

## **EFFECTOS DE LA EMULSIFICACIÓN POR AGITACIÓN MAGNÉTICA Y SONICACIÓN DEL EXTRACTO DE *Origanum vulgare***

Johnny Daniel Bravo Loor. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí MFL. carrera de Medicina veterinaria.

### **RESUMEN.**

Con la finalidad de mejorar la aplicación y aumentar la eficacia de los efectos antimicrobianos del extracto de hojas de orégano *Origanum vulgare* que se obtuvo por destilación al vapor con 16% de carvacrol, se lo emulsionó O/W a través de dos métodos de alta energía: agitación magnética y sonicación. Se utilizó tensoactivo no iónico Tween 80 y goma arábica en proporciones del 0.75 y 0.25% respectivamente. Se evaluó su efecto antibacteriano como UFC/ml de *S. aureus*, *E. coli* y recuento de células somáticas en leche de vacas con niveles elevados de estos microorganismos. El ensayo se condujo en un diseño completamente al azar con arreglo factorial, y los resultados de los ensayos de 44 muestras de leche luego de la aplicación intramamaria del extracto emulsionado a las vacas, muestran que ambos métodos empleados en la elaboración de la emulsión, presentan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) para UFC/mL de *S. aureus* y RCS, no así, para UFC/mL de *E. coli*. El producto emulsionado con ambos métodos tiene efecto inhibitor sobre estas bacterias.

**Palabras clave.** – Ultrasonido, agitador magnético, sonicación, emulsionantes.

### **ABSTRACT.**

#### **EMULSIFICATION BY MAGNETIC AGITATION AND SONICATION OF THE EXTRACT OF *Origanum vulgare* AND ITS EFFECTS ON CFU/mL OF *S. aureus*, *E. coli* and SOMATIC CELL COUNT.**

In order to improve the application and increase the efficacy of the antimicrobial effects of the extract of oregano leaves *Origanum vulgare* that was obtained by steam distillation with 16% carvacrol, it was emulsified O/W with two high-energy methods: agitation magnetic and sonication. Nonionic surfactant Tween 80 and gum arabic were used in proportions of 0.75 and 0.25%, respectively. Subsequently, its antibacterial effect was evaluated as CFU/ml of *S. aureus*, *E. coli* and somatic cell count in milk from cows with high levels of these microorganisms. The trial was conducted in a completely randomized design and analysis of variance with factorial arrangement and the results of the trials of 44 milk samples after the intramammary application of the emulsified extract to the cows, show that both methods used in the elaboration of the emulsion, show significant statistical differences ( $p < 0.05$ ) for CFU/mL of *S. aureus* and RCS, but not for CFU/mL of *E. coli*, showing that the emulsified product with both methods has an inhibitory effect on these bacteria

**Keywords.** - Ultrasound, magnetic stirrer, sonication, emulsifiers.

### **INTRODUCCIÓN.**

La propuesta de la botánica moderna y parte de la comunidad científica es avanzar hacia la sustitución de compuestos sintéticos por naturales, con el fin de explotar sus actividades biológicas y promover un desarrollo sostenible basado en economía circular (Pavela y Benelli, 2016), como estrategias para la sostenibilidad ambiental.

Los vegetales naturalmente producen una desarrollada variedad de moléculas, especialmente metabolitos secundarios que se sabe, cumplen una función en la protección de las plantas contra patógenos, ocasionado por sus propiedades biológicas (Hancock *et al.* 2015). Estos constituyen una fuente importante de compuestos biológicamente activos: antibacterianos, insecticidas, fungicidas, nematicidas, herbicidas, antioxidantes y antiinflamatorios (Bassolé y Juliani 2012; Bakkali *et al.*, 2008; Shaaban *et al.*, 2012; Turek y Stintzing, 2013).

Uno de los líquidos grasos seguros para el control antimicrobiano es el de *Origanum vulgare*, su efecto se les atribuye especialmente a sus compuestos mayoritarios timol y carvacrol (Bhargava *et al.*, 2015), se consideran sustancias menos peligrosas, y por tanto, pueden reducir los riesgos para el medio ambiente, los animales y la salud humana (Miresmailli e Isman, 2014). Además, se probó la eficacia en la inhibición de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Elshafie *et al.*, 2017; Man *et al.*, 2019; Martucci *et al.*, 2016; Vatted, 2005).

No obstante, estos líquidos oleosos se degradan durante la manipulación o el almacenamiento al ser susceptibles a reacciones químicas de conversión o degradación, como oxidación, isomerización, polimerización y reordenamiento, que dependen principalmente de parámetros ambientales como la temperatura, la luz y el oxígeno atmosférico (Turek y Stintzing, 2013). Estos problemas de inestabilidad pueden resultar en una reducción o pérdida de efectividad (Isman, 2000). Además, tienen propiedades físico-químicas deficientes, como la insolubilidad en agua (compuestos lipofílicos), alta volatilidad y vida media rápida que hacen que sean difíciles de manipular y utilizar (Bilia *et al.* 2014)).

En ese contexto, las emulsiones de aceite en agua son vehículos importantes para el suministro de compuestos hidrófobos en una gama de productos alimenticios, nutracéuticos, cosméticos y fármacos (Sullo y Norton, 2016). Los emulsionantes desarrollan estabilidad y vida útil aceptable al producto, la emulsión agua en aceite W/O, la fase continua suele ser hidrófoba como el aceite, la fase dispersa es agua y un aceite y fase acuosa del producto en un preparación homogénea y estable (Wagnaire, 1997).

Las nano emulsiones de apariencia transparente o translúcida y una alta estabilidad cinética, son un tipo de emulsiones con tamaño de gota muy pequeño (entre 20 y 200 nm, esto puede variar según la literatura (Sonneville- Aubruny Simonnet *et al.*, 2004; Qian y McClements, 2011; Donsì y Annunziata *et al.*, 2012; McClements, 2012). Gracias a su tamaño subcelular, las nanopartículas son capaces de potenciar la bioactividad de los aceites esenciales ya que permiten una penetración más profunda en los tejidos y

una captación celular más fácil, además, permiten el control y la modulación de la liberación de ingredientes activos en el sitio objetivo (Shaaban *et al.*, 2012)

La encapsulación de carvacrol, el componente principal del orégano, ha sido ampliamente estudiada (Guimarães *et al.*, 2015; Hussain *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2017). Entonces se plantea el uso de dos métodos de alta energía: agitación magnética y ultrasonido, para emulsionar extractos acuosos de plantas como *Origanum vulgare*. Los ultrasonidos son muy utilizados para elaborar emulsiones, estas cavitaciones inducidas acústicamente provocan la interrupción de las gotas de fase dispersa de tamaño micrométrico y nanométricos, facilitando la formación de gotas de emulsión submicrométrica (Gogate *et al.*, 2011). Al presente, es apreciada como una técnica de procesamiento sustentable, porque típicamente emplea menos tiempo, agua y energía (Chemat *et al.*, 2011).

El agitador magnético es una pequeña barra magnética de agitación cubierta por una capa de plástico (usualmente teflón) y una placa debajo de la que se encuentra un imán rotatorio o una serie de electroimanes dispuestos en forma circular a fin de crear un campo magnético rotatorio y son excelentes para mezclar tensioactivos, mezclar fases de aceite y agua y para todos los procedimientos en los que se necesita una mezcla prolongada y uniforme sin mucha agitación (De Palma, 2010).

Las emulsiones se pueden preparar utilizando métodos de alta energía como ultrasonidos, cizallamiento y homogeneización, Hamouda y Baker (2000); Myc *et al.* (2002); Pannu *et al.* (2011). Las ventajas de la nanoemulsión sobre la emulsión convencional es la posibilidad de diluirlas con agua sin cambiar la distribución del tamaño de las gotas y además, con el uso de una cantidad reducida de tensioactivo es una ventaja adicional para la preparación por métodos de nanoemulsión en comparación con las microemulsiones, Fernandez *et al.* (2004), Morales *et al.* (2003). El objetivo del presente trabajo es preservar el efecto antimicrobiano y mejorar la aplicación del extracto de orégano emulsionado con dos métodos de alta energía, sonicación y agitación magnética y empleando cánulas de acero inoxidable, aplicarlo vía intramamaria en vacas con alta carga bacteriana en las tetas.

## **METODOLOGÍA**

**Ubicación de la investigación.** - Se efectuó UDIV de la ESPAM MFL, ubicada en el sitio El Limón, entre las coordenadas 0° 49' 23" Latitud Sur; 80° 11' 01" Longitud Oeste y una altitud de 15 msnm, en el cantón Bolívar provincia de Manabí. Para el ensayo se consideraron vacas de la unidad de producción bovina de esta universidad y dos hatos ganaderos de la localidad.

**Procedimiento.** - Se emulsionó el extracto de orégano con goma arábiga al 0,25% y tween 80 al 0,75% p/p, disueltos en extractos con concentraciones de 16% de compuestos fenólicos en vasos de vidrio de 250 mL y por agitación magnética con una barra magnética en un equipo calentador-agitador modelo HSD 180 durante 15 minutos

a 3500 rpm. además, por cavitación con un equipo de ultrasonido Chendke y Fogler (1975), modelo VWR 75T.

La actividad antibacteriana del extracto se determinó con la aplicación en las ubres de 5 mL vía intramamaria con cánulas de acero inoxidable, previo CCS y UFC/mL., y por el método semicuantitativo de incorporación en placa de cultivo y sembrado en agar por estrías continuas, el medio de cultivo empleado fue agar Macconkey y Manitol, esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min (Bravo *et al.*, 2019). El agar sal manitol es una fórmula diseñada por Chapman, (1945), para la diferenciación de estafilococos positivos a la coagulasa (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*) de los estafilococos negativos a la coagulasa, (Bannerman, 2003)

**Diseño.** - Se aplicó un (DCA) con un arreglo bifactorial 2x2 siendo el factor A los métodos ultrasonido y agitación magnética y el factor B UFC/ml de *S. aureus*, *E. coli* y CCS. Para el estudio de las variables respuestas previamente se comprobaron la homogeneidad de varianza (Prueba de Bartlet) y normalidad de los errores (Prueba de Shapiro-Wills).

**RESULTADOS.**

Los efectos del extracto de orégano *Origanum vulgare* emulsionado por el método ultrasonido y agitación magnética de 44 muestras de leche de vacas con niveles elevados de microorganismos, presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para UFC/mL de *Staphiloccocus aureus*, no así para las de *E. coli* como muestra la tabla 1, de igual forma presentó diferencias estadísticas para el CCS por el método de sonicación con equipo de ultrasonido, no así para el de agitación magnética a 3500 rpm con el agitador magnético figura 1.

Tabla 1.- Diferencias significativas para las variables UFC/mL de *S. aureus* y *E. coli*

Variables	MS	F	P
UFC/mL de <i>E. coli</i>	65,9E±13	4.18	0,2497
UFC/mL de <i>S. aureus</i>	5,420E±12	1.36	0.0476



Figura 1.- Equipos agitador magnético y ultrasonido

La tabla 2 y 3 denota que la media de los grupos y la prueba de Tukey, disminuye en el método de sonicación (A) en relación al de agitación magnética (B), lo que demuestra que si existe diferencia significativa para el recuento de células somáticas.

Tabla 2.- Media de ambos métodos de emulsión para RCS

<b>Métodos.</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
Sonicación	1,2003	A
Agitación magnética	1,5726	B

Tabla 3.- Prueba de comparación de Tukey HSD para los métodos de emulsificación.

<b>Métodos</b>	<b>Promedios de CCS</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Ámbito</b>
Sonicación	1.95	± 3,18	A
Agitación magnética	3.17	± 4.0	B

Al respecto Ramírez *et al.* (2002) indican que en emulsiones el diámetro de gota está en relación con la velocidad de agitación, es como decir que el tamaño de las gotas depende de la agitación. El mismo autor ensayó con 2000 rpm con un tamaño de gota de cerca de 30 micras, mientras que a 8000 rpm alrededor de 9 micras, en el presente ensayo se realizó a 3500 rpm en el método de agitación magnética.

Para desvirtuar la hipótesis nula el método por ultrasonido para la elaboración de emulsiones presenta diferencias estadísticas en relación al de agitación magnética. Los ultrasonidos están volviendo a ser muy utilizados para elaborar emulsiones aceite en agua por la reducción en el tamaño de gota, en las nanoemulsiones y, en particular, el mecanismo esencial de ruptura de gotitas que ocurre durante la emulsión (Bondy y Sóllner, 1935), fue una de las primeras aplicaciones de ultrasonido potente y la primera patente relacionada que se obtuvo desde hace cincuenta años, (Wood y Loomis, 1927). El ultrasonido de alta intensidad es efectivo y ya ha mostrado resultados prometedores en la preparación de nanoemulsiones alimenticias o farmacéuticas, (Kaur *et al.*, 2011). Estas cavitaciones inducidas acústicamente provocan la interrupción de las gotas de fase dispersa de tamaño micrométrico y facilitan la formación de gotas de emulsión submicrométrica (Gogate *et al.*, 2011).

Los enfoques de alta energía se basan en un procedimiento de dos pasos que proporciona, en un primer momento, la formación de una emulsión mediante una agitación mecánica, caracterizada por un tamaño de gotitas de aceite en el rango de micrones (Rao y McClements, 2011). El segundo paso proporciona la conversión de la emulsión en un NE a través de la rotura de las gotitas de aceite en pequeñas mediante el uso de dispositivos mecánicos de alta energía, como homogeneizadores de alta presión, microfluidizadores y sonicadores (Gupta *et al.*, 2016).

El método de agitación magnética en relación al del ultrasonido en la elaboración de la emulsión del extracto presente menos efectos antimicrobianos. La agitación magnética y la agitación mecánica se utilizan a menudo para acelerar la velocidad de reacción en los sistemas, sin embargo, estos métodos de agitación convencionales no son prácticos para tamaño de gotas a nanoescala (Leidong y Hur, 2006)

En esa perspectiva sobre el mayor efecto antimicrobiano de la emulsión elaborada con el equipo del ultrasonido. La técnica de sonicación explota ondas ultrasónicas de alta intensidad, generadas por una sonda o baño sonicador, para crear las fuerzas disruptivas capaces de romper la emulsión gruesa en una mezcla, además, las vibraciones mecánicas generadas por los ultrasonidos son capaces de realizar un efecto cavitacional (Kentish *et al.*, 2008). El tamaño de las gotas que se logra mediante este método depende del tiempo de exposición y la intensidad de las ondas ultrasónicas, el tipo y la cantidad de tensioactivo y la viscosidad de las dos fases (Leong *et al.*, 2009).

## CONCLUSIONES

El método del ultrasonido para emulsionar el extracto de orégano *Origanum vulgare* resultó con un mayor efecto antibacteriano por la disminución en el CCS, así como la disminución de UFC/mL de *S. aureus* en relación a *E. coli* y se mejoró su aplicación al disminuir el tamaño de gota y la tensión superficial en el emulsionado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bannerman, T.L. 2003. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray, P. R., E. J.
- Bassolé IHN, Juliani HR. 2012. Aceites esenciales en combinación y sus propiedades antimicrobianas. Moléculas.; 17: 3989–4006. doi: 10.3390 / moléculas17043989. [ PubMed] [ CrossRef] [ Google Scholar]
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Efectos biológicos de los aceites esenciales: una revisión. Food Chem. Toxicol.; 46: 446–475. doi: 10.1016 / j.fct.2007.09.106. [ PubMed] [ CrossRef] [ Google Scholar]
- Bhargava, K., Conti, D. S., da Rocha, S. R. P., & Zhang, Y. (2015). Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. Food Microbiology 47, 69–73. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.007>
- Hancock RD, Hogenhout S., Foyer CH. 2015. Mecanismos de interacción planta-insecto. J. Exp. Larva del moscardón.; 66: 421–424. doi: 10.1093 / jxb / eru503. [ Artículo gratuito de PMC] [ PubMed] [ CrossRef ] [ Google Scholar ]
- Bilia A.R., Guccione C., Isacchi B., Righeschi C., Firenzuoli F., Bergonzi M.C. 2014. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. Evid. Based Complement. Altern. Med. doi: 10.1155/2014/651593. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- Bondy, C. y Söllner K. 1935 On the Mechanism of Emulsification by Ultrasonic Waves Trans. Faraday Soc. 1935, 31, 835-842
- Bravo L., Johnny, Suárez P., Carlos, Espinoza V. Albert, Muñoz C., Jesús. 2019. Actividad antibacteriana del extracto de orégano *Origanum vulgare* emulsionado

sobre mastitis bovina. Revista ESPAM Ciencia para el agro. Vol. 10 N° 2. pp: 71-77. ISSN:1390-8103

- De Palma, A. (2010). Enfoque del producto: Agitadores aéreos y magnéticos. Responsable de laboratorio. Consultado en agosto de 2018 en: <https://www.labmanager.com/product-focus/2010/12/overhead-and-magnetic-stirrers-choose-based-on-sample-size-and-viscosity#.W6u7h2hKi73>
- Donsì, F., M. Annunziata, et al. (2012). "Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier." *Journal of Biotechnology* 159(4): 342-350.
- Elshafie, H., Armentano, M., Carmosino, M., Bufo, S., De Feo, V., Camele, I., 2017. Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. *Molecules* 22, 1435. <https://doi.org/10.3390/molecules22091435>.
- Fernandez P., Andre V., Rieger J., Kuhnle A. 2004. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion, *Colloids Surf., Physicochem. Eng. A* 1 53–58.
- Chemat F., Zill-e-Huma, Muhammed Kamran Khan. 2011. Applications of ultrasound in food technology. Processing, preservation and extraction. *Ultrasonic Sonochemistry* 18(4), 813. 835.
- Guimaraes, P.P.G., Oliveira, S.R., de Castro Rodrigues, G., Gontijo, S.M.L., Lula, I.S., Cortes, M.E., Denadai, A.M.L., Sinisterra, R.D. J.M., 2015. Development of sulfadiazine-decorated PLGA nanoparticles loaded with 5-fluorouracil and cell viability. *Molecules* 20, 879–899.
- Gupta A., Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. 2016; Nanoemulsiones: formación, propiedades y aplicaciones. *Materia blanda*. 12: 2826–2841. doi: 10.1039 / C5SM02958A. [ PubMed] [ CrossRef] [ Google Scholar]
- Gogate, PR. Sutkar, 2011 VS. AB Pandit Reactores sonoquímicos, importantes consideraciones de diseño y ampliación con un énfasis especial en sistemas heterogéneos *Chem Ing. J.*, 166 (3) (2011), pp. 1.066 - 1.08, 10.1016 / j.cej.2010.11.069.
- Hamouda T., Baker J.R. 2000. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparation in enteric gram-negative bacilli. *J. Appl. Microbiol.* 89.. 397-403
- Hussain, N., Zulfiqar, S., Khan, T., Khan, R., Khattak, S.A., Ali, S., Khan, G., 2020. Investigation of structural, optical, dielectric and magnetic properties of SnO<sub>2</sub> nanorods and nanospheres. *Mater. Chem. Phys.* 241, 122382
- Isman M.B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 2000; 19:603–608. doi: 10.1016/S0261-2194(00)00079-X. [CrossRef] [Google Scholar].

- Kaur, D; Wani, AA; Singh, DP; Sogi, DS. 2011. Shelf-Life Enhancement of Butter, IceCream, and Mayonnaise by Addition of Lycopene. *International Journal of Food Properties* 14(6):1217-1231
- Kentish S., Wooster TJ, Ashokkumar M., Balachandran S., Mawson R., Simons L. 2008. El uso de ultrasonidos para la preparación de nanoemulsión. *Innov. Ciencia de los alimentos. Emerg. Technol.*; 9: 170-175. doi: 10.1016 / j. ifset.2007.07.005. [ CrossRef] [ Google Académico]
- Leong TSH, Wooster TJ, Kentish SE, Ashokkumar M. 2009. Minimización del tamaño de las gotas de aceite mediante emulsificación ultrasónica. *Ultrasonido. Sonochem.* 2009; 16: 721–727. doi: 10.1016 / j. ultsonch.02.008. [ PubMed] [ CrossRef] [ Google Scholar]
- Liu H, Liu X, Zhang C, Zhu H, Xu Q, Bu Y, Lei Y. 2017. Redox Imbalance in the Development of Colorectal Cancer. *J Cancer*; 8(9):1586-1597. doi:10.7150/jca.18735. <https://www.jcancer.org/v08p1586.htm>
- Man, A., Santacroce, L., Jacob, R., Mare, A., Man, L., Man, A., Santacroce, L., Jacob, R., Mare, A., Man., L., 2019. Antimicrobial activity of sixes essential oils against a group human pathogen: a comparative study. *Pathogens* 8, 15. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>.
- Martucci, J.F., Gende, L.B., Neira, L.M., Ruseckaite, R.A., 2015. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additive es of biogenic gelatin films. *Ind. Crops Prod.* 71, 205–213.<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.03.079>.
- Miresmailli S., Isman MB 2014; Insecticidas botánicos inspirados en las interacciones químicas planta-herbívoro. *Tendencias Plant Sci.* 19: 29–35. doi: 10.1016 / j. tplants.2013.10.002. [ PubMed] [ CrossRef] [ Google Scholar].
- Morales D., Gutierrez J., Garcia M.C., Solans Y.C. (2003). A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation, *Langmuir* 18 7196–7200.
- Myc M., T. Vanhecke T., J.J. Landers J.J., T. Hamouda, J.R. Baker. (2002) The fungicidal activity of novel nano emulsion (X8W60PC) against clinically important yeast and filamentous fungi, *Micropathological* 155 195–201.
- Pannu J., McCarthy A., Martin A.T. 2011. In-vitro antibacterial activity of NB-003 against *Propionibacterium acnes*, *Antimicrobic. Agents Chemother.* 55 4211
- Pavela R., Benelli G. 2016; Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci.* 21:1000–1007. doi: 10.1016/j.tplants. 2016.10.005. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

- Qian, C. and D. J. McClements (2011). "Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size." *Food Hydrocolloids* 25(5): 1000-1008.
- Shaaban HAE, El-Ghorab AH, Shibamoto T. 2012. Bioactividad de los aceites esenciales y sus componentes aromáticos volátiles: Revisión. *J. Essent. Oil Res.*; 24: 203–212. doi: 10.1080 / 10412905.2012.659528. [ CrossRef ] [ Google Académico ]
- Sonneville-Aubrun, O., J.-T. Simonnet, et al. (2004). "Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products." *Advances in Colloid and Interface Science* 108: 145-149.
- Turek C., Stintzing FC. 2013 Estabilidad de los aceites esenciales: una revisión. *Compr. Rev. Food Sci. Alimentos seguros*. 2013; 12: 40–53. doi: 10.1111 / 1541-4337.12006. [ CrossRef ] [ Google Académico ]
- McClements, D. J. (2012). "Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities." *Soft Matter* 8(6): 1719-1719.
- Rao J., McClements DJ. 2011. Formación de microemulsiones, nanoemulsiones y emulsiones de aceites aromatizantes: influencia de la composición y el método de preparación. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 5026–5035. doi: 10.1021 / jf200094m. [PubMed] [ CrossRef ] [ Google Scholar]
- Sullo, A. and Norton, I.T. *Food Colloids and Emulsions. Reference Module in Food Science*, from *Encyclopedia of Food and Health*, 2016, p. 7-15.
- Turek C., Stintzing F.C. 2016. Stability of essential oils: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2013; 12:40–53. doi: 10.1111/1541-4337.12006. [CrossRef] [Google Scholar].
- Vattem, D.A., Lin, Y.-T., Ghaedian, R., Shetty, K., 2005. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochem.* 40, 1583–1592. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2004.06.024>. Verma, D.D., Verma, S., Blume, G., Fahr, A., 2003. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int. J. Pharm.* 258, 141–151
- Waginaire, L. Place of lipids as emulsifiers in the future. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* 44:271. 1997
- Wood, R.W.; Loomis, A.L., 1927. Physical and Biological Effects of High-Frequency Sound Waves. *Phil. Mag.* 1927, 4, 417--436