurienzo P. Malinconico M. 2014. Spray-by-spray in situ cross-linking alginate hydrogels delivering a tea tree oil microemulsion. EUR J PHARM SCI. 66: 20-28.
- Champagne C. P. Fustier P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. Curr Opin Biotechnol. 18(2): 184-190.
- Coma V. Martial-Gros A. Garreaus S. Copinet A. Salin F. Deschamps A. 2002. Edible antimicrobial films base on chitosan matrix. J. FoodSci. 67: 1162-1169.
- Corzo D. 2012. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico/ Evaluation of antimicrobial activity of ethanol extract of *Cestrum buxifolium* Kunth. Rev MexCienc Farm. 43(3): 81-86.
- Cuaron, J. A. 2012. Mechanisms involved in the response and reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to tea tree oil: doctoral dissertation. New Mexico State University. 1-64.
- Garozzo A. Timpanaro R. Stivala A. Bisignano G. Castro A. 2010. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. Antiviral Research. 89(1): 83-88.
- Ehrlich S. 2011. University of Maryland medical center. Obtenido de: <http://umm.edu/health/medical/altmed/herb/rosemary>
- Farah D. Tran D. Masaaki Y. Shinkichi T. 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. Food Control. 19: 346–352.
- Gómez R. Alsina M. Alvarez V. Barba N. Cortés M. Llopis M. Matínez C. 2009. Hemólisis en las muestras para diagnóstico. Elsevier. 2(4): 185-195.
- González V. Rodríguez-Rojo S. Matias A. Nunes A. Nogueira I. Nunes D. Fortunato E. Alves de Matos A. Cocero M. Duarte A. 2014. Development of multicore hybrid particles for drug delivery through the precipitation of CO<sub>2</sub> saturated emulsions. Int J Pharm. 478(1): 9-18.
- Gustafson J. E. Liew Y. C. Chew S. Markham J. Bell H. C. Wyllie S. G. and Warrington J. R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology. 26(3): 194-198.

- Halcón L. Milkus, K. 2004. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *Am J Infect Control*.32(7): 402-408.
- Hammer K. Carson C. Tiley T. Nielsen J. 2005. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology*. 44(5): 616-625.
- Heinzl I. Aschenbroich R. 2014.WATT Global Media. Obtenido de WATT Global Media: [http://www.wattagnet.com/Los\\_aceites\\_esenciales\\_pueden\\_reducir\\_el\\_uso\\_de\\_los\\_anti\\_bi%C3%B3ticos.html](http://www.wattagnet.com/Los_aceites_esenciales_pueden_reducir_el_uso_de_los_anti_bi%C3%B3ticos.html).
- Hyldgaard M. Mygind T. Meyer R. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*. 3(12): 1-20.
- Hu Y. Yang Y. Ning Y. Wang C. Tong Z. 2013. Facile Preparation of Artemisia argyi oil-loaded antibacterial microcapsules by hydroxyapatite-stabilized pickering emulsion templating. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 112: 96-102.
- Jafari S. M. Assadpoor E. Bhandari B. 2008. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *DryingTechnology*. 26(7): 816-835.
- Jiménez F. 2012. Emulsiones Múltiples: Compuestos Bioactivos y Desarrollo de Alimentos Funcionales. *Nutr Hosp*. 28(5): 1413-1421.
- Kim S. Kiong W. Shen S. Dong Y. Tan R. 2009. Phase behavior, microstructure transition, and antiradical activity of sucrose laurate/propylene glycol/the essential oil of *Melaleuca alternifolia*/water microemulsions. *Colloids and Surfaces A: PhysicochemEng Aspects* 348: 289–297.
- Landfester K. 2003. Miniemulsions for nanoparticle synthesis. *Top Curr Shem*. 227: 75-123.
- Liu D. Hu Z. Liu Z, Yang B. Tu W. Li L. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from the cultured mycelia of *Ganoderma japonicum*. *JNMU*. 23(3): 168-172.
- López-Montilla J. Herrera-Morales P. Pandey S. Shah D. 2002. Spontaneous emulsification: mechanisms, physicochemical aspects, modeling, and applications. *J DispersionScience and Technology*. 23(1-3): 219-268.

- Martínez A. 2001. Aceites Esenciales. Facultad Química Farmacéutica. 1-34.
- Minaiyan M. Ghannadi AR. Afsharipour M. Mahzauni P. 2011. Efectos del extracto y aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en la colitis inducida por TNBS en ratas. Res PharmSci. 6(1): 13-21.
- Montoya- López J. Giraldo-Giraldo G. Lucas -Aguirre J. 2012. Determinación del Índice de blancura en harina de trigo comercial. Vitae 19: S415-S416
- Ojeda-Sana A. Baren C. Elechosa M. Juárez M. Moreno S. 2012. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. Food Control. 31(1): 189-195.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Orozco M. Ochoa A. Niño A. 2011. Desarrollo y evaluación de microemulsiones de aceites esenciales de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*), clavo (*syzygiuma romaticum*), canela (*cinnamon verum*) y de una mezcla de extractos cítricos (*citrus paradisi*, *citrus aurantium*, *citrus reticulata* y *citrus sinensis*) como antimicrobianos. XIV congreso nacional de biotecnología y bioingeniería.
- Ortuño M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. 1<sup>ra</sup> ed. España. Editorial AIYANA. 7-21 p.
- Plazas E. 2011. Curso de aceites esenciales: química y proceso de producción. 2-24.
- Ponce AG. Fritz R. Del Valle C. Roura S. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organics Swiss chard. LWT-FoodSciTechnol. 36: 679-684.
- Poyato C. Navarro-Blasco I. Calvo M. Cavero R. Astiasarán I. Ansorena D. 2012. Oxidative stability of O/W and W/O emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. Food Res Int. 51: 132-140.
- Rashid S. Ahmad M. Amin W. Ahmad B. 2013. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. Food Chemistry. 138: 693–700.

- Rau O. Wurglics M. Paulke A. Zitzkowski J. Meindl N. Bock A. Dingermann T. Abdel-Tawab M. Schubert-Zsilavec M. 2006. Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activator receptor gamma. *Planta Med.* 72(10): 881-887.
- Roa J. McClements D. 2012. Food-grade microemulsiones and nanoemulsiones: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids.* 29(2): 326-334.
- Rodríguez S. Varona S. Núñez M. Cocero M. 2012. Characterization of rosemary essential oil for biodegradable emulsions. *Industrial Crops and Products.* 37(1): 137-140.
- Romero R. 2007. *Microbiología y parasitología humana / Microbiology and human parasitology.* México Editorial Médica Panamericana. 3ª edición. Pp. 751
- Rosas-Gallo A. López-Malo A. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 5(1): 41-50.
- Rudbäck J. Bergström M. A. Börje A. Nilsson U. & Karlberg A. T. 2012.  $\alpha$ -Terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure. *CHEM RES TOXICOL.* 25(3): 713-721.
- Ruiz-Márquez D. Partal P. Franco J.M. Gallegos C. 2010. Emulsiones alimentarias aceite-en-agua estabilizadas con proteínas de atún. *Grasas y Aceites.* 61 (4): 352-360.
- Salager J. 1992. El mundo de los surfactantes. Cátedra Hans Neumann de la Escuela de Ingeniería Química de la ULA. Universidad de los Andes. Versión 1: 2-37.
- Salager J. 1999. Formulación, composición y fabricación de emulsiones para obtener las propiedades deseadas. Escuela de Ingeniería Química de la ULA. Universidad de los Andes. Parte B. Versión 2: 1-43.
- Salager J. 1999. Formulación, composición y fabricación de emulsiones para obtener las propiedades deseadas. Escuela de Ingeniería Química de la ULA. Universidad de los Andes. Parte C. Versión 2: 1-19.
- Salvia-Trujillo L. Rojas-Graü A. Soliva-Fortuny R. y Martín-Belloso O. 2015. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids.* 43: 547-556.

- Salmela L. Washington C. 2014. A continuous flow method for estimation of drugs release rates from emulsion formulations. *INT J PHARM.* 472(1-2): 276-281.
- Seenivasan P. Manickam J. Saverimuth I. 2010. *In vitro* la antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med.* 6: 39.
- Söderberg T. A. Johansson A. Gref R. 1996. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology.* 107 (2): 99-109.
- Soltani M. Ghodrathnama M. Ebrahimzadeh-Mosavi H. A. Nikbakht-Brujeni G., Mohamadian S. Ghasemian M. (2014). Shirazi thyme (*Zataria multiflora Boiss*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils repress expression of sagA, a streptolysin S-related gene in *Streptococcus iniae*. *Aquaculture.* 430 (20): 248-252.
- Sundaram S. Anjum S. Dwivedi P. Rai GK. 2011. Antioxant activity and protective effect of Banana peel against oxidative hemolysis of human erythrocyte at different stages of ripening. *Appl Biochem Biotechnol.* 164 (7): 1192-1206.
- Vicente G. 2012. Fraccionamiento y aplicaciones de extractos supercríticos de romero (*Rosmarinus officinalis*). Obtenido de: [https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/11342/56519\\_vicente\\_illera\\_gonzalo.pdf?sequence=1](https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/11342/56519_vicente_illera_gonzalo.pdf?sequence=1).
- Vila R, Cañigüeral S. 2006. El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* en el tratamiento de vulvovaginitis. *Revista de fitoterapia.* 6 (2): 119 – 128.
- Yesil-Celiktas O. Girgin G. Orhan H. Wichers H. J. Bedir E. Vardar-Sukan F. 2007. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. *Eur Food Res Technol.* 224(4): 443-451.
- Zaouali Y. Bouzaine T. y Boussaid M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem Toxicol.* 48(11): 3144-3152.

## ANEXOS

### **1. Preparación de la emulsión usada, método Roa y col. (2012)**

Para la preparación de la emulsión evaluada se añadió en un contenedor el 10% de aceite de limón, 1% de surfactante (tween 80) y 89% de solución buffer (Buffer fosfato 10mM, pH 7.0). Los diferentes componentes fueron mezclados con ayuda de un agitador de alta velocidad durante dos minutos a temperatura ambiente.

La emulsión resultante fue sometida a un homogeneizador de alta presión por tres pasos a 9000 psi para así lograr la formación de una nanoemulsión.

### **2. El tamaño de las micelas, método de Poyato y col. (2012)**

Se tomaron 4 $\mu$ L de la emulsión y se colocó sobre una gota de agua (3 $\mu$ L) previamente depositada en un porta objetos después se cubrió con un cubreobjetos. Las imágenes de las emulsiones fueron monitoreadas y capturadas digitalmente por Nikon DMX-1200. Ese estudio fue realizado por triplicado y las medidas de las partículas fueron determinadas usando la aplicación imagen analysis<sup>AD</sup> 5.0 OlympusBioSystemsGmbH. La distribución de las partículas fue calculada por el diámetro más bajo que 4 $\mu$ L, entre 4 y 7 $\mu$ L, 7 y 10 $\mu$ L y más altos que 10  $\mu$ L.

### **3. Actividad antibacteriana, método de Hu y col. (2013)**

Para la determinación de la sensibilidad bacteriana, Hu y col. realizó una inoculación bacteriana ( $10^6$ - $10^7$  CFU/mL) en caldo nutritivo, después añadieron 0.08 gr de la microemulsión y 1 mL de la inoculación bacteriana a 10 mL de buffer fosfato previamente esterilizado, se llevó a incubación a 37°C por 24 horas con agitación constante. Pasado el tiempo, se diluyó esta suspensión bacteriana en PBS y se colocó 0.1 mL en una placa de agar para después incubar a 37°C durante 24 horas, finalmente se realizó un conteo de colonias.

La suspensión bacteriana desprovista de microcápsulas fue usada como blanco control. Estos experimentos fueron realizados por triplicado.

El efecto antibacterial se consideró como el índice de inhibición de crecimiento bacteriano por la siguiente ecuación:

$$R (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

R= tasa de % inhibición

A= número de colonias de la suspensión control

B= número de colonias de la suspensión con las microcápsulas