

**Evaluación de la acción bactericida de  
aldehído cinámico y aceite esencial de  
eucalipto (*Eucalyptus spp.*) en emulsión**

**Jaime Marcelo Hernández Silva**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Honduras**  
Octubre, 2014

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

# **Evaluación de la acción bactericida de aldehído cinámico y aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) en emulsión**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agroindustrial en el Grado  
Académico de Licenciatura

Presentado por

**Jaime Marcelo Hernández Silva**

**Zamorano, Honduras**

Octubre 2014

# **Evaluación de la acción bactericida de aldehído cinámico y aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) en emulsión**

Presentado por:

Jaime Marcelo Hernández Silva

Aprobado:

---

Mayra Márquez, Ph.D.  
Asesora Principal

---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Director  
Departamento de  
Agroindustria Alimentaria

---

Jorge Cardona, Ph.D.  
Asesor

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

## Evaluación de la acción bactericida de aldehído cinámico y aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) en emulsión

Jaime Marcelo Hernández Silva

**Resumen.** Los aceites esenciales son metabolitos secundarios hidrofóbicos producidos por diversas plantas, su actividad analgésica, antioxidante y antimicrobiana se conoce desde la antigüedad por lo que constituyen una alternativa para la preservación e inocuidad de alimentos. Se investigó la actividad antibacterial de emulsiones de aldehído cinámico (3-fenil 2-propenal) extraído del aceite esencial de canela, y aceite esencial de eucalipto contra tres patógenos de importancia en la industria de alimentos: *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Se usaron los emulsificantes no iónicos Span 20 y Tween 85, y el alcohol Propilenglicol para estabilizar los aceites esenciales en agua. A través de una prueba de Difusión en Agar con Pozo se identificó qué surfactantes y concentraciones de aldehído y aceite esencial de eucalipto fueron más efectivas que otras. El aceite de eucalipto presentó casi ningún efecto sobre los patógenos estudiados. Se determinó la MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) del aldehído emulsificado con Tween 85 y con Span 20, que estuvo por debajo de 0.25% para densidades de patógenos de 4 log UFC y entre 0.25% y más de 2% para poblaciones de 6 log UFC. La MIB (Concentración Mínima Bactericida) estuvo en el rango de 0.25% - 0.5% y entre 0.5% a más de 2% para densidad baja y alta respectivamente. Se condujo una prueba *in vivo* sobre la superficie de tomate, obteniendo una reducción del patógeno inoculado de entre el 95 y 98%, equivalente a aproximadamente 2 log UFC/tomate. Más investigación es requerida para poder determinar la viabilidad del uso industrial de estas emulsiones.

**Palabras Clave.** Antimicrobianos naturales, desinfección, emulsiones, tomate.

**Abstract.** Essential oils are secondary hydrophobic metabolites which are produced by wide range of plants, its analgesic, antioxidant and antimicrobial properties are well known since long time ago so they constitute an alternative for been used in food safety and preservation. This study investigated the antibacterial activity of cinnamaldehyde emulsions (3-fenil 2-propenal) which is extracted from cinnamon bark oil. And eucalyptus oil against three important foodborne pathogens: *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Two nonionic emulsifiers: Tween 85 and Span 20 and alcohol Propilenglicol were used for stabilize these essential oils in water. Through a Well Diffusion Agar Test the more effective emulsions were identified. Eucalyptus oil showed almost no effect against tested pathogens. MIC was determinated for cinnamaldehyde emulsified with Tween 85 and Span 20, it was below 0.25% for 4 log UFC density and between 0.25% and 2% for 6 log UFC density. MIB was found between 0.25%-0.5% and between 0.5% and more than 2% for low and high density respectively. An *In vivo* test was performed on the surface of tomato, obtaining a reduction between 95% and 98%, equivalent to 2 log UFC, of the inoculum. More research is necessary in order to determinate the feasibility of the industrial use of these emulsions.

**Keywords.** Emulsions, natural antimicrobials, sanitizing, tomato.

## CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Página de firmas.....	ii
	Resumen.....	iii
	Contenido.....	iv
	Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>19</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>22</b>

## ÍNDICE DE CUADROS FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diámetros (mm) de la zona de inhibición de tres patógenos expuestos a aldehído cinámico estabilizado con dos emulsificantes empleando tres concentraciones.....	7
2. Diámetros (mm) de la zona de inhibición de tres patógenos expuestos a aceite de eucalipto estabilizado con dos emulsificantes empleando tres concentraciones.....	8
3. Concentración mínima bactericida de aldehído cinámico emulsificado contra los patógenos estudiados, con dos surfactantes y dos densidades de población bacteriana, con un tiempo de exposición de 5 minutos.....	10
4. Concentración mínima inhibitoria de aldehído cinámico emulsificado contra los patógenos estudiados, con dos surfactantes y dos densidades de población bacteriana, con un tiempo de exposición de 5 minutos.....	11
5. Porcentaje de reducción de bacterias en tomate lavado por inmersión con agua o con emulsión de aldehído cinámico al 0.5% durante 5 minutos con agitación leve, con una densidad inicial promedio de 4.3 log UFC/tomate.....	13
<b>Anexos</b>	
	Página
1. Análisis de Varianza y separación de mediad Duncan para la Primera etapa, para el que se tomaron todos los tratamientos y todas las observaciones, sin separaciones por factor.....	22
2. Análisis de Varianza de la Primera etapa para <i>Salmonella</i> y aldehído cinámico	24
3. Análisis de Varianza de la Primera etapa para <i>S. aureus</i> y aldehído cinámico...	24
4. Análisis de Varianza de la Primera etapa para <i>L. monocytogenes</i> y aldehído cinámico.....	25
5. Análisis de Varianza de la Primera etapa para <i>S. aureus</i> y aceite de eucalipto...	25
6. Análisis de Varianza de la Primera etapa para <i>L. monocytogenes</i> y aceite de eucalipto.....	26
7. Análisis estadístico de la Tercera etapa con la variable respuesta Reducción en porcentaje.....	26
8. Análisis estadístico de la Tercera etapa con la variable respuesta Reducción en Log UFC.....	29
9. Costos preliminares (en dólares norteamericanos) de la elaboración de un litro de emulsión de aldehído cinámico al 0.5%.....	31

## 1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son sustancias hidrofóbicas, líquidas a temperatura ambiente, volátiles y usualmente aromáticas, que son sintetizadas por una amplia variedad de plantas y algunos animales como metabolitos secundarios destinados a combatir estrés, infecciones y ataques parasíticos (Mulyaningsih *et al.* 2011). En la actualidad se conocen más de 3000 aceites esenciales de los cuales la mayoría han mostrado propiedades antimicrobianas, antioxidantes e insecticidas generando interés por sus aplicaciones en áreas como la inocuidad de alimentos y el control de plagas (Ayala-Zavala *et al.* 2012).

Al igual que otras plantas aromáticas, la canela (*Cinnamomum zeylanicum*, Lauraceae) ha sido utilizada desde hace miles de años como condimento para añadir sabor a los alimentos y como producto medicinal para tratar todo tipo de problemas de salud (Lang y Buchbauer 2012, Wang *et al.* 2009).

Investigaciones atribuyen las propiedades medicinales de la planta al aceite esencial de la corteza o de las hojas (Singh *et al.* 2007) y sobre todo los compuestos fenólicos que lo conforman (Burt 2004, Wang *et al.* 2010). El aldehído cinámico, de nombre IUPAC (2-E)-3-fenil 2-propenal corresponde al 96-98% del aceite esencial de corteza de canela, siendo componentes minoritarios el  $\alpha$ -Cadineno,  $\alpha$ -Copaeno, entre otros (Singh *et al.* 2007, Keshvari *et al.* 2013).

El aldehído cinámico puro posee actividad inhibitoria contra varias especies de hongos y bacterias, incluyendo muchas de relevancia en la industria de alimentos tales como *Salmonella spp*, *Escherichia coli* O157H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus spp* (Singh *et al.* 2007, Friedman *et al.* 2002, Al-Bayati y Muthanna 2009, Sanla-Ead *et al.* 2011). Otros estudios han determinado la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del aldehído, que es la concentración más baja a la que el compuesto inhibió los microorganismos, osciló entre 800 y 1200 ppm (Sanla-Ead *et al.* 2011).

El género *Eucalyptus*, de la familia Myrtaceae, agrupa aproximadamente 900 especies de árboles y arbustos originarios de Australia. La especie *Eucalyptus globulus* Myrtaceae es una de las más importantes en el mundo y la principal fuente de aceite esencial para la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia (Mulyaningsih *et al.* 2011).

El principal componente del aceite esencial de *E. globulus* es el 1,8-cineol, llamado también eucaliptol, que constituye entre el 75 y 85% del mismo. Otros compuestos presentes son el  $\alpha$ -pineno (4-5%),  $\gamma$ -terpineno (2.5%) y  $\alpha$ -felandreno (1-2%) (Mulyaningsih *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2010).

La eficacia antimicrobiana del aceite de diferentes especies de eucalipto está bien documentada (Safaei-Ghomi y Atefeh 2010, Hassine *et al.* 2012, Panahi *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2010). La MIC del aceite de la mayoría de especies de eucalipto se halla en el rango de 100 a 1000 ppm para la mayoría de bacterias, aunque exista algo de variación entre los resultados reportados debido a las diferencias en composición de los diferentes aceites y el método utilizado. Contra *E. coli* la MIC reportada es de 500 ppm, contra *B. subtilis* la MIC es de 125 ppm, *S. aureus* es de 250 ppm. *Candida albicans* es de 125 ppm (Safaei-Ghomi y Atefeh 2010).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son una de las principales preocupaciones actuales de la industria alimenticia actual (OMS 2013). Estudios recientes han reportado que anualmente se producen 48 millones de casos de ETA en los Estados Unidos produciendo un promedio de 128 000 hospitalizaciones y 3000 muertes, además de millones de dólares en pérdidas (Scharff 2012). *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* están entre las bacterias más incidentes en ETA en los Estados Unidos causando más de un millón y medio de casos en el año 2011, mismo año en el que intoxicación a causa de *L. monocytogenes* fue la tercera causa de muertes relacionadas con alimentos con un total de 255 fallecimientos (Scallan *et al.* 2011).

El número de brotes de ETA relacionadas con frutas y vegetales ha crecido de representar menos de 1% del total de casos de ETA reportados en Estados Unidos en 1970 a más del 12% en la década de 1990 (Lynch *et al.* 2009). En el caso de frutas y vegetales frescos o mínimamente procesados el uso de cloro o compuestos basados en cloro es el método de desinfección más utilizado (Parish *et al.* 2003). Se ha demostrado que la reacción del cloro con materia orgánica resulta en la formación de compuestos trihalometanos que estarían vinculados a varios tipos de cáncer (Lee *et al.* 2007, Parish *et al.* 2003).

Uno de los principales obstáculos para su aprovechamiento a nivel industrial es su no polaridad, volatilidad y reactividad, por lo que se han explorado alternativas como su incorporación a películas comestibles o en forma de nanoemulsiones (Hili *et al.* 1997, Ayala-Zavala 2012, Lang y Buchbauer 2012). Una posible solución para el uso generalizado de estos compuestos es el uso de surfactantes para dispersar sus moléculas en agua, un solvente relativamente abundante y fácil de manipular.

Los objetivos de esta investigación fueron:

- Comparar la efectividad del aceite de eucalipto y aldehído cinámico emulsificados en la inhibición de *Salmonella enteritica*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* con diferentes emulsificantes.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de aldehído cinámico emulsificado con diferentes surfactantes.
- Evaluar el efecto de la densidad de inóculo en la MIC.
- Cuantificar la reducción de la población de patógenos sobre la superficie de tomate (*Lycopersicon esculentum*), causada por la inmersión durante 5 minutos en aldehído cinámico emulsificado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del estudio.** El ensayo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos, perteneciente al Departamento de Agroindustria Alimentaria, de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano localizado en el Km 30 de la vía Tegucigalpa-Danlí, departamento de Francisco Morazán, Honduras.

**Microorganismos.** Fueron evaluadas tres bacterias patógenas: *Salmonella entérica* serovar Typhimurium (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 23593) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112). Para todas las etapas del experimento se utilizaron cultivos puros incubados a 37 °C durante 24±1 horas en 10 ml de Caldo Soya Trypticasa (O'Bryan *et al.* 2008, Zarai *et al.* 2012).

**Aceites esenciales.** Se utilizaron en este estudio: aceite esencial de eucalipto extraído con método de destilación de arrastre con vapor de hojas y corteza de *Eucalyptus globulus*, adquirido en Productos El Arriero, Cr 56B No. 48-18, Medellín, Colombia. El segundo compuesto fue (2-E)-3-fenil 2-propenal, comúnmente llamado aldehído cinámico, extraído del aceite esencial de corteza de canela; que fue proporcionado por la empresa Adiquim S.A. ubicada en Cr 47G No. 78D Sur 80, Sabaneta, Colombia.

**Emulsificantes.** El estudio evaluó dos emulsificantes: Tween 85 y Span 20 para la elaboración de un sistema: aceite esencial – emulsificante – agua. Tween 85 es el nombre comercial del Polioxoetileno sorbitán trioleato, mientras que Span 20 es el nombre del compuesto Sorbitán monolaurato. Ambos compuestos fueron proporcionados por el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano.

**Primera etapa. Prueba de Difusión en Agar con pozo.** Se llevó a cabo para medir la susceptibilidad de los patógenos seleccionados frente a los dos aceites en emulsión a diferentes concentraciones. Se evaluaron cuatro concentraciones de aldehído cinámico: 1.5, 1, 0.5 o 0% siendo la última el control negativo, mientras que el aceite de eucalipto fue usado en concentraciones de 5, 4, 3 o 0% con el respectivo control negativo.

Para la preparación de todas las emulsiones se siguió el mismo procedimiento: se calentó agua esterilizada a 50 °C antes de añadir un volumen de surfactante 3 veces mayor al volumen de aceite requerido para lograr las distintas concentraciones. Se agitó hasta que el surfactante estuvo totalmente disuelto y entonces se añadió el aceite esencial. Se agitó nuevamente hasta que no se observó separación de las fases (Doreen *et al.* 2011).

En un plato de agar Mueller-Hinton se sembró el patógeno de interés con una densidad de 10<sup>6</sup> UFC/ml. Para obtener la concentración deseada se diluyó 1 ml un cultivo de 24 horas

a 37 °C en diluyente de peptona. El método de siembra fue por superficie utilizando un hisopo esterilizado humedecido en el cultivo de la bacteria, el que se frotó sobre toda la superficie del agar 3 veces en distintas direcciones para asegurar crecimiento masivo del microorganismo.

Sobre la superficie seca del agar inoculado se perforaron cuatro pozos utilizando el revés de una pipeta esterilizada de 6 mm de diámetro. Dentro de cada uno de estos pozos se dispensó 0.1 ml de cada emulsión.

Los platos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas y se midió el diámetro en milímetros alrededor de cada pozo en el que no hubo crecimiento microbiano (Al-Bayati y Muthanna 2009). Se reportó el diámetro del pozo, correspondiente a 6 mm, en los casos en que no hubo inhibición, dado que constituye el límite de sensibilidad de la prueba. Cuando dos zonas de inhibición se superponen formando una sola área de no crecimiento, se midió el radio de inhibición correspondiente a cada pozo y se multiplicó por dos (Barry *et al.* 1979).

**Diseño experimental.** Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con un arreglo de tres factores: compuesto activo, tipo de surfactante y concentración. En el análisis estadístico se aplicó una separación de Medias ajustadas por el método de los mínimos cuadrados para determinar si hubo diferencias estadísticas en la interacción de los distintos factores y cuál fue el mejor. Se analizó cada microorganismo por separado para reducir la variabilidad, y también cada aceite por separado dado que las concentraciones no fueron las mismas para ambos compuestos. Se realizó un Test Duncan de separación de medias, comprendiendo todos los datos obtenidos, para comparar en general aldehído cinámico versus aceite de eucalipto.

**Segunda etapa. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria.** Se realizó para determinar cuál es la concentración mínima en la que el aldehído cinámico emulsificado detiene el crecimiento de los patógenos estudiados con un tiempo de exposición de 5 minutos, esto para simular las condiciones del lavado normal de frutas y verduras.

Las concentraciones analizadas fueron de 2, 1, 0.5 o 0.25% escogidas a través de los datos obtenidos en la primer etapa, y se obtuvieron al realizar diluciones seriadas en tubos de Caldo Soya Trypticasa esterilizado (Lambert 2000). Se agregaron 2 ml de una emulsión concentrada de aldehído al 10% a un tubo con 8 ml del caldo logrando una concentración final del 2%. De esta emulsión se tomó una alícuota de 4.9 ml y se traspasó a un segundo tubo con 4.9 ml de caldo esterilizado, para reducir la concentración a la mitad. El proceso fue repetido hasta alcanzar el 0.25% de concentración de aldehído. Del último tubo se desecharon 4.9 ml y del primero 0.2 ml para igualar el volumen de todos (O'Bryan *et al.* 2008).

Cada tubo fue inoculado con 0.1 ml de cultivo puro del patógeno de interés, ajustado a dos concentraciones:  $10^4$  UFC/ml y  $10^6$  UFC/ml, para determinar si la cantidad de microorganismo influye en la eficacia del compuesto, y se agitó por 10 segundos en un vórtex (marca Scientific Industries, modelo Genie 2 SIT286) para asegurar la distribución homogénea de los compuestos y la interacción del microorganismo y del aldehído. A

continuación se dejó reposar durante 5 minutos, que es el tiempo de exposición a evaluar, antes de extraer una alícuota de 20 µl de cada tubo y sembrarla sobre la superficie de Agar soya tripticasa; se incubaron los platos durante 24 horas a 37 °C. Tras ese período se verificó a qué concentraciones existió o no crecimiento bacteriano de manera visual al comparar el crecimiento de la alícuota con el crecimiento de los controles que no fueron sometidos a tratamiento (Smith-Palmer *et al.* 1998). La prueba se realizó por triplicado.

**Diseño experimental.** En esta etapa se utilizó un Diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3×2×2 tomando como factores a los microorganismos, densidad de inóculo y tipo de surfactante respectivamente.

**Tercera etapa. Prueba *in vivo* sobre la superficie de tomate (*Lycopersicon esculentum*).** Este experimento se realizó para medir la capacidad del aldehído emulsificado de reducir la población de patógenos en la superficie de tomate. La concentración utilizada fue de 1% de aldehído cinámico estabilizado con Tween 85 utilizando una proporción de 3:1 surfactante aldehído. Se realizaron tres réplicas.

Para la prueba se siguió el procedimiento de inoculación en punto utilizado por Lang *et al.* (2004) con modificaciones. Cada tomate fue lavado con etanol para disolver cualquier rastro de cera y desinfectar la superficie, enjuagado con agua esterilizada para retirar el alcohol y se le dejó secar al ambiente durante 30 minutos.

Una vez seca la fruta se pipeteó una alícuota de 10 µL de cultivo puro del patógeno con concentración de 10<sup>6</sup> UFC/ml en el área alrededor de la cicatriz del botón floral, con cuidado de no colocar cultivo sobre la cicatriz, y se dejó secar al ambiente por una hora (Lang *et al.* 2004).

Una vez seco el inóculo (aproximadamente una hora), se introdujo asépticamente cada tomate en una bolsa plástica esterilizada conteniendo 200 ml de la emulsión y se aplicó agitación leve en un agitador orbital (marca VWR modelo 5000 STD) a 80 rpm durante 5 minutos. Finalizado el tiempo cada fruta fue traspasada asépticamente a una segunda bolsa esterilizada de contenido 50 ml de Caldo de Neutralización Dey-Engley donde fue masajeadado manualmente por un minuto (Mattson *et al.* 2011). Se tomó a continuación una alícuota de 1 ml de caldo Dey-Engley y se sembró en un plato de medio de cultivo selectivo por el método de vaciado en placa. Los medios utilizados fueron: Agar XLD, agar Oxford Listeria y agar Baird Parker para *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* respectivamente.

Se hicieron dos controles: uno en que el tomate fue inoculado con el patógeno de interés y no recibió tratamiento alguno, pasando directamente al caldo Dey Engley (DE), y otro en el que la fruta inoculada fue lavada por 5 minutos en agua destilada sin aldehído, para comprobar si solamente la acción mecánica del agua contribuye a la disminución de la población bacteriana.

Se realizaron 3 diluciones para cada tomate y se contaron aquellos platos donde la cantidad de colonias se hallaba entre 25 y 250. El resultado que se reportó en esta etapa fue el de UFC/muestra para comparar la reducción de población microbiana con respecto

a los controles. Se realizaron tres repeticiones. La disminución de patógenos en este estudio se obtuvo al comparar la cantidad de bacterias recuperadas después del tratamiento contra las del control sin tratamiento.

**Diseño experimental.** En esta etapa se aplicó un Diseño Completamente al Azar. Se realizó un análisis de Medias Ajustadas por el método de los Mínimos cuadrados para determinar si hubo diferencias en la población bacteriana del tratamiento y los controles, además de una separación de medias ajustadas para establecer en qué caso hubo mayor reducción.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Primera etapa. Prueba de difusión en agar con pozo.** La inhibición de los patógenos estudiados fue cuantificada a través del diámetro de la zona donde no hubo crecimiento microbiano alrededor de cada pozo (Zona de inhibición), utilizando emulsiones con dos surfactantes comerciales: Tween 85 y Span 20, y tres concentraciones. Se utilizó como control negativo un sistema agua – surfactante sin aldehído. Las emulsiones de aldehído cinámico mostraron inhibición en todas las concentraciones utilizadas (Cuadro 1), mientras el aceite esencial de eucalipto tuvo en muchos casos nulo o muy leve efecto inhibidor (Cuadro2).

La concentración 0% de compuesto activo mostró inhibición nula en todos los casos, demostrando que ninguno de los surfactantes inhibió el crecimiento de los microorganismos, confirmando el reporte de Thormar *et al.* (2006) quienes probaron varios surfactantes no iónicos de la familia de Tween sin obtener ningún efecto sobre el crecimiento de *Campylobacter jejuni*.

**Cuadro 1.** Diámetros (mm) de la zona de inhibición de tres patógenos expuestos a aldehído cinámico estabilizado con dos emulsificantes empleando tres concentraciones.

Tratamiento	Patógeno		
	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>Tween 85</b>			
0.5%	16.00 ± 1.00 <sup>c Δ</sup>	26.25 ± 0.50 <sup>c</sup>	20.00 ± 1.00 <sup>d</sup>
1%	25.25 ± 0.95 <sup>b</sup>	36.00 ± 2.00 <sup>b</sup>	31.00 ± 1.00 <sup>c</sup>
1.5%	31.33 ± 1.52 <sup>a</sup>	41.50 ± 1.29 <sup>a</sup>	37.33 ± 4.16 <sup>b</sup>
<b>Span 20</b>			
0.5%	14.25 ± 0.95 <sup>c</sup>	20.75 ± 0.95 <sup>d</sup>	19.66 ± 1.15 <sup>d</sup>
1%	24.75 ± 0.95 <sup>b</sup>	28.25 ± 1.70 <sup>c</sup>	36.33 ± 1.52 <sup>b</sup>
1.5%	29.75 ± 2.21 <sup>a</sup>	36.75 ± 2.50 <sup>b</sup>	49.33 ± 3.05 <sup>a</sup>
<b>CV</b>	6.15%	5.81%	7.05%
<b>R<sup>2</sup></b>	0.99	0.99	0.99

Δ Los valores del cuadro corresponden a Media ± Desviación estándar (n=3).

<sup>abc</sup> Valores con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales.

La reducida actividad antibacterial del aceite de eucalipto no concuerda con reportes anteriores que indicaban actividad a concentraciones bajas como 0.4% contra *S. aureus* o 0.2% contra *Acinetobacter baumannii* (Mulyaningsih *et al.* 2011) o 0.1% frente a bacterias del género *Haemophilus* (Zhang *et al.* 2010). lo que se se puede explicar tanto por la reducción causada por el recubrimiento del surfactante, como por variaciones en la composición química del aceite.

**Cuadro 2.** Diámetros (mm) de la zona de inhibición de tres patógenos expuestos a aceite de eucalipto estabilizado con dos emulsificantes empleando tres concentraciones.

Tratamiento	Patógeno		
	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>Tween 85</b>			
3%	6.00 <sup>Ω</sup> ± 0.00 <sup>Δ</sup>	6.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	9.00 ± 1.00 <sup>c</sup>
4%	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	10.00 ± 1.00 <sup>c</sup>
5%	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	9.33 ± 0.60 <sup>c</sup>
<b>Span 20</b>			
3%	6.00 ± 0.00	9.66 ± 1.15 <sup>b</sup>	15.00 ± 1.00 <sup>b</sup>
4%	6.00 ± 0.00	9.66 ± 1.52 <sup>b</sup>	16.33 ± 0.57 <sup>a</sup>
5%	6.00 ± 0.00	11.33 ± 0.57 <sup>a</sup>	16.33 ± 0.57 <sup>a</sup>
<b>Propilenglicol</b>			
3%	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	8.33 ± 0.57 <sup>d</sup>
4%	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	9.00 ± 1.00 <sup>c</sup>
5%	6.00 ± 0.00	6.33 ± 0.57 <sup>c</sup>	9.00 ± 1.00 <sup>c</sup>
CV	-	8.07%	6.90%
R <sup>2</sup>	-	0.93	0.97

Ω Valores de 6 mm no se consideran inhibición, corresponden al diámetro del pozo.

Δ Los valores del cuadro corresponden a Media ± Desviación estándar (n=3).

<sup>abc</sup> Valores con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales.

Investigaciones han demostrado que el compuesto 1,8-Cineol es el principal responsable de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (Panahi *et al.* 2011). No obstante en muchas especies de eucalipto el contenido de esta molécula varía entre diferentes partes de la planta, en *Eucalyptus oleosa* se determinó que existían diferencias significativas en la composición del aceite esencial de tallo, hojas, flores y frutos, con un rango de contenido de 1,8-cineol de entre 8 y 47% (Ben Marzoug *et al.* 2011). El aceite esencial utilizado en este estudio fue extraído a partir de hojas, corteza y ramas, que

podieron incluir flores inmaduras entre otros órganos vegetales que resultaron en un aceite con concentración muy baja de 1,8-cineol que atenúa la actividad contra microorganismos a concentraciones por debajo del 5%.

La interacción de los factores aceite, emulsificante y concentración fue significativa ( $P < 0.0001$ ) para todos los microorganismos, a excepción de *Salmonella* en la cual el emulsificante no presentó diferencias ( $P = 0.376$ ) y tampoco la interacción de éste factor con la concentración ( $P = 0.418$ ). La concentración por sí sola fue influyente en la inhibición de las tres bacterias ( $P < 0.001$ ) y en el análisis por separado de cada aceite también mostró ser significativa por lo que se afirma que a mayor concentración hay mayor diámetro de inhibición.

Las emulsiones de aceite de eucalipto solamente presentaron diferencias cuando se usó Span 20 frente a Tween 95 y Propilen glicol, dentro de los tratamientos con Span no hubo diferencias estadísticas entre concentraciones, lo que demuestra que al utilizar este aceite en emulsiones con Span no hay diferencias en aumentar la concentración por encima del 3%.

Es muy difícil realizar comparaciones numéricas con otros estudios debido a las diferencias entre metodologías utilizadas en las que varían los solventes utilizados para diluir los aceites esenciales, las cantidades dispensadas, las concentraciones empleadas, el tamaño de pozo o el número de pozos por plato Petri; puede haber así mismo variaciones en la susceptibilidad de distintas cepas del mismo microorganismo (Friedman *et al.* 2002).

Sanla-Ead *et al.* (2011) reportaron un diámetro de inhibición promedio de 30.1 milímetros para *L. monocytogenes*, 28.9 mm para *S. aureus* y 22 mm para *Salmonella* Enteritidis. Los resultados de este estudio confirman los reportes de que las bacterias Gram negativas, como *Salmonella*, son más resistentes a la acción de los aceites esenciales que las Gram positivas (Sanla-Ead *et al.* 2011, Panahi *et al.* 2011, Al-Bayati y Muthanna 2009) y que dentro de éste último grupo, *L. monocytogenes* se encuentra entre las más resistentes.

La diferencia fundamental entre Tween 85 y Span 20 es el Balance Hidrofílico – Lipofílico (HLB por sus siglas en inglés) que es el indicador más importante de solubilidad en agua de una molécula anfipática y por lo tanto un factor determinante en el tipo de emulsión que pueden formar (Mahmoud Gad y Khairou 2008). Ambos son surfactantes no iónicos lo que quiere decir que su capacidad emulsionante depende exclusivamente del ordenamiento de grupos polares y no polares, al contrario de los surfactantes iónicos que poseen aniones o cationes en su estructura que les permiten reaccionar con la fase hidrofílica de una emulsión, como ocurre con la mayoría de los detergentes.

Span 20 es el nombre comercial de la molécula Sorbitan monolaurato que está compuesta de un derivado del sorbitol llamado sorbitán, unido mediante un enlace éster a una molécula de ácido láurico, su HLB es de 8.6. El Tween 85 corresponde a la molécula de Polioxietileno sorbitan trioleato cuyo HLB es 11.0 y está conformada por una molécula de sorbitan unida mediante cadenas de polietilenos a tres cadenas de ácido oleico. (deMan 1999, Mahmoud Gad y Khairou 2008)

Debido a esta diferencia estructural, el Span 20 es más propicio a formar un arreglo de bicapa, con sus moléculas alineadas en dos hileras con los grupos no polares hacia dentro y los no polares hacia fuera. Al contrario, Tween 85 forma micelios, en los que los grupos polares migran al exterior y los no polares se concentran en el centro formando una forma más o menos esférica con el centro no polar (Hasenhuettl y Hartel 2008).

Estos arreglos moleculares ayudan a explicar las diferencias obtenidas debido a que un arreglo de bicapa como el de Span dejaría partes de la molécula de aldehído descubiertas dando mayor facilidad para que interactúen con la célula, sobretodo de *L. monocytogenes*. En el caso del micelio formado por el Tween envuelve completamente al aldehído haciendo más difícil que la molécula entre en contacto con la bacteria. *S. aureus*, por su mayor susceptibilidad necesitaría de menor cantidad de moléculas de aldehído para detener su crecimiento, por lo que el aldehído estabilizado con Tween fue más eficaz aunque haya estado menos disponible, debido a que este surfactante es más estable y permite una distribución más homogénea del compuesto.

**Segunda etapa. Concentración mínima inhibitoria y bactericida.** Las concentraciones mínimas de aldehído cinámico en las que los patógenos estudiados no proliferaron después de estar expuestos durante 5 minutos a la emulsión se determinaron en el rango de 2 a 0.25% (Cuadro 3). Se consideró inhibición al crecimiento de microorganismos en una densidad menor que la del control negativo sin aldehído, mientras que ausencia de crecimiento se reportó como actividad bactericida.

**Cuadro 3.** Concentración mínima bactericida de aldehído cinámico emulsificado contra los patógenos estudiados, con dos surfactantes y dos densidades de población bacteriana, con un tiempo de exposición de 5 minutos.

Patógeno	Tween 85		Span 20	
	10 <sup>6</sup> UFC/ml	10 <sup>4</sup> UFC/ml	10 <sup>6</sup> UFC/ml	10 <sup>4</sup> UFC/ml
<i>Salmonella</i>	> 2%	1%	> 2%	0.25%
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 2%	> 2%	> 2%	0.50%
<i>Listeria monocytogenes</i>	> 2%	0.50%	> 2%	0.25%

Se realizaron tres repeticiones del experimento, reportando las concentraciones que mostraron en al menos dos ocasiones el efecto bactericida. Los mejores resultados se lograron con Span 20 y un inóculo bajo; las concentraciones requeridas para eliminar las poblaciones con alta densidad quedaron fuera del límite de cálculo de la prueba.

En el Cuadro 4 se puede observar las concentraciones mínimas a las que el crecimiento de los patógenos fue disminuido. Igual que en la prueba de Difusión en Agar, los mejores resultados se lograron con Span 20 y contra el inóculo más bajo (10<sup>4</sup> UFC/ml). Lambert

(2000), demostró que en pruebas de Concentración mínima inhibitoria la densidad de inóculo es determinante en el resultado obtenido, lo que queda confirmado en este estudio.

**Cuadro 4.** Concentración mínima inhibitoria de aldehído cinámico emulsificado contra los patógenos estudiados, con dos surfactantes y dos densidades de población bacteriana, con un tiempo de exposición de 5 minutos.

Patógeno	Tween 85		Span 20	
	10 <sup>6</sup> UFC/ml	10 <sup>4</sup> UFC/ml	10 <sup>6</sup> UFC/ml	10 <sup>4</sup> UFC/ml
<i>Salmonella</i>	1%	0.25%	0.25%	< 0.25%
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 2%	> 2%	0.5%	< 0.25%
<i>Listeria monocytogenes</i>	< 0.25%	0.25%	<0.25%	< 0.25%

Estos resultados son numéricamente similares a otros reportados anteriormente, que determinaron valores de MIC de aldehído cinámico de: 0.62% para *L. monocytogenes* y *Salmonella*, y de 0.15% para *S. aureus* (Sanla-Ead *et al.* 2011) pero más importante concuerdan en señalar que *Salmonella* y *L. monocytogenes* tienen valores similares de inhibición como se puede observar en los resultados de inóculos bajos del Cuadro 3 y Cuadro 4. Otras investigaciones han encontrado valores mucho más reducidos como 62 ppm contra *S. aureus* (Al-Bayati y Muthanna 2009) o 0.05% contra *Salmonella*, 0.03% contra *L. monocytogenes* y 0.04% contra *S. aureus* (Smith-Palmer *et al.* 1998). La comparación no es válida porque que el tiempo de exposición fue de 24 horas en los estudios antes mencionados.

La determinación de Concentración Mínima Inhibitoria y Mínima Bactericida es un análisis mucho más sensible y acertado para medir la acción de los compuestos de interés que la prueba de Difusión en Agar, la cual es una herramienta exploratoria (Smith-Palmer *et al.* 1998).

En este estudio las bacterias más susceptibles fueron: *L. monocytogenes* y *Salmonella*, siendo *S. aureus* más resistente al requerir de una mayor concentración tanto para reducir el crecimiento como para destruir a la bacteria, lo que resulta contradictorio con los resultados del test de Difusión en Agar y lo reportado en estudios previos (Sanla-Ead *et al.* 2011, Al-Bayati y Muthanna 2009). Tomando en cuenta que la principal diferencia entre los dos test fue el tiempo de exposición, es posible que la molécula activa tenga efectos diferentes en distintas especies de bacterias provocando que el tiempo necesario para que sea efectiva sea diferente entre Gram positivos y Gram negativos y aún diferente para diferentes especies dentro de estos dos grupos. Igualmente hay que considerar el efecto que tiene el surfactante en la efectividad del aceite esencial, dado que el surfactante recubre total o parcialmente la molécula (Hasenhuettl y Hartel 2008).

Esto no se puede asegurar dado que el mecanismo de acción del aldehído, al igual que del resto de aceites esenciales, no se ha determinado todavía. Las hipótesis más aceptadas actualmente implican la reducción en la producción de energía dentro de la célula. Gill y Holley (2004), propusieron una explicación en que la interacción entre el aldehído y la membrana celular causa una interrupción suficiente en ésta como para provocar la fuga de iones y así afectar el funcionamiento de la bomba de protones disminuyendo la generación de ATP dentro de la célula, pero sin causar fuga de moléculas de ATP a través de la membrana. No obstante se ha propuesto que diferentes aceites esenciales podrían poseer diferentes mecanismos de acción como es el caso de carvacrol (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O) sobre el que se demostró que una concentración de 150 partes por millón disipa el gradiente de pH en la membrana citoplasmática, pero sin afectar los niveles de glucosa o de generación de energía en la célula (Gill y Holley 2004).

**Tercera etapa. Prueba *in vivo* sobre superficie de tomate.** A pesar de los diversos métodos de desinfección empleados actualmente en la industria alimentaria, cada año se reportan brotes de ETA relacionados con frutas que han pasado por alguno de éstos procesos (Mattson *et al.* 2011). Esta prueba se realizó para comprobar la eficacia de la emulsión de aldehído cinámico al 0.5% en la reducción de patógenos inoculados sobre la superficie de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Solanaceae).

Existió una alta variabilidad en la recuperación de patógenos de la superficie de tomate entre cada repetición. El tiempo y las condiciones de secado del inóculo en el método de siembra por punto afectan la recuperación debido a la muerte del microorganismo, reportándose anteriormente una reducción de 0.8 log entre el inóculo sembrado sobre la superficie de tomate y la densidad de la bacteria recuperada (Lang *et al.* 2004). A parte de la muerte del microorganismo, la formación de biopelículas y la penetración de la bacteria a través de la cáscara son factores que afectan la eficacia del tratamiento y de la recuperación de microorganismos (Sapers y Jones 2006).

Para reducir la variabilidad a causa de números dispares de bacterias, se calculó cual fue la reducción porcentual de la población bacteriana de los dos tratamientos: lavado con agua esterilizada, y lavado con emulsión, frente al control inoculado sin tratamiento, utilizando la Ecuación 1.

$$\%Reducción = \left(1 - \frac{\text{Conteo bacterias tratamiento}}{\text{Conteo bacterias control}}\right) \times 100 \quad [1]$$

Para el análisis de estos datos se tomó al microorganismo como un factor para explorar las diferencias entre los dos lavados en distintos microorganismos. La interacción entre microorganismo y tratamiento fue estadísticamente significativa (P<0.0001).

En *Salmonella* y en *S. aureus* existieron diferencias en la reducción de la población bacteriana al comparar la aplicación de la emulsión con la aplicación de agua. La diferencia más grande se vio en *S. aureus* con un 40% de diferencia promedio entre ambos tratamientos (Cuadro 5).

En el caso de *L. monocytogenes* el lavado con agua no fue estadísticamente diferente del lavado con emulsión. Esto puede deberse a diferencias en el comportamiento de este patógeno sobre la superficie de tomate, con respecto los otros patógenos evaluados.

**Cuadro 5.** Porcentaje de reducción de bacterias en tomate lavado por inmersión con agua o con emulsión de aldehído cinámico al 0.5% durante 5 minutos con agitación leve, con una densidad inicial promedio de 4.3 log UFC/tomate.

Patógeno	Tratamiento		
	Agua	Emulsión	
<i>Salmonella entérica</i>	82.67 ± 13.04 <sup>a(y)Δ</sup>	98.46 ± 2.24 <sup>a(x)</sup>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	59.69 ± 14.79 <sup>b(y)</sup>	98.29 ± 1.78 <sup>a(x)</sup>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	93.78 ± 2.38 <sup>a(x)</sup>	95.99 ± 3.06 <sup>a(x)</sup>	
CV	9.4%	R <sup>2</sup>	0.8

<sup>abc</sup> Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (P<0.05) al comparar por columna

<sup>(xyz)</sup> Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (P<0.05) al comparar por fila.

Δ Los valores del cuadro corresponden a Media ± Desviación estándar (n=3).

Investigaciones anteriores han encontrado reducción en la efectividad de tratamiento con cloro contra *L. monocytogenes* dependiendo del tiempo transcurrido entre la contaminación y la aplicación del tratamiento, debido a la adhesión del microorganismo a la superficie del tomate y a la migración de las bacterias a la capa subsuperficial de la fruta (Oluwatosin *et al.* 2011). El mismo estudio determinó que al usar un tratamiento de cloro a 200 ppm existe una variación de hasta 1.2 log en la reducción de *Listeria* una vez transcurridos 30 minutos desde la inoculación, debido a la dificultad del compuesto activo en atacar las células adheridas a las capas superficiales y subsuperficiales del tomate.

Es probable que lo mismo haya ocurrido con la emulsión de aldehído cinámico, que no pudo llegar en cantidades significativas a las células que se encontraban en las capas menos superficiales del tomate. Esto implica que la reducción en la densidad de *L. monocytogenes* se debió más a la acción mecánica de la emulsión, que desprendió entre el 93 y 95% del patógeno, que a la muerte de las células por acción del aldehído.

Estos reportes concuerdan con Beuchat y Brackett (1991) quienes determinaron que no existía reducción significativa en la población de *L. monocytogenes* en tomates enteros inoculados, al aplicar un tratamiento de inmersión en solución de cloro entre 210 y 280 ppm de concentración, y que de hecho había un aumento en la población del patógeno tras 2 días de almacenamiento a 21 °C. Queda claro que es más difícil la eliminación de *Listeria* de la superficie de tomate, de lo que sería en el caso de otros patógenos.

Los resultados obtenidos están por debajo, en efectividad, de estudios previos sobre la actividad del aldehído cinámico, entre otros compuestos vegetales, contra *Salmonella* en la superficie de tomates. En éstos se obtuvo que aldehído cinámico diluido al 0.75% en DMSO y agua redujeron hasta 7.0 log UFC del patógeno inoculado en tomates tras tres minutos de lavado. Similares resultados se obtuvieron con Carvacrol, molécula obtenida del aceite esencial de orégano, que redujo la presencia de *Salmonella* hasta debajo de los límites de detección, con concentraciones dentro del rango 0.25% - 0.75% (Mattson *et al.* 2011).

El efecto del emulsificante es perjudicial para la actividad antibacterial de los compuestos fenoles, como el aldehído y la mayoría de aceites esenciales (Prasad Yadav *et al.* 2013), lo que explica que la reducción reportada en este estudio no sea de la magnitud que la del aldehído en dilución o la de otros desinfectantes probados por otros autores.

Agua neutra electrolizada a una concentración de 89 ppm redujo 4.3 log UFC de *Salmonella enteritidis* y 4.6 log UFC de *L. monocytogenes* tras un lavado de 5 minutos sobre la superficie de tomate. Las diferencias en concentración se deben a que los mecanismos de acción de aldehído y el agua neutra electrolizada son muy diferentes, siendo ésta última antibacterial por su contenido de iones de cloro y su alto potencial óxido reducción (Deza *et al.* 2003).

En cuanto al uso de cloro, concentraciones de 200 ppm disueltas en agua fueron probadas con otros tiempos de lavado y no mostraron tanta eficacia sobre la superficie de tomate, obteniendo una reducción de 1.7 log UFC contra *Escherichia coli* tras 3 minutos de lavado por inmersión (Sapers y Jones 2006) y de 1.2 log UFC contra *L. monocytogenes* tras un lavado por inmersión de un minuto (Oluwatosin *et al.* 2011).

También se ha probado el uso de peróxido de hidrógeno contra *E. coli* obteniendo reducciones de 1.4 log UFC con solución de peróxido al 1% y tiempo de lavado de 15 minutos. Concentraciones más altas de peróxido, de 5%, redujeron hasta en 2 log UFC la población de *E. coli* (Sapers y Jones 2006).

Las reducciones estadísticamente iguales de las poblaciones de patógenos sobre el tomate no concuerdan con los datos diferentes obtenidos en la primera y en la segunda etapa, lo que se explica debido a las diferencias en el tiempo de exposición, ya que la emulsión estuvo difundida en el agar durante las 24 horas de la incubación.

Era previsible que los tres microorganismos presentaran una reducción similar y cercana al 100% esto es con conteos de UFC recuperadas de los tomates tratados a los límites de detección, ya que se empleó la concentración mínima bactericida obtenida para *S. aureus* en la Segunda etapa, la cual es mayor que la requerida para los otros dos patógenos (Cuadro 3). El hecho de que no hubiera una reducción del 100% o hasta debajo de los límites detectables, se puede deber a las células que se infiltran en la capa subsuperficial del tomate.

Las diferencias halladas en *Salmonella* y en *S. aureus* entre el lavado con agua y con emulsión se pueden explicar con el efecto bactericida del aldehído cinámico sobre las células, que en un tiempo de exposición de 5 minutos mostraron efecto bactericida.

Por otro lado la presencia del emulsificante afecta las propiedades reológicas de la emulsión en comparación con las del agua pura, alterando el efecto que ésta pudo tener sobre la superficie del tomate y por lo tanto del inóculo. Está comprobado que a medida que aumenta la concentración de emulsificante no iónico en el sistema, la tensión superficial decrece en casi  $30 \text{ mN m}^{-1}$  por cada aumento de  $1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  de concentración de surfactante no iónico (Zhang *et al.* 2005). Tomando en cuenta que el peso molecular de el Span 20 es de  $346.46 \text{ g mol}^{-1}$  (Sigma Aldrich s.f.) el resultado es que se tienen alrededor de  $0.043 \text{ moles l}^{-1}$  de concentración, lo que implica una reducción en la tensión superficial del agua de  $13000 \text{ mN m}^{-1}$  o  $13 \text{ N m}^{-1}$ .

La reducción en la tensión superficial se debe a que la molécula de surfactante interactúa de varias formas con la molécula de solvente (puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals) lo cual reduce la energía libre total del sistema, y por lo tanto la energía tensión superficial, entre otras propiedades del fluido (Wang *et al.* 2005). Dichos cambios tienen un efecto positivo en la eficacia de la emulsión en tanto que a medida que se reduce la tensión superficial del líquido, crece la capacidad de ese fluido para mojar efectivamente una superficie pues aumenta su capacidad de extenderse (Kumar y Errington 2013) y así poder alcanzar mejor las células de los patógenos adheridas a la superficie del tomate ya a nivel molecular.

Las propiedades reológicas de las emulsiones así como los mecanismos biológicos de los aceites esenciales no están plenamente dilucidados (Mattson *et al.* 2011, Gill y Holley 2004, Kumar y Errington 2013) por lo que los mecanismos antes explicados no se pueden probar fehacientemente.

## 4. CONCLUSIONES

- El aldehído cinámico emulsificado fue mas efectivo que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* en la inhibición de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.
- Emulsiones de aldehído estabilizadas con Span 20 (HLB = 8.6) o con Tween 85 (HLB = 11.0) no presentaron diferencias en la inhibición de *Salmonella*. Sí hubo diferencias con los otros patógenos estudiados.
- Hay diferencias en la Concentración Mínima Inhibitoria cuando se utilizan densidades de 4 log UFC y de 6 log UFC.
- La MIC de aldehído emulsificado contra los tres patógenos estudiados, con densidad de 4 log UFC fue menor a 0.25%. Con una densidad de 6 log UFC la MIC de *S. aureus* fue de 0.5% de aldehído, de *Salmonella* y de *L. monocytogenes* fue de 0.25%. En todos los casos la mejor emulsión fue estabilizada con Span 20.
- La inmersión de tomate en emulsión de aldehído cinámico al 0.5% redujo la carga de patógenos en 96% - 98% con respecto a tomates no tratados, lo cual representa una reducción de 2 log UFC aproximadamente.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Realizar estudios de las propiedades físicas y de estabilidad de emulsión para el sistema aldehído – Span 20 – agua, al 0.5% de concentración, para obtener información que ayude a explicar y predecir su comportamiento antimicrobiano.
- Realizar un estudio de campo para evaluar la eficacia de la emulsión de aldehído al 0.5% en condiciones menos controladas: utilizando agua potable y teniendo presencia de materia orgánica y microbiota natural en la fruta.
- Realizar pruebas de laboratorio y de campo probando la emulsión de aldehído al 0.5% en la superficie de otras frutas y vegetales de características diferentes al tomate.
- Sustituir el Span 20 y el Tween 85 por emulsificantes de origen natural que tengan valores de HLB similares, y evaluar cómo se ve afectada la actividad antimicrobiana en comparación con los resultados de este estudio.

## 6. LITERATURA CITADA

Al-Bayati, F. y M. Muthanna, 2009. Isolation, identification, and purification of cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark oil. An antibacterial study. *Pharmaceutical Biology*, 47(1) 61-66.

Ayala-Zavala, J., B. Silva-Espinoza, M. Cruz-Valenzuela, J. Leyva, L. Ortega-Ramírez, D. Carrasco-Lugo, J. Pérez-Carlón, B. Melgarejo-Flores, G. González-Aguilar y M. Miranda. 2012. Pectin-cinnamon leaf oil coatings add antioxidant and antibacterial properties to fresh cut peach. *Flavour and Fragrance Journal*, 28, 39-45.

Barry A., M. Coyle, C. Thornsberry, E. Gerlach y R. Hawkinson. 1979. Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(6), 885-889.

Ben Marzoug, H., M. Romdhane, A. Lebrihi, F. Mathieu, F. Coudere, M. Abderraba, M. Larby Khouja y J. Bouajila. 2011. *Eucalyptus oleosa* Essential oils chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts. *Molecules*, 16, 1695-1709.

Berger, C., S. Sodha, R. Shaw, G. Patricia, D. Pink, P. Hand y G. Frankel. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385-2397.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

deMan, J. 1999. *Principles of Food Chemistry*. 3ra Ed. Ontario, Springer.

Deza, M., M. Araujo y M. Garrido. 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 482-487.

Doreen, S., L. Rose, H. Suhaimi, H. Mohamad, M. Rozaini y M. Taib. 2011. Preliminary evaluation on the antibacterial activities of *Citrus hystrix* oil emulsions stabilized by Tween 80 and Span 80. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 3(2), 209-211.

Friedman, M., P. Henika y R. Mandrell. 2002. Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*,

*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection, 65(10)1545-1560.

Gill, A., y R. Holley. 2004. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. Applied and Environmental Microbiology, 70(10), 5750–5755.

Hasenhuettl, G., y R. Hartel. 2008. Food Emulsifiers and Their Applications. Springer.

Hassine, D., M. Abderrabba, Y. Yvon, A. Lebrihi, F. Mathieu, F. Coudere y J. Bouajila, 2012. Chemical composition and in vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Ecualiptus gillii* essential oil and extracts. Molecules, 17, 9540-9558.

Hili, P., C. Evans y R. Veness. 1997. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. Letters in Applied Microbiology, 24, 269-275.

Keshvari, M., S. Asgary, J.D. Abbas, S. Najafi y S. Ghoreyshi-Yazdi. 2013. Preventive effect of cinnamon essential oil on lipid oxidation of vegetable oil. ARYA Atheroscler, 9(5), 280-286.

Kumar, V y J. Erringto. 2013. Understanding wetting of immiscible liquids near a solid surface using molecular simulation. The Journal of Chemical Physics, 139, 1-14.

Lambert, R. 2000. Susceptibility testing: inoculum size dependency of inhibition using the Colworth MIC technique. Journal of Applied Microbiology, 89, 275-279.

Lang, G., y G. Buchbauer. 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. Flavour and Fragrance Journal, 27, 13-39.

Lang, M., L. Harris y L. Beuchat. 2004. Evaluation of Inoculation Method and Inoculum Drying Time for Their Effects of Survival and Efficiency of recovery of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* Inoculated on the Surface of Tomatoes. Journal of Food Protection, 67(4), 732-741.

Lee, J., D. Lee y J. Sohn. 2007. An experimental study for chlorine residual and trihalomethane formation with rechlorination. Water Science and Technology, 55(1-2), 307-313.

Lynch, M., R. Tauxe y C. Hedberg. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. Epidemiology and Infection, 137(3), 307-315.

Mahnمود Gad, E. y S. Khairou. 2008. QSPR for HLB of Nonionic Surfactant Based on Polyoxyethylene Group. Journal of Dispersion Science and Technology, 29, 940-947.

Mattson, T., A. Johny, M. Amalaradjou, K. More, D. Schreiber, J. Patel y K. Venkitanarayanan. 2011. Inactivation of *Salmonella spp.* on tomatoes by plant molecules. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 464-468.

Mulyaningsih, S., F. Sporer, J. Reichling y M. Wink. 2011. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical Biology*, 49(9), 893-899.

O'Bryan, C., P. Crandall, V. Chalova y S. Ricke. 2008. Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella spp.* *Journal of Food Science*, 73(6), 264-267.

Oluwatosin, A., A. Ijabadeniyi, y E. Buys. 2011. Effect of attachment time followed by chlorine washing on the survival of inoculated *Listeria monocytogenes* on tomatoes and spinach. *Journal of Food Quality*, 34, 133-141.

Organización Mundial de la Salud. 2013. Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Recuperado el 17 de Julio de 2013, de Sitio web de la OMS: [http://www.who.int/foodborne\\_disease/en/](http://www.who.int/foodborne_disease/en/)

Panahi, Y., M. Sattari, A. B. Babaie, R. Ranjbar, A. Hedaiat y M. Bigdeli. 2011. The essential oils activity of *Eucalyptus polycarpa*, *E. largiflorence*, *E. mallidora* and *E. camaldulensis* on *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1), 43-48.

Parish, M., L. Beuchat, T. Suslow, L. Harris, E. Garrett, J. Farber y F. Busta. 2003. Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 161-173.

Prasad Yadav, N., J. Gopal Meher, N. Pandey, S. Luqman, K. Singh Yadav y D. Vhanda. 2013. Enrichment, Development, and Assesment of Indian Basil Oil Based Antiseptic Cream Formulation Utilizing Hydrophilic-Lipophilic Balance Approach. *BioMed Research International*, 2013, 1-9.

Safaei-Ghomi, J. y A. Atefeh. (2010). Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacognosy Magazine*, 6(23), 172 - 175.

Sanla-Ead, N., A. Jangchud, V. Chonhenchob y P. Suppakul. 2011. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films. *Packaging Technology and Science*, 25, 7-17.

Sapers, G. y D. Jones. 2006. Improved Sanitizing Treatments for Fresh Tomatoes. *Journal of Food Science*, 71(7), 252-256

Scallan, E., P. Griffin, F. Angulo, R. Tauxe y R. Hoekstra. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States. (CDC, Ed.) *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 16-22.

Scharff, R. 2012. Economic Burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States. *Journal of Food Protection*, 75(1), 123-131.

Singh, D., S. Maurya, M. DeLampasona y C. Catalan. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils oleoresins and their constituents. *Food and chemical toxicology*, 45, 1650-1661.

Smith-Palmer, A., J. Stewart y L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 118-122.

Thormar, H., H. Hilmarsson y G. Bergsson. 2006. Stable Concentrates Emulsions of the 1-Monoglyceride of Capric Acid (Monocaprin) with Microbicidal Activities against the Food-Borne Bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 522-526.

Wang, H. F., K. Yih y K. Huang. 2010. Comparative Study of the Antioxidant Activity of Forty-five Commonly Used Essential Oils and their Potential Active Components. *Journal of Food and Drug Analysis*, 18(1), 24-33.

Wang, R., R. Wang y B. Yang. 2009. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 289-292.

Wang, Z., J. Feng, H. Wang y Z. Cui. 2005. Effectiveness of Surface Tension Reduction by Nonionic Surfactants with Quantitative Structure-Property Relationship Approach, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 26, 441-447.

Zarai, Z., L. Chobba, R. Mansour, A. Bekir, N. Gharsallah y A. Kadri. 2012. Essential oil of the leaves of *Ricinus communis* L.: In vitro cytotoxicity and antimicrobial properties. *Lipids in Health and Disease*, 11, 102-109.

Zhang, J., M. An, H. Wu, R. Stanton y D. Lemerle. 2010. Chemistry and bioactivity of *Eucalyptus* essential oils. *Allelopathy Journal*, 25(2), 313-330.

Zhang, Z., G. Xu, F. Wang y G. Du. 2005. Aggregation Behaviors and Interfacial Properties of Oxyethylated Nonionic Surfactants. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 26, 297-302.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis de Varianza y separación de mediad Duncan para la Primera etapa, para el que se tomaron todos los tratamientos y todas las observaciones, sin separaciones por factor.

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mm Mean
0.994333	7.321210	1.004845	13.72512

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
bacteria	2	619.59084	309.79542	306.82	<.0001
aceite	1	12445.22693	12445.22693	12325.5	<.0001
emuls	2	84.62776	42.31388	41.91	<.0001
concen	6	12050.94374	2008.49062	1989.17	<.0001
bact*acei*emul*conce	48	1551.20093	32.31669	32.01	<.0001

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	151
<b>Error Mean Square</b>	1.009713
<b>Harmonic Mean of Cell Sizes</b>	70.19344

<b>Number of Means</b>	2	3
<b>Critical Range</b>	.3351	.3527

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>Duncan Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>bacteria</b>
A	15.3636	66	Listeria
B	14.5479	73	Staphylo
C	11.3889	72	Salmonel

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	151
<b>Error Mean Square</b>	1.009713
<b>Harmonic Mean of Cell Sizes</b>	101.5166

<b>Number of Means</b>	2
<b>Critical Range</b>	.2787

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>Duncan Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>aceite</b>
A	23.0000	85	Aldehído
B	7.4683	126	Eucalipt

**Anexo 2.** Análisis de Varianza de la Primera etapa para *Salmonella* y aldehído cinámico.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	7	2675.800000	382.257143	283.47	<.0001
<b>Error</b>	22	29.666667	1.348485		
<b>Corrected Total</b>	29	2705.466667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mm Mean
0.989035	6.154997	1.161243	18.86667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>emuls</b>	1	1.100595	1.100595	0.82	0.3761
<b>concen</b>	3	2670.720467	890.240156	660.18	<.0001
<b>emuls*concen</b>	3	3.978938	1.326313	0.98	0.4186

**Anexo 3.** Análisis de Varianza de la Primera etapa para *S. aureus* y aldehído cinámico.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	7	4708.200000	672.600000	338.87	<.0001
<b>Error</b>	22	43.666667	1.984848		
<b>Corrected Total</b>	29	4751.866667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mm Mean
0.990811	5.805686	1.408847	24.26667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>emuls</b>	1	60.572024	60.572024	30.52	<.0001
<b>concen</b>	3	4587.231456	1529.077152	770.37	<.0001

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>emuls*concen</b>	3	60.396520	20.132173	10.14	0.0002

**Anexo 4.** Análisis de Varianza de la Primera etapa para *L. monocytogenes* y aldehído cinámico.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	7	4985.217391	712.173913	222.55	<.0001
<b>Error</b>	15	48.000000	3.200000		
<b>Corrected Total</b>	22	5033.217391			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mm Mean
0.990463	7.057230	1.788854	25.34783

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>emuls</b>	1	155.005270	155.005270	48.44	<.0001
<b>concen</b>	3	4728.720893	1576.240298	492.58	<.0001
<b>emuls*concen</b>	3	101.491228	33.830409	10.57	0.0005

**Anexo 5.** Análisis de Varianza de la primera etapa para *S. aureus* y aceite de eucalipto.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	11	128.4380952	11.6761905	37.00	<.0001
<b>Error</b>	30	9.4666667	0.3155556		
<b>Corrected Total</b>	41	137.9047619			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mm Mean
0.931354	8.079870	0.561743	6.952381

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>emuls</b>	2	70.61904762	35.30952381	111.90	<.0001
<b>concen</b>	3	20.97142857	6.99047619	22.15	<.0001
<b>emuls*concen</b>	6	36.84761905	6.14126984	19.46	<.0001

**Anexo 6.** Análisis de Varianza de la Primera etapa para *L. monocytogenes* con aceite de eucalipto.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	11	567.4523810	51.5865801	122.18	<.0001
<b>Error</b>	30	12.6666667	0.4222222		
<b>Corrected Total</b>	41	580.1190476			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	mm Mean
0.978165	6.909120	0.649786	9.404762

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>emuls</b>	2	185.3333333	92.6666667	219.47	<.0001
<b>concen</b>	3	278.1190476	92.7063492	219.57	<.0001
<b>emuls*concen</b>	6	104.0000000	17.3333333	41.05	<.0001

**Anexo 7.** Análisis estadístico de la Tercera etapa con la variable respuesta Reducción en porcentaje.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	5	3428.520374	685.704075	9.98	0.0006
<b>Error</b>	12	824.681282	68.723440		
<b>Corrected Total</b>	17	4253.201656			

<b>R-Square</b>	<b>Coeff Var</b>	<b>Root MSE</b>	<b>reduccion Mean</b>
0.806103	9.404577	8.289960	88.14815

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Type III SS</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>bacteria</b>	2	811.479267	405.739633	5.90	0.0164
<b>trt</b>	1	1602.421167	1602.421167	23.32	0.0004
<b>bacteria*trt</b>	2	1014.619940	507.309970	7.38	0.0081

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	12
<b>Error Mean Square</b>	68.72344

<b>Number of Means</b>	2
<b>Critical Range</b>	8.514

<b>Means with the same letter are not significantly different.</b>			
<b>Duncan Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>trt</b>
A	97.583	9	Emulsion
B	78.713	9	Agua

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	12
<b>Error Mean Square</b>	68.72344

<b>Number of Means</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Critical Range</b>	10.43	10.92

Means with the same letter are not significantly different.

<b>Duncan Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>bacteria</b>
A	94.893	6	Listeria
A	90.564	6	Salmonel
B	78.987	6	Staphylo

<b>bacteria</b>	<b>trt</b>	<b>reduccion LSMEAN</b>	<b>Standard Error</b>	<b>Pr &gt;  t </b>	<b>LSMEAN Number</b>
Listeria	Agua	93.7878788	4.7862108	<.0001	1
Listeria	Emulsion	95.9978820	4.7862108	<.0001	2
Salmonel	Agua	82.6652841	4.7862108	<.0001	3
Salmonel	Emulsion	98.4629211	4.7862108	<.0001	4
Staphylo	Agua	59.6856119	4.7862108	<.0001	5
Staphylo	Emulsion	98.2892985	4.7862108	<.0001	6

<b>Least Squares Means for effect bacteria*trt Pr &gt;  t  for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: reduccion</b>						
<b>i/j</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>1</b>		0.7497	0.1263	0.5029	0.0003	0.5186
<b>2</b>	0.7497		0.0724	0.7221	0.0002	0.7408

<b>Least Squares Means for effect bacteria*trt</b>						
<b>Pr &gt;  t  for H0: LSMean(i)=LSMean(j)</b>						
<b>Dependent Variable: reduccion</b>						
<b>i/j</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	0.1263	0.0724		0.0378	0.0053	0.0396
<b>4</b>	0.5029	0.7221	0.0378		<.0001	0.9800
<b>5</b>	0.0003	0.0002	0.0053	<.0001		<.0001
<b>6</b>	0.5186	0.7408	0.0396	0.9800	<.0001	

**Anexo 8.** Análisis estadístico de la Tercera etapa con la variable respuesta Reducción en Log UFC.

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Model</b>	5	7.55416244	1.51083249	5.76	0.0061
<b>Error</b>	12	3.14659933	0.26221661		
<b>Corrected Total</b>	17	10.70076178			

<b>R-Square</b>	<b>Coeff Var</b>	<b>Root MSE</b>	<b>reduccion Mean</b>
0.705946	36.88976	0.512071	1.388111

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Type III SS</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>bacteria</b>	2	0.35530844	0.17765422	0.68	0.5263
<b>trt</b>	1	5.50898689	5.50898689	21.01	0.0006
<b>bacteria*trt</b>	2	1.68986711	0.84493356	3.22	0.0758

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	12
<b>Error Mean Square</b>	0.262217

<b>Number of Means</b>	<b>2</b>
<b>Critical Range</b>	<b>.5259</b>

**Means with the same letter are not significantly different.**

<b>Duncan Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>trt</b>
A	1.9413	9	Emulsion
B	0.8349	9	Agua

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Error Degrees of Freedom</b>	12
<b>Error Mean Square</b>	0.262217

<b>Number of Means</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Critical Range</b>	<b>.6441</b>	<b>.6742</b>

**Means with the same letter are not significantly different.**

<b>Duncan Grouping</b>	<b>Mean</b>	<b>N</b>	<b>bacteria</b>
A	1.5743	6	Salmonel
A			
A	1.3550	6	Listeria
A			
A	1.2350	6	Staphylo

bacteria	trt	reduccion LSMEAN	Standard Error	Pr >  t	LSMEAN Number
Listeria	Agua	1.23133333	0.29564427	0.0013	1
Listeria	Emulsion	1.47866667	0.29564427	0.0003	2
Salmonel	Agua	0.85566667	0.29564427	0.0135	3
Salmonel	Emulsion	2.29300000	0.29564427	<.0001	4
Staphylo	Agua	0.41766667	0.29564427	0.1831	5
Staphylo	Emulsion	2.05233333	0.29564427	<.0001	6

**Least Squares Means for effect bacteria\*trt**  
**Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)**  
**Dependent Variable: reduccion**

i/j	1	2	3	4	5	6
1		0.5651	0.3866	0.0260	0.0754	0.0732
2	0.5651		0.1620	0.0752	0.0261	0.1951
3	0.3866	0.1620		0.0049	0.3155	0.0143
4	0.0260	0.0752	0.0049		0.0007	0.5755
5	0.0754	0.0261	0.3155	0.0007		0.0021
6	0.0732	0.1951	0.0143	0.5755	0.0021	

**Anexo 9.** Costos preliminares (en dólares norteamericanos) de la elaboración de un litro de emulsión de aldehído cinámico al 0.5%

Insumo	Costo por litro insumo	Costo total
Span 20	166.00	2.49
Aldehído cinámico	45.40	0.23
<b>TOTAL</b>	<b>211.40</b>	<b>2.72</b>

Precios extraídos del catálogo de Sigma-Aldrich. Disponible en:  
[www.sigmaaldrich.com/catalog](http://www.sigmaaldrich.com/catalog)