

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***EFFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS NATURALES VAINILLINA  
Y CINAMALDEHÍDO EMULSIFICADOS SOBRE LA  
INACTIVACIÓN DE ESCHERICHIA COLI, LISTERIA INNOCUA Y  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN BEBIDAS PROTEICAS***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Ciencias de los Alimentos por:

***Francisco Joaquín Sepúlveda Cerda***

Director/a de Tesis: Dra. Cielo Char Aubry

**Santiago-CHILE**

**Octubre 2023**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

***Francisco Joaquín Sepúlveda Cerda***

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias de los Alimentos, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

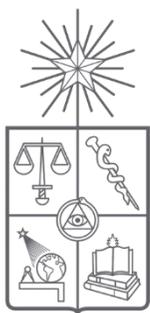
**Dra. Cielo Char Aubry**

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Paz Robert Canales**

**Dra. Verónica García Mena**

**Dra. Carolina Schebor**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

**EFFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS NATURALES VAINILLINA  
Y CINAMALDEHÍDO EMULSIFICADOS SOBRE LA INACTIVACIÓN DE  
*ESCHERICHIA COLI*, *LISTERIA INNOCUA* Y *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE* EN BEBIDAS PROTEICAS**

**Memoria para optar al grado de Magíster en Ciencias de los Alimentos**

FRANCISCO JOAQUÍN SEPÚLVEDA CERDA

Profesor Guía: Dra. Cielo Char Aubry, BQ

Santiago, Chile 2023

*“Ningún buen explorador será cobarde”*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a la Dra. Cielo Char por la oportunidad de realizar esta tesis de Magíster en su laboratorio. También por la paciencia y comprensión que me tuvo en los momentos difíciles durante el transcurso de la investigación.

Agradecer a mi familia, a mis padres por su apoyo, y en especial a mi hermana Lizette, que siempre ha creído en mí, y de alguna u otra manera, me motiva a ser valiente y resiliente.

A mis amigos de toda la vida, en particular a Bastián Riquelme y Galo Brito, cuya compañía tanto en el transcurso del magíster y la pandemia hicieron que todo fuera más ameno.

A los nuevos amigos realizados en el camino, tanto a Sebastián Pozas y a Cecilia Hernando, cuyas conversaciones tanto de la vida, del futuro, y de las actividades del laboratorio permitieron muchas veces esclarecer lo nebuloso de lo que fue esta investigación.

Agradecer a los profesores colaboradores Dr. Felipe Oyarzún y Dra. Silvia Matiacevich por permitir ocupar sus instrumentos y compartir su sabiduría para la realización de esta tesis.

Y, por último, agradecer a la Universidad de Chile por las instalaciones y permitir que un bioquímico se aventure en la investigación aplicada a los alimentos.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. RESUMEN</b> .....	x
<b>1. ABSTRACT</b> .....	xii
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2.1 Suero de leche</b> .....	1
<b>2.1.1. Efecto en el medioambiente</b> .....	1
<b>2.1.2. Efectos en la nutrición</b> .....	2
<b>2.1.3. Composición proteica del suero de leche</b> .....	5
<b>2.1.4. Obtención de concentrados de proteínas de suero</b> .....	7
<b>2.1.5. Alimentos funcionales con proteína de suero de leche</b> .....	10
<b>2.2. Emulsiones</b> .....	11
<b>2.2.1. Procesos de desestabilización en las emulsiones aceite en agua</b> .	12
<b>2.2.2 Proteínas como agente emulsificante</b> .....	15
<b>2.2.3 Proteínas del suero de leche y emulsiones</b> .....	15
<b>2.3 Métodos tradicionales de inactivación microbiana</b> .....	16
<b>2.4 Productos naturales y antimicrobianos</b> .....	17
<b>2.4.1 Cinamaldehído</b> .....	18
<b>2.4.2 Vainillina</b> .....	20
<b>2.4.3 Antimicrobianos y emulsiones</b> .....	21

2.5 Oportunidad de proyecto .....	23
3. HIPÓTESIS .....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos .....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
5.1 Materiales .....	26
5.2 Preparación de inóculos .....	26
5.3 Preparación de las bebidas proteicas.....	26
5.4 Preparación de vainillina.....	27
5.5 Preparación de las emulsiones .....	27
5.6 Propiedades fisicoquímicas de las emulsiones.....	28
5.6.1 Distribución del tamaño de partícula.....	28
5.6.2 Ensayo de estabilidad .....	28
5.6.3 Eficiencia de encapsulación .....	29
5.6.4 Tasa de liberación de los antimicrobianos naturales.....	30
5.7 Cinéticas de inactivación microbiana .....	31
5.8 Enumeración de células supervivientes.....	32
5.9 Modelamiento de las curvas de supervivencia .....	32
5.9.1 Modelo de Gompertz .....	33

5.9.2 Modelo de Weibull .....	33
5.10 Análisis estadístico .....	34
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
6.1 Datos físicos y químicos de los materiales.....	35
6.2 Propiedades físicas y químicas de las emulsiones .....	36
6.2.1 Tamaño de partícula.....	36
6.2.2 Ensayos de estabilidad .....	39
6.2.3 Eficiencia de encapsulación y tasa de liberación.....	43
6.2.5 Observación microscópica .....	48
6.3 Cinéticas de inactivación microbiana .....	51
6.4 Cinéticas de inactivación de las combinaciones de antimicrobianos emulsionados.....	58
6.5 Modelamiento matemático de las curvas de supervivencia .....	64
6.5.1 Aplicación del modelo de Gompertz.....	64
6.5.2 Aplicación del modelo de Weibull.....	72
<b>8. PROYECCIONES FUTURAS .....</b>	<b>88</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de obtención de un concentrado de proteína de suero de leche.....	9
<b>Figura 2.</b> El fenómeno de inestabilidad en emulsiones aceite en agua.....	14
<b>Figura 3.</b> Antimicrobianos y su mecanismo general de acción.....	19
<b>Figura 4.</b> Distribución del tamaño de gota de la emulsión E-CIN.....	37
<b>Figura 5.</b> Distribución del tamaño de gota de la emulsión E-VN.....	38
<b>Figura 6.</b> Ensayo de estabilidad para las emulsiones de cinamaldehído.....	40
<b>Figura 7.</b> Ensayo de estabilidad para las emulsiones de vainillina.....	41
<b>Figura 8.</b> Curva de liberación de los antimicrobianos encapsulados.....	46
<b>Figura 9.</b> Imágenes microscópicas de las emulsiones y de las emulsiones en las bebidas proteicas en el almacenamiento a 4°C a los días 0, 3 y 6 en oscuridad.....	49
<b>Figura 10.</b> Evaluación de cinamaldehído y E-CIN en bebidas proteicas inoculadas....	52
<b>Figura 11.</b> Evaluación de vainillina y E-VN en bebidas proteicas inoculadas.....	54
<b>Figura 12.</b> Evaluación de tratamientos combinados E-VN + E-CIN en bebidas proteicas inoculadas.....	60
<b>Figura 13.</b> Modelamiento matemático de Gompertz a las curvas de supervivencia de los tratamientos de cinamaldehído y E-CIN.....	65
<b>Figura 14.</b> Modelamiento matemático de Gompertz a las curvas de supervivencia de los tratamientos de vainillina y E-VN.....	67

<b>Figura 15.</b> Modelamiento matemático de Gompertz a las curvas de supervivencia de los tratamientos combinados.....	69
<b>Figura 16.</b> Modelamiento matemático de Weibull a las curvas de supervivencia de los tratamientos con cinamaldehído y E-CIN.....	74
<b>Figura 17.</b> Distribución de resistencias de Weibull para los tratamientos con cinamaldehído y E-CIN.....	75
<b>Figura 18.</b> Modelamiento matemático de Weibull a las curvas de supervivencia de los tratamientos con vainillina y E-VN.....	77
<b>Figura 19.</b> Distribución de resistencias de Weibull para los tratamientos con vainillina y E-VN.....	79
<b>Figura 20.</b> Modelamiento matemático de Weibull a las curvas de supervivencia de los tratamientos combinados.....	80
<b>Figura 21.</b> Distribución de resistencias de Weibull para los tratamientos combinados.....	82

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Proteínas menores presentes en el suero de leche.....</b>	<b>8</b>
<b>Tabla 2. Información nutricional del concentrado y aislado de proteína de suero de leche.....</b>	<b>9</b>
<b>Tabla 3. Composición final de las emulsiones de cinamaldehído y vainillina.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 4. Caracterización física y química de los ingredientes y la bebida proteica.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 5. Cambios en el back scattering en diferentes partes del tubo.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 6. Resumen de los resultados de la evaluación de los tratamientos combinados en bebidas proteicas.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 7. Parámetros estimados de Gompertz en los tratamientos con cinamaldehído.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabla 8. Parámetros estimados de Gompertz en los tratamientos con vainillina.....</b>	<b>68</b>
<b>Tabla 9. Parámetros estimados de Gompertz en los tratamientos combinados..</b>	<b>70</b>
<b>Tabla 10. Parámetros estimados de Weibull en los tratamientos con cinamaldehído.....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla 11. Parámetros estimados de Weibull en los tratamientos con vainillina..</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 12. Parámetros estimados de Weibull en los tratamientos combinados.....</b>	<b>81</b>

## 1. RESUMEN

El uso de los agentes antimicrobianos sintéticos ha sido cuestionado por los consumidores. Como alternativa se pueden utilizar compuestos naturales con actividad microbiana como los aceites esenciales, pero uso está limitado por su baja solubilidad en agua y porque en altas concentraciones pueden producir cambios en el aroma y sabor. El cinamaldehído y la vainillina son los principales componentes del aceite esencial de canela y de la vainilla, respectivamente, y son utilizados como aditivos saborizantes. Por otro lado, el suero de leche es el principal subproducto y agente contaminante de la industria láctea. Las proteínas del suero de leche deshidratado permiten formar emulsiones, las cuales pueden mejorar la solubilidad y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la emulsificación de cinamaldehído y vainillina sobre la inactivación de microorganismos modelo en bebidas proteicas a base de suero de leche y jugo de manzana, durante el almacenamiento en refrigeración. Para esto, se prepararon y caracterizaron emulsiones de cinamaldehído y vainillina con concentrado de proteína de suero de leche (WPC) y se evaluó su efectividad en la inactivación de *E. coli*, *Listeria innocua* y *S. cerevisiae* en un prototipo de bebida proteica saborizada con jugo de manzana. La emulsificación incrementó la efectividad del cinamaldehído alcanzando una reducción de 1,8; 3,5 y 5 ciclos logarítmicos en *E. coli*, *L. innocua* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Mientras que la emulsificación de vainillina tuvo escaso efecto sobre la actividad antimicrobiana, reduciendo hasta 0,5; 1,0 y 1,2 ciclos log en *E. coli*, *L. innocua* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Los tratamientos combinados

tuvieron efecto aditivo en la reducción de *E. coli* y un efecto sinérgico frente *S. cerevisiae*. Tanto el modelo matemático de Gompertz como el de Weibull permitieron describir el efecto de la emulsificación de los antimicrobianos. El modelo de Gompertz permitió describir de mejor manera las curvas de los microorganismos más resistentes al tratamiento, que presentaban zona de hombro o cola con una población remanente viable. Mientras que el modelo de Weibull permitió estudiar el comportamiento de la población, y describir de mejor manera el efecto de los tratamientos combinados. En conclusión, la emulsificación de cinamaldehído con proteína de suero de leche aumentó la actividad antimicrobiana, lo que podría permitir su futura implementación como agente antimicrobiano en bebidas proteicas. Es necesario seguir estudiando la emulsificación de la vainillina para mejorar su incorporación a las bebidas proteicas y su actividad antimicrobiana.

## 1. ABSTRACT

The use of synthetic antimicrobial agents has been disputed by the consumers. A proposed solution might be using essential oils, nonetheless, the use is limited by low solubility and the possibility of change in aroma and flavor. Cinnamaldehyde and vanillin are the main compounds of cinnamon and vanilla bark, and they are used as flavor additives. Whey is a byproduct and the main contaminant of the dairy industry which proteins allow the formulation of emulsions. This technique could improve solubility and antimicrobial activity of essential oils. The objective is to study the effect of cinnamaldehyde and vanillin emulsification in the inactivation of microorganisms. For this, cinnamaldehyde and vanillin emulsion with whey protein concentrate were characterized and their ability to inactivate *E. coli*, *L. innocua* and *S. cerevisiae* was evaluated in whey beverages. Emulsification of cinnamaldehyde increased its antimicrobial activity reaching a reduction of 1,8; 3,5 y 5 *log* cycles in *E. coli*, *L. innocua* and *S. cerevisiae*, respectively. Meanwhile, emulsification of vanillin showed little effect on their antimicrobial activity, showing a reduction in 0,5; 1,0 y 1,2 *log* cycles in *E. coli*, *L. innocua* and *S. cerevisiae*, respectively. Combined treatment of cinnamaldehyde and vanillin exhibited an additive effect on *E. coli* and a synergistic effect on *S. cerevisiae*. Application of Gompertz and Weibull models allowed the mathematical description of antimicrobial emulsification and their effect on antimicrobial activity. The Gompertz model described the curves with shoulders and tails, and with resistant microorganisms. Meanwhile, the Weibull model allowed the study of the microorganism population and described the effect of the combined treatment. In summary, the

emulsification of cinnamaldehyde improved its antimicrobial activity, which could allow the future implementation of this compound as antimicrobial agent in whey beverages.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Suero de leche**

El suero de leche es la porción líquida producida como subproducto en los procesos de elaboración del queso o coagulación de la leche. La coagulación de las proteínas de la caseína, ya sea a través de la acción de quimiotripsina o química mineral/ácida deja un líquido de color amarillento, a veces azulado dependiendo del tipo de leche, al cual se le llama suero (Smithers, 2008). La composición del suero de leche está dada por un 93-94% de agua y un 6-7% de sólidos solubles, desglosados en: lactosa (4,5 - 5,0%), proteínas solubles (0,7 - 0,9%), sales minerales (0,6 - 1,0%) y trazas de vitaminas del grupo B. La calidad del suero es excepcional, pues presenta un valor biológico superior a las proteínas del huevo y 1,4 veces mayor a la proteína de la soya. Además tiene un 92% de utilización neta proteica y una máxima digestibilidad (Mazorra-Manzano y Moreno-Hernández, 2019).

#### **2.1.1. Efecto en el medioambiente**

El suero de leche contiene lactosa y proteínas que no son caseínas, y por ende es un subproducto con alta carga orgánica asociada a una alta demanda biológica de oxígeno y caducidad. Este es considerado el contaminante más importante de la industria láctea tanto por su carga orgánica y volumen (Moguel-Castañeda et al., 2020). La creciente conciencia medioambiental y alto potencial contaminante de este subproducto conlleva esfuerzos para que vuelva a la cadena de alimentos humana de alguna manera. La producción mundial de queso en el año 2021 fue de 18997

toneladas de queso (OECD, 2022). Considerando que por cada kilogramo de queso se forman entre 8,5 - 9,0 litros de suero (Schoina et al., 2019) se producen sobre 160 millones de toneladas al año. El suero de leche muestra una demanda biológica de oxígeno entre 27 - 60 g/L y una demanda química de oxígeno entre 50 - 102 g/L. Al compararlo con las aguas servidas domésticas, la carga de oxígeno del suero corresponde a una contaminación de 100 veces más que la de las aguas domésticas (Carvalho et al., 2013). Si el efluente no es tratado y es liberado a cuerpos de agua, canales de irrigación o tierra conlleva un problema serio de contaminación ambiental y de aguas, ya que afecta la estructura fisicoquímica del suelo, disminuyendo el rendimiento de los cultivos y reduce la vida acuática al reducir el oxígeno disuelto en el agua (Marwaha y Kennedy, 2007). Por lo tanto, reutilizar este subproducto es una oportunidad de establecer un proceso de economía circular.

### **2.1.2. Efectos en la nutrición**

El suero de leche puede influir positivamente en la salud humana ya que esta contiene un gran porcentaje de los sólidos de la leche, siendo la mayoría en forma de proteínas, así como lactosa, minerales y vitaminas solubles (Smithers, 2008). Uno de los aspectos principales de la proteína de suero de leche es su alta digestibilidad y un perfil proteico de alta calidad. Una de las razones de la detención del crecimiento de los niños es la falta de proteínas o que no se alcanzan a suplir los aminoácidos esenciales. Estudios han demostrado que una intervención en la dieta con aislado de proteína de suero de leche permite la recuperación de la malnutrición en niños en hasta un 80% (Stobaugh et al., 2016).

Por otra parte, acerca del sobrepeso, la proteína de suero de leche también es una opción para combatir la sobrenutrición. El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgos primarios para las enfermedades crónicas no transmitibles como la diabetes, desórdenes musculares y cardiovasculares, y algunos cánceres (WHO, 2021). La proteína de suero de leche es efectiva ya que genera cambios en el metabolismo energético y en la señalización celular. Las proteínas poseen un mayor efecto en la sensación de saciedad, lo que puede provocar una disminución de la ingesta calórica. Además, las proteínas requieren un mayor gasto energético que los carbohidratos o grasas para ser usadas en el metabolismo (Leidy et al., 2015). La proteína de alta calidad como la del suero de leche ha demostrado disminuir la grasa corporal en poblaciones obesas que no han entrenado (Baer et al., 2011), el cual se atribuye principalmente al efecto termogénico de la proteína de suero de leche.

La sarcopenia es una condición asociada a la pérdida de función y masa muscular, la cual está correlacionada con desventajas físicas, la pérdida de movilidad y al final, la muerte. Es principalmente observada en edades avanzadas de la vejez, en los cuales los individuos desde los 40 años o menos empiezan a perder músculo, la cual se va acelerando con el tiempo (Chalé et al., 2013). La suplementación sumada a ejercicios de resistencia muestran efectos positivos como mayor densidad muscular, mayor fuerza y mejor función física versus una dieta isocalórica sin suplementación proteica (Camargo et al., 2020), y por ende, una mejora en la calidad de vida.

Estas proteínas no solo presentan un perfil aminoacídico rico y balanceado, sino que también poseen actividad biológica *in vivo*. Estas contienen un alto porcentaje de aminoácidos de cadena ramificada, que incluye leucina, isoleucina y valina, los cuales

poseen funciones en el metabolismo, la homeostasis de glucosa y la función neuronal (Hutson et al., 2001; Yang et al., 2010). La leucina es conocida por regular la síntesis de músculo esquelético (Hulmi et al., 2010). Además, estas contienen aminoácidos sulfurados como lo es la cisteína, la cual se necesita para la síntesis de glutatión, participante del sistema para combatir el estrés oxidativo (Kerksick y Willoughby, 2005). Asimismo, la digestión enzimática y/o la fermentación de las proteínas produce péptidos, los cuales son secuencias de aminoácidos que tienen actividad biológica, entre las que se encuentran el crecimiento óseo, promueve el aumento de masa muscular, antihipertensiva, antioxidante, antidiabética, antimicrobiana, inmunomodulador y citomodulador (Gallo et al., 2022).

La actividad antihipertensiva se debe a que los péptidos tienen la capacidad de inhibir la enzima convertidora de angiotensina I, la cual regula la presión sanguínea periférica. La inhibición de esta enzima está asociada a otros parámetros de buena salud, como lo es la disminución de los niveles de colesterol total, triglicéridos y LDL, sin afectar los niveles de HDL (Rice et al., 2011).

La actividad antioxidante depende de varios aspectos, como lo es la composición, estructura e hidrofobicidad. Los aminoácidos Tyr, Trp, Met, Lys, Cys e His son conocidos por tener actividad antioxidante propia (Wang y de Mejia, 2005). Tyr, Trp e His son los aminoácidos con mayor actividad ya que poseen grupos aromáticos los cuales pueden donar protones para estabilizar a los radicales inestables. Cys, por su parte tiene una función similar a través de su grupo sulfhidrilo. Asimismo, se ha visto que los péptidos tienen la capacidad de inhibir la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Ma et al., 2016).

La actividad antidiabética está presente a través de varios mecanismos de acción. Uno es la presencia de aminoácidos de cadena ramificada que son importantes en el metabolismo de la glucosa, como por ejemplo, estos pueden estimular la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas (Newsholme et al., 2010). También, los péptidos presentan actividad de enzimas que regulan los niveles de glucosa séricos como la dipeptil peptidasa IV,  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. (Lacroix y Li-Chan, 2014a, 2014b).

El principal efecto antimicrobiano se debe a la presencia de proteínas menores con actividad antimicrobiana como la lisozima y la lactoferrina. Además, se ha visto que algunos péptidos presentan una actividad fuerte contra bacterias Gram+ y débil contra bacterias Gram- (Pellegrini et al., 2001). Finalmente, el efecto citomodulador de algunos péptidos, referido a la capacidad anticancerígena se ha demostrado en algunas líneas celulares como las de adenocarcinoma colorectal Caco-2 (De Simone et al., 2009).

### **2.1.3. Composición proteica del suero de leche**

Las proteínas del suero de leche son las proteínas que no están relacionadas con la caseína micelar o partículas lácteas, que se separan en la coagulación al formar el queso.

#### **Componentes mayores**

a)  $\beta$ -lactoglobulina: representa entre el 50 - 60% de las proteínas séricas. Es una proteína globular de 162 aminoácidos, de una masa molecular de alrededor de 18300 Da. Contiene una gran cantidad de aminoácidos de cadena ramificada y aminoácidos

sulfurados (O'Mahony y Fox, 2013). El alto contenido de azufre es un indicador que puede participar en el sistema inmune atribuido a una mayor síntesis de glutatión (Bounous, 2000). Debido a su estructura de cáliz, posee un bolsillo de unión para ligandos hidrofóbicos y anfipáticos. Esta funcionalidad biológica le permite aplicaciones tecnológicas, como es la formación de geles, espumas y emulsiones (Bourbon et al., 2019).

b)  $\alpha$ -lactoalbúmina: es la segunda proteína del suero de leche más abundante y representa alrededor de un 20-30% de las proteínas séricas. Es una metaloproteína cálcica de bajo peso molecular de 123 aminoácidos y una masa de 14178 Da. De su perfil aminoacídico, el 63,2% de sus residuos son aminoácidos esenciales (Farrell et al., 2004), los que la hace una rica fuente proteica. Se le ha asociado a una mejoría en las funciones cognitivas de pacientes depresivos por su alta razón triptófano/aminoácidos largos neutros, necesaria para la síntesis de serotonina (Merens et al., 2005). Se ha demostrado que purificada, forma complejos con ácido oleico que presenta actividad contra células tumorales, moléculas tumorocidas conocidas como HAMLET (Ho et al., 2017).

c) Seroalbúminas: representan alrededor del 8 - 10% de las proteínas séricas. Tiene 583 aminoácidos y una masa molecular de 66466 Da. Es altamente estructurada teniendo 3 dominios helicoides los cuales cada uno se subdivide en dos subdominios, teniendo así un total de 6 subdominios cada una (Farrell et al., 2004). Al igual que la albúmina humana, esta posee una increíble capacidad de unión a ligando entre los que se encuentran ácidos grasos, metabolitos, nutrientes y metales (Majorek et al., 2012).

d) Inmunoglobulinas: representan alrededor del 8-10% de las proteínas séricas. Las formas principales son la IgG, IgA e IgM. La IgG está en su forma monomérica de 160 KDa, mientras que IgA forma un dímero de 380 KDa e IgM un pentámero de unos 900 KDa. Su estructura es igual a la de las inmunoglobulinas humanas. Cada monómero presenta dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas, y cada monómero presenta dos regiones de unión a antígeno. Estas pueden tener una función inmune en el humano (El-Loly, 2007). Se ha promovido su incorporación en alimentos ya que reduce el riesgo de enfermedades gastrointestinales (Ulfman et al., 2018).

#### **Componentes menores:**

Estas representan el 1% del total de proteínas séricas. Algunas tienen mayor relevancia por su potencial biotecnológico como la actividad antibacteriana de la lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima. Las proteínas presentes serán resumidas en la Tabla 1.

#### **2.1.4. Obtención de concentrados de proteínas de suero**

Se utilizan membranas de ultrafiltración para la recuperación de las proteínas en forma nativa a partir del suero de leche. Esta separación se alcanza al utilizar una membrana con un corte de 10 KDa. El nivel de enriquecimiento proteico va variando según el factor de concentración de volumen (FCV), quedando así un concentrado de proteínas de suero de leche que varía en un 35 - 80%. Para un concentrado al 35% (WPC35) necesita un FCV de 4,5 - 7,0, mientras que para llegar al 80% (WPC80)

**Tabla 1**

**Proteínas menores presentes en el suero de leche**

<b>Proteína</b>	<b>Masa Molecular (KDa)</b>	<b>Función Principal</b>
Lactoferrina	80,0	Antibacterial/Puede unir dos átomos de hierro por molécula
Proteosa Peptona 3	29,3	Emulsificante/Inhibidor de la lipólisis
Osteopotina	28,0	Inmunomodulador/Inhibidor de la metástasis Antiinflamatoria/Moduladora de la actividad inmune
Glicomacropéptido	10,0	Formación de espumas y emulsiones
Lactoperoxidasa	78,0	Antibacterial
Lisozima	18,0	Antibacterial
Catepsina D	39,0	Sin mayor importancia
Fosfatasa ácida	42,0	Sin mayor importancia
Ribonucleasa I	13,7	Sin mayor importancia

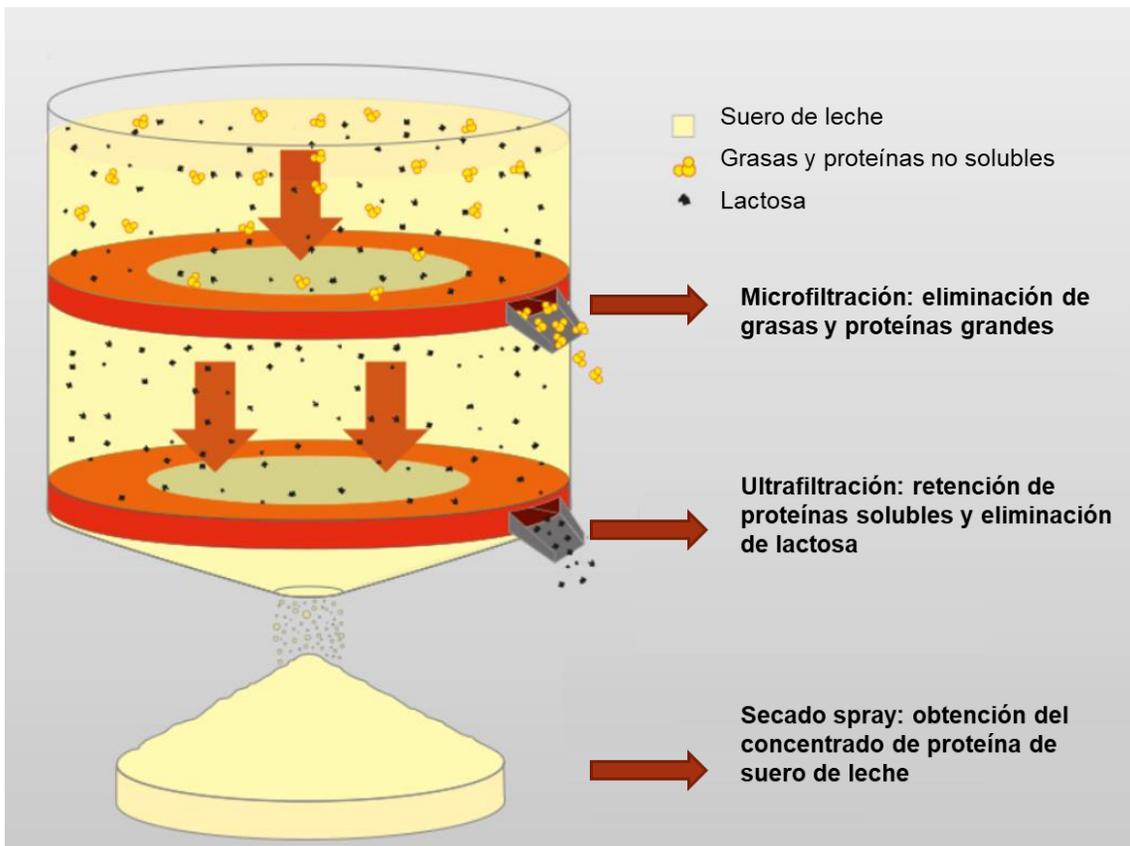
Modificado de (Deeth y Bansal, 2019)

requiere al menos un FCV de 30 - 35. El producto retenido en las membranas luego es procesado por secado spray para obtener el polvo concentrado (Kelly, 2019). Una reducción del porcentaje de grasa es necesario para la obtención del aislado de suero proteico (WPI), que se obtiene usando la habilidad de los fosfolípidos de agregarse usando calcio bajo un tratamiento de calor moderado (8 minutos a 50°C). Luego, por microfiltración usando un poro de 1,4 µm se separa el precipitado resultante. Finalmente, el permeado puede ser filtrado por osmosis reversa para concentrarlo aún más y remover los componentes no deseados (Reig et al., 2021). La información nutricional del WPC80 y WPI según American Dairy Products Institute se encuentra en la Tabla 2. Un resumen del proceso se observa en la Figura 1.

**Tabla 2**

**Información nutricional del concentrado y aislado de proteína de suero de leche**

<b>Composición (%)</b>	<b>WPC80</b>	<b>WPI</b>
Proteína	80,0 - 82,0	90,0 - 92,0
Grasa	4,0 - 8,0	0,5 - 1,0
Ceniza	3,5 - 5,0	2,0 - 3,0
Lactosa	4,0 - 10,0	0,5 - 1,0
Humedad	3,5 - 5,0	4,0 - 5,0



**Figura 1.** Proceso de obtención de un concentrado de proteína de suero de leche.

### **2.1.5. Alimentos funcionales con proteína de suero de leche**

Los alimentos funcionales son cualquier producto alimenticio modificado con intención, para su uso sistemático en la dieta de todos los grupos etarios de la población saludable, para la reducción del riesgo de desarrollar enfermedades asociadas a la nutrición, manteniendo y mejorando la calidad de vida debido a la presencia en su composición de ingredientes fisiológicamente funcionales y que pueden tener beneficios para la salud humana, en adición a los nutrientes tradicionales que este contiene (Kryuchkova et al., 2022). El consumo de proteína de suero de leche se asocia a múltiples beneficios para la salud, y, debido a su alto valor nutritivo, el suero por sí mismo es un recurso potencial para generar productos con valor agregado; sin embargo, no es consumido en su forma sin procesar por no tener un sabor apetecible (Schoina et al., 2019). Debido a esto, una de las formas más comunes para utilizar este subproducto es la producción de bebidas proteicas con suero de leche, lo cual consiste en combinar el suero de leche con un concentrado de jugo de frutas (Jelen, 2009). Además, la creación de bebidas proteicas a partir del suero de leche es una oportunidad de establecer un proceso de economía circular, es decir, la optimización de recursos naturales los cuales son reusados, dándole un valor agregado, reduciendo los residuos y causando un menor impacto al medioambiente (Rood et al., 2017), y, por ende, debido al incremento del llamado consumismo verde, es de interés desarrollar un prototipo de este producto que pueda ser incorporado al mercado.

## 2.2. Emulsiones

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles, en los cuales uno de estos está disperso como pequeñas gotas en el otro. Los diámetros de las gotas usualmente se encuentran entre 100 nm y 100  $\mu$ m (McClements, 2016). Las emulsiones se clasifican según la relativa distribución espacial de las fases acuosas y de aceite. Una emulsión aceite en agua se define como una dispersión coloidal compuesta de pequeñas gotas de aceite dispersas en una fase continua acuosa, estabilizada por la adición de emulsificantes. Las emulsiones aceite en agua se encuentran en muchos alimentos, como la leche y la mayonesa. Este tipo de emulsiones se usa principalmente para encapsular compuestos funcionales como vitaminas liposolubles o administración de drogas. Debido a la cinética e inestabilidad termodinámica de la emulsión, los surfactantes o emulsificantes son requeridos para prevenir la desestabilización durante largos tiempos de almacenamiento (Ferraz et al., 2021). Los emulsificantes son moléculas con una superficie activa que se adsorben a la superficie de las gotas formadas durante la homogenización, formando una capa protectora que previene que las gotas se agreguen (McClements, 2016). Estos emulsificantes se componen de un lado hidrofóbico y un lado hidrofílico, permitiendo así la cara hidrofóbica interactuar con la fase dispersa (aceite) y la hidrofílica con la fase continua (medio acuoso). Las emulsiones se forman principalmente induciendo estrés mecánico tipo cizalla usando un homogenizador, por sonicación o por presión (Lam y Nickerson, 2013). Un eficiente proceso de emulsificación es capaz de formar emulsiones de tamaño pequeño y distribución homogénea. Estas características son función de dos fuerzas opuestas, la ruptura de la gota y la coalescencia entre gotas. Estas propiedades son dependientes del mecanismo de homogenización, el tipo y

concentración del emulsionante, la razón volumen/masa de la fase dispersa, la viscosidad, el tiempo de adsorción del emulsionante en la superficie de la gota y la frecuencia y tiempo de las colisiones entre gota y gota (Adjonu et al., 2014). Las emulsiones son una de las estructuras alimenticias más importantes, ya que confieren propiedades sensoriales favorables como textura, sabor y apariencia en el producto final.

### **2.2.1. Procesos de desestabilización en las emulsiones aceite en agua**

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables que, por su naturaleza, al pasar el tiempo tienden a separarse en dos fases: agua y aceite. Este fenómeno se lleva a cabo a través de diferentes mecanismos, los cuales incluyen separación gravitacional (cremado y sedimentación), floculación, coalescencia y maduración de Ostwald (Figura 2) (Cai et al., 2023).

La separación gravitacional ocurre porque las gotas tienen una densidad diferente a la del líquido que los rodea, entonces la fuerza gravitacional actúa sobre ellas. Si las gotas tienen menor densidad que el líquido, tienen la tendencia de ir hacia arriba, lo que se refiere como cremado. Al contrario, si las gotas tienen mayor densidad que el líquido, tienden a moverse hacia abajo, lo que se refiere a la sedimentación (McClements, 2016). Como la densidad de los aceites esenciales es menor a la del agua, estas tienden a acumularse en la parte superior, lo que conlleva al cremado. Las fuerzas que determinan la velocidad del cremado de las gotas son la gravedad y el arraste viscoso, la cual puede ser estimada por la ecuación de Stokes:

$$v = \frac{2(\rho_g - \rho_f)}{9\eta} g R^2$$

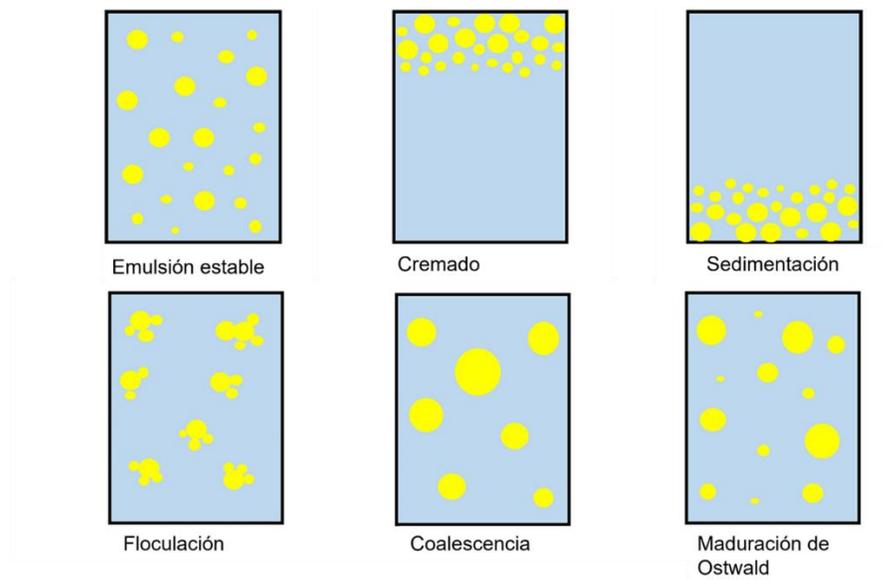
donde  $v$  es la velocidad de la gota,  $\rho_g$  y  $\rho_f$  son las densidades de la gota y el fluido,  $\eta$  es la viscosidad dinámica del fluido,  $g$  es la gravedad y  $R$  el radio de la gota. De esto se deduce que para obtener emulsiones más estables deben tener un menor tamaño de gota, ya que así el cremado será más lento. Además de esto, el aumentar la viscosidad con agentes espesantes puede disminuir la velocidad del cremado (Wilde, 2019).

La floculación es el proceso de combinar dos o más gotas, pero estas mantienen su integridad. Esta preserva el radio de las gotas, pero se forman agregados o cluster que aceleran la separación gravitacional, lo que es perjudicial para la estabilidad de la emulsión. Sin embargo, también puede llevar a un aumento de la viscosidad, lo que es crucial para una emulsión estable. La ocurrencia de floculación depende de la fuerza de interacción entre las gotas, las que incluyen fuerzas de atracción (fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas), y de repulsión (impedimento estérico y repulsión electroestática). Cuando la atracción es dominante, las gotas floculan. En general, los emulsificantes inhiben este proceso entre las gotas generando una fuerte repulsión electroestática e impedimento estérico (Niu et al., 2023).

La coalescencia es el proceso en que dos o más gotas se aproximan y se fusionan para formar una gota más grande. Este fenómeno ocurre cuando las fuerzas atractivas sobrepasan a las de repulsión, y cuando las capas interfaciales de las gotas se rompen cuando estas entran en contacto (McClements y Jafari, 2018). Por lo tanto,

alterar la cara interfacial, a través de una multicapa usando una mezcla de agentes emulsificantes puede prevenir la coalescencia.

La maduración de Ostwald es un proceso difusional de transferencia de masa en la que las gotas más grandes en la emulsión crecen a costas de las más pequeñas debido a la difusión de moléculas de aceite desde las gotas más pequeñas a gotas más grandes a través de la fase continua (Cai et al., 2023). De acuerdo a la ecuación de Kelvin, las gotas más pequeñas son más solubles que las gotas más grandes, lo que quiere decir que hay mayor concentración de aceite en las gotas más pequeñas. El aceite se mueve debido a este gradiente de concentración (Niu et al., 2023). El principal factor limitante es la solubilidad del lípido en la fase continua, que en general es baja (Wilde, 2019). Por lo tanto, puede ser un problema principalmente cuando se usan aceites que tienen una solubilidad relativamente alta en agua.



**Figura 2.** El fenómeno de inestabilidad en emulsiones aceite en agua. (Modificado de Niu et al., 2023)

### **2.2.2 Proteínas como agente emulsificante**

En la industria alimenticia, se usan principalmente dos tipos de emulsificantes, los carbohidratos y las proteínas. Las proteínas son conocidas por ser fácilmente absorbidas en la interfaz agua-aceite, proporcionando una emulsión con gran estabilidad cinética, especialmente por repulsión eléctrica debido a su amplia superficie cargada (Campelo et al., 2017). Son polímeros anfifílicos que forman films gruesos y flexibles que están fuertemente anclados a la interfase aceite-agua. Los principales dos mecanismos de estabilización son (a) estabilización estérica y (b) repulsión electrostática (de Castro et al., 2017). Dependiendo del tamaño de la proteína, su estructura y conformación, se crea una estabilización estérica, formada principalmente por *loops* o segmentos de cola que están cargados y restringen la capacidad de las gotas de interactuar entre ellas (Lam y Nickerson, 2013). En el segundo caso, la repulsión electrostática resulta de la interacción entre las dobles capas eléctricas que rodean las gotas. Cuando estas capas se empiezan a superponer es cuando ocurre la repulsión. Las proteínas estabilizan más las emulsiones por repulsión electrostática que por estabilización estérica (de Castro et al., 2017). Por lo tanto, las proteínas deben trabajarse bajo condiciones de pH que no estén cerca del punto isoeléctrico.

### **2.2.3 Proteínas del suero de leche y emulsiones**

Como la proteína de suero de leche es un emulsificante y un compuesto bioactivo, esta cumple un doble rol, el cual es beneficioso para el desarrollo de productos funcionales. Las proteínas del suero de leche contienen regiones

hidrofóbicas e hidrofílicas las cuales se adsorben rápidamente en la interfase aceite-agua para formar un film protector, el cual provee un soporte a través de interacciones electroestáticas y espaciales. La superficie hidrofóbica afecta a la capacidad de adsorción proteica en el lado oleoso de la interfase. A mayor grado de integración en el lado oleoso, mayor es la capacidad emulsificadora (Zhao et al., 2022a). El concentrado de proteína de suero de leche ha sido usado para emulsionar diferentes tipos de compuestos naturales, como el aceite de romero, anís, manzanilla, clavo de olor, albahaca y canela (Teplá et al., 2016).

### **2.3 Métodos tradicionales de inactivación microbiana**

Los preservantes sintetizados químicamente tales como sorbato de potasio y benzoato de sodio, entre otros, han sido usados por la industria alimentaria en las últimas décadas. Sin embargo, el uso de estos compuestos químicos artificiales para controlar el deterioro de los alimentos y el crecimiento microbiano es controversial, ya que se ha reportado que pueden causar enfermedades respiratorias y otros riesgos a la salud (Zhang et al., 2016a). Además, estos tienen períodos lentos de degradación, lo que conlleva a problemas medioambientales como la contaminación (Calo et al., 2015). Otro de los métodos tradicionales es el procesamiento térmico de los alimentos, cuya finalidad es la muerte de los microorganismos por calor. Sin embargo, esta técnica puede disminuir las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos debido a la denaturación proteica y la pérdida de vitaminas y de compuestos volátiles, reduciendo así la aceptabilidad del consumidor por el producto (Cava-Roda, et al., 2012a). Debido a los problemas anteriormente expuestos, la industria alimenticia ha

buscado reemplazar y/o complementar las técnicas de preservación tradicionales por técnicas menos invasivas como respuesta. Asimismo, los consumidores tienden a elegir deliberadamente alimentos mínimamente procesados, es decir, aquellos que tienen menos aditivos y/o que contienen aditivos naturales (Martínez-Graciá et al., 2015). Para suplir estas demandas se encuentran diferentes soluciones como la implementación de antimicrobianos naturales.

## **2.4 Productos naturales y antimicrobianos**

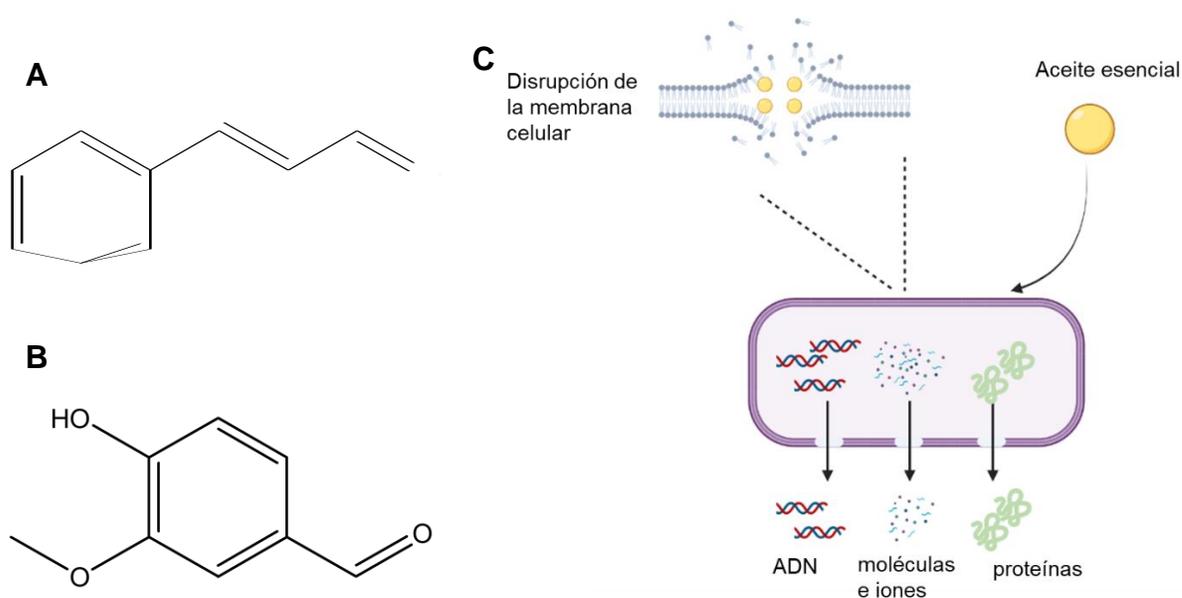
Los productos naturales, derivados de plantas han sido utilizados con fines medicinales desde tiempos ancestrales, teniendo resultados variados en su efectividad para curar y prevenir enfermedades. Dentro de ellos, los aceites esenciales, que son los líquidos aromáticos obtenidos de plantas, son usados como saborizantes y tienen actividad antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiviral y larvicida. Por lo tanto, estas características permiten que sean usadas como preservantes de alimentos (Negi, 2012). Sin embargo, su aplicación en la industria alimentaria es escasa y está limitada por el sabor, hidrofobicidad, volatilidad y sensibilidad frente a condiciones ambientales tales como oxígeno, luz y calor (Zhu et al., 2021). Estos compuestos son pequeñas moléculas orgánicas entre las que se incluyen principalmente terpenos, terpenoides y polifenoles los cuales son reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (Bakkali et al., 2008). A pesar del interés de utilizar estos compuestos como agentes microbianos, estos poseen una eficiencia variable, ya que se ven afectados tanto con el número de microorganismos contaminantes, las condiciones de almacenamiento y el alimento aplicado, cuyos pH y componentes de la matriz podrían

reducir el efecto antimicrobiano (Martínez-Graciá et al., 2015; Perricone et al., 2015). Debido a los efectos de la matriz alimentaria, es necesario conocer la susceptibilidad de los microorganismos frente a estos compuestos en diferentes alimentos, ya que la mayoría de los estudios analizan el efecto *in vitro* de estas moléculas. Existen dos antimicrobianos naturales de interés a analizar debido a su amplio uso, como lo son el cinamaldehído y la vainillina.

#### **2.4.1 Cinamaldehído**

El cinamaldehído (3-fenil-2-propenal) es el mayor constituyente del aceite esencial extraído de la corteza de canela y es usado ampliamente como aditivo en productos como bebidas, dulces, helados, goma de mascar y pastelería. La molécula de trans-cinamaldehído consiste en un grupo fenilo unido a un aldehído insaturado. Tiene una estructura plana y es muy poco soluble en agua, teniendo una solubilidad en agua de 1,1 g/L a 20°C (Ashakirin et al., 2017). Tiene dos sitios reactivos electrofílicos, el carbono  $\beta$  en los dobles enlaces conjugados y el carbono del grupo aldehído, cuya bioactividad depende de estos dos sitios (Doyle y Stephens, 2019). En la medicina tradicional china se utiliza para curar la gastritis, indigestión, problemas de circulación e inflamación. Además, tiene un alto espectro antimicrobiano contra bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Qu et al., 2019). Es un compuesto bien tolerado por los humanos, aceptado como seguro por la FDA y el Consejo Europeo y tiene una recomendación de consumo diario de 1,25 mg/kg (Zhu et al., 2017). El cinamaldehído es un compuesto fenólico que actúa a nivel de la membrana plasmática, afectando su estabilidad, lo que resulta en la fuga de iones, la pérdida del potencial de

membrana, y la salida de otras biomoléculas como proteínas y material genético (Shen et al., 2015). Además, el cinamaldehído es capaz de atravesar la membrana e interactuar con proteínas del citoplasma (Zhang, et al., 2016a). Es así como también podría ser un desestabilizador metabólico, inhibiendo enzimas importantes como por ejemplo, la esterol C-24 reductasa, enzima encargada en la biosíntesis de ergosterol en hongos (Wei et al., 2020). Un esquema simplificado del mecanismo de acción se muestra en la Figura 3. Presenta un amplio espectro de acción, en el que se incluyen varias bacterias Gram-positivas y Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* (Wan et al., 2023), *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* (Friedman, 2017), así como actividad antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger* (Shreaz et al., 2016).



**Figura 3.** Aceites esenciales y su mecanismo de acción. **A:** Estructura química del cinamaldehído; **B:** Estructura química de vainillina; **C:** Mecanismo de acción de los aceites esenciales. Creado con BioRender.com

### 2.4.2 Vainillina

La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es el fitoquímico predominante presente en las vainas de vainilla y es considerada como segura (GRAS). Su estado físico a temperatura ambiente es sólido, y poco soluble en agua a 20 °C (1 g/100 mL) (Arya et al., 2021). Es un aldehído fenólico, que tiene tres grupos funcionales: un aldehído, un hidroxilo y un éter localizados alrededor de un anillo aromático. El aldehído puede reaccionar con una amina primaria aromática o alifática, que en presencia de un catalizador básico forma un grupo azometino (base de Schiff), la cual es responsable de su bioactividad (Senthil Kumar et al., 2023). Además, este compuesto puede formar puentes de hidrógeno tanto en su grupo metoxilo, hidroxilo y carbonilo, y formar agregados gracias a interacciones  $\pi$ - $\pi$  con otros anillos aromáticos (Kumar et al., 2012). Este agente saborizante es usado extensivamente en el procesamiento de alimentos, y tiene propiedades antioxidantes, antimutagénicas, antigenotóxicas, también tienen actividad antimicótica y antibacteriana (Chung et al., 2009). Este agente es de uso familiar y aceptado por los consumidores. Además, son sensorialmente compatibles con frutas y derivados de frutas a concentraciones de vainillina tan altas como 3000 ppm (Ferrario et al., 2020). Su mecanismo de acción es similar al cinamaldehído. Al ser un compuesto hidrofóbico, este afecta a la estabilidad de la membrana plasmática, resultando en la disipación del gradiente de  $K^+$ , la homeostasis del pH interno y la inhibición de la respiración celular (Fitzgerald et al., 2004b). La actividad antibacteriana de este compuesto tiene un amplio espectro de acción, abarcando bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas entre las que se encuentra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (Olatunde et al.,

2022) y, presenta actividad antimicótica contra levaduras y hongos que deterioran los alimentos como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. (Pei et al., 2021) y *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida* spp. (Martău et al., 2021).

### **2.4.3 Antimicrobianos y emulsiones**

La baja solubilidad en agua de los aceites esenciales conlleva la necesidad de encontrar una estrategia para que puedan ser incorporados en alimentos con elevado contenido acuoso. Uno de los mecanismos más usados es la formación de emulsiones, las que permiten encapsular y proteger a los componentes lipofílicos, a la vez de favorecer su incorporación a alimentos con alta humedad (Chen et al., 2017). La evidencia indica que la proteína de suero de leche se puede usar como emulsificante y encapsular agentes antimicrobianos. Se ha reportado que métodos de encapsulación como la emulsificación podrían aumentar la actividad antimicrobiana del agente (Prakash et al., 2018). Por ejemplo, la nanoemulsión de WPC con aceite de clavo de olor potenció la actividad antimicrobiana del aceite, disminuyendo la concentración mínima inhibitoria (MIC) a la mitad tanto para *E. coli* como *B. subtilis* (Sharma et al., 2022). También se han probado emulsiones de proteína de suero de leche con antimicrobianos naturales en matrices alimentarias, tal como la emulsión de aceite de tomillo con WPC mostró una mejor actividad antimicrobiana que el aceite libre en melones para *E.coli*, *S. enterica* y *L. monocytogenes* (Zhang et al., 2016b). Para cinamaldehído, se han descrito otras estrategias de encapsulación, como la creación de nanocápsulas usando como agente encapsulante proteína de suero de leche y quitosano (Yang et al., 2021). En este estudio se evidenció que las nanocápsulas

poseen una actividad antimicrobiana mayor que el cinamaldehído libre frente a *S. aureus*, *E. coli*, *S. putrefaciens* y *P. fragi*. Sin embargo, hay estudios en donde la encapsulación puede no aumentar la actividad antimicrobiana. La emulsificación de carvacrol con WPI disminuyó la actividad antimicrobiana del carvacrol puro, tanto sobre *P. fluorescens*, *S. epidermitis* y *S. cerevisiae* (Mauriello et al., 2021). Por lo tanto, es de gran interés estudiar el efecto de la emulsificación en los compuestos de cinamaldehído y vainillina, y ver su potencial aumento en la actividad antimicrobiana al ser emulsionados.

## 2.5 Oportunidad de proyecto

Debido al alto valor nutricional de las proteínas de suero de leche, se propone crear un prototipo de bebida proteica en base a proteínas de suero. Además, esta bebida será lo más natural posible, siguiendo la nueva tendencia de consumismo verde, por lo que solo se usará estevia como endulzante, y cinamaldehído y vainillina como agentes de control antimicrobiano. Es importante estudiar estos dos agentes, ya que no se han reportado estudios de su uso en este tipo de matriz alimentaria. Por otra parte, utilizaremos la proteína de suero de leche como agente emulsificante de ambos antimicrobianos, y se evaluará si este tipo de encapsulación permite aumentar la actividad antimicrobiana. Para ello, se evaluará la inactivación de tres microorganismos modelo (*Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Saccharomyces cerevisiae*) en bebidas proteicas adicionadas con los antimicrobianos naturales vainillina y cinamaldehído emulsionados y sin emulsionar.

### **3. HIPÓTESIS**

La emulsificación del cinamaldehído y de la vainillina con proteína de suero de leche incrementará el efecto antimicrobiano en bebidas proteicas, respecto de los antimicrobianos sin emulsionar. Asimismo, la combinación de ambas emulsiones permitirá obtener un efecto aditivo o sinérgico sobre la inactivación microbiana durante el almacenamiento de las bebidas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Estudiar la emulsificación de los antimicrobianos naturales vainillina y cinamaldehído con proteínas de suero de leche y evaluar su efecto sobre la inactivación de microorganismos modelo en bebidas proteicas durante el almacenamiento en refrigeración.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Formular y caracterizar las emulsiones de cinamaldehído y vainillina utilizando concentrado proteico de suero de leche (WPC).
2. Estudiar la actividad antimicrobiana de la vainillina y cinamaldehído emulsionados sobre *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Saccharomyces cerevisiae* en bebidas proteicas, en comparación con los antimicrobianos sin emulsionar.
3. Evaluar el efecto aditivo/sinérgico de algunas combinaciones de ambos antimicrobianos emulsionados en las bebidas proteicas durante el almacenamiento en refrigeración.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materiales**

Ácido cítrico, caldo tripteína soya, caldo Saboraud dextrosa, agar tripteína soya (TSA) y agar papa dextrosa (PDA) fueron obtenidos de MERCK. Cinamaldehído y vainillina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Concentrado de proteína de suero de leche fue conseguido de PRINAL, Chile.

### **5.2 Preparación de inóculos**

Los inóculos de *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Listeria innocua* ATCC 33090 se prepararon transfiriendo un stock de células a una botella con 30 mL de caldo tripteína soya. Los cultivos fueron incubados en agitación a 37°C por toda la noche y fueron enumerados a través del método de conteo en placas. La densidad final de los cultivos fue aproximadamente de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. El inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 se preparó transfiriendo un stock de células a una botella con 30 mL de caldo Saboraud dextrosa. El cultivo fue incubado en agitación a 28°C por 48 horas y fue enumerado a través del método de conteo en placas. La densidad final del cultivo fue aproximadamente de  $1 \times 10^7$  UFC/mL.

### **5.3 Preparación de las bebidas proteicas**

El concentrado de proteína de suero de leche fue hidratado en agua estéril en condiciones de inocuidad. Luego, se realizó una mezcla de 70% de solución proteica y 30% de jugo clarificado de manzana UHT (L'Onda, Perú) para obtener una bebida

proteica al 4%. Se añadió Stevia (Daily, Chile) como endulzante y se ajustó a pH 4 con ácido cítrico. A esta bebida se le analizó la acidez titulable y el contenido de sólidos solubles (° Brix).

#### **5.4 Preparación de vainillina**

Se preparó un stock de vainillina a una concentración de 10 %p/v. Para esto se midió una cantidad adecuada de vainillina y se disolvió en una solución etanol-agua en una proporción 4:6, respectivamente. Diluciones del stock fueron utilizadas para obtener la concentración requerida en los experimentos posteriores.

#### **5.5 Preparación de las emulsiones**

Se prepararon emulsiones aceite en agua (O/W) de cinamaldehído 5% (E-CIN) y vainillina 5% (E-VN) con concentrado de proteína de suero de leche como agente emulsificante en proporciones WPC:CIN/VN 1:1 y 2:1 respectivamente. Para cinamaldehído, se dejó hidratar WPC con agua destilada estéril en agitación a 4°C por toda la noche. Se añadió el cinamaldehído y la solución resultante fue homogeneizada a alta velocidad usando un homogeneizador D-160 (DLAB Scientific Co., China) a 15.000 rpm por 5 min. Para vainillina, se dejó hidratar WPC con agua destilada estéril en agitación a 4°C por toda la noche. Se preparó una solución sobresaturada de vainillina en etanol al 20% v/v, la cual fue calentada a 70°C por 15 minutos, una vez disuelta y enfriada, se añadió a la suspensión proteica hidratada, y la solución resultante fue homogeneizada a alta velocidad usando un homogeneizador D-160

(DLAB Scientific Co., China) a 15.000 rpm por 5 min. Las emulsiones obtenidas fueron almacenadas a -20°C para los experimentos posteriores.

**Tabla 3**

**Composición final de las emulsiones de cinamaldehído y vainillina**

	<b>E-CIN 1:1</b>	<b>E-CIN 2:1</b>	<b>E-VN 1:1</b>	<b>E-VN 2:1</b>
Agua destilada	90 g	85 g	82 g	77 g
Cinamaldehído	5 g	5 g	-	-
Vainillina	-	-	5 g	5 g
WPC	5 g	10 g	5 g	10 g
Etanol	-	-	8 g	8 g
<b>Total</b>	100 g	100 g	100 g	100 g

## **5.6 Propiedades fisicoquímicas de las emulsiones**

### **5.6.1 Distribución del tamaño de partícula**

La distribución del tamaño de partícula fue determinada por difracción láser usando un analizador de tamaño de partícula Partica LA960 (Horiba, Japón). El índice de refracción utilizado para cinamaldehído y vainillina fue de 1,461 y 1,587 respectivamente, con agua como dispersante. Cada muestra fue medida en triplicado. Para comparar la distribución entre las subpoblaciones se consideró el promedio, la mediana, el q10 y el q90.

### **5.6.2 Ensayo de estabilidad**

El fenómeno de desestabilización de las emulsiones fue determinado por un analizador óptico de dispersión de luz múltiple estática usando un TurbiScan MA-2000

(Formulation, Francia). Las emulsiones fueron incubadas sin diluir en viales cilíndricos. El analizador óptico escaneó las muestras en los tubos dando la información de la retrodispersión (BS, por *backscattering* en inglés) cada 40 µm en función de la altura (mm), permitiendo así proveer información macroscópica respecto a cambios, como los procesos de clarificación, sedimentación y coalescencia. Las muestras se almacenaron a 4°C en oscuridad. Los viales fueron escaneados en duplicado en los días 0, 1, 5 y 8. La variación del *backscattering* ( $\Delta BS$ ) fue calculado como la diferencia de porcentaje promedio entre los días 0 y 8, usando entre los 7 mm y 10 mm para la parte superior del tubo, entre los 11 mm y 44 mm para la parte media, y entre 45 mm y 50 mm para la porción superior del tubo. El  $\Delta BS$  fue obtenido mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta BS = BS_8 - BS_0$$

Donde  $BS_8$  es el porcentaje de *backscattering* en el día 8 y  $BS_0$  es el porcentaje de *backscattering* en el día 0, respectivamente.

### **5.6.3 Eficiencia de encapsulación**

Se midió la eficiencia de encapsulación (%EE) de las emulsiones E-CIN 1:1 y E-VN 2:1 usando un espectrofotómetro UV/VIS UV3-200 modelo ATI (UNICAM, Reino Unido). Para cinamaldehído, se utilizó el método descrito en Jo et al., (2015). Para determinar el cinamaldehído libre, se mezcló etanol, n-hexano y la E-CIN en proporciones 2:3:1 (v:v:v) que se mezclaron y agitaron manualmente. El cinamaldehído libre quedó disuelto en el sobrenadante correspondiente a la fase de hexano. La concentración de cinamaldehído extraído fue determinada usando un

espectrofotómetro UV/VIS a  $\lambda$ : 285 nm, calculada indirectamente usando una curva de calibración con concentraciones de cinamaldehído disueltas en hexano.

Para vainillina, se utilizó el método modificado descrito en Noshad et al., (2015). Para esto, 1 mL de emulsión de vainillina se mezclaron con 10 mL de etanol. Luego de mezclar, los tubos se mantuvieron en reposo en oscuridad por 2 horas para la decantación del material de encapsulación. La concentración de vainillina libre fue determinada usando un espectrofotómetro UV/VIS a  $\lambda$ : 279 nm, calculada indirectamente usando una curva de calibración con concentraciones de vainillina disueltas en etanol. La eficiencia de encapsulación fue obtenida como porcentaje usando la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{\text{Total de antimicrobiano usado (g)} - \text{Antimicrobiano libre (g)}}{\text{Total de antimicrobiano usado (g)}} \times 100$$

#### **5.6.4 Tasa de liberación de los antimicrobianos naturales**

Las emulsiones E-CIN 1:1 y E-VN 2:1 se mantuvieron a 4°C en oscuridad para determinar la tasa de liberación. Para cinamaldehído se midió la liberación a los días 0, 1, 2, 3, 6 y 10 días, mientras que se estudió la liberación de vainillina por 7 días. Se usaron los métodos espectrofotométricos descritos anteriormente (sección 5.6.3). La tasa de liberación fue expresada como porcentaje del total de la cantidad del agente usado.

### **5.6.5 Observación microscópica**

Las microestructuras de las emulsiones y de las emulsiones en la bebida fueron observadas usando un microscopio óptico Carl Zeiss PrimoStar (ZEISS Microscopy, Alemania) con el lente óptico de 10X y 100X, equipado con una cámara digital EOS Rebel T3 (Canon, Japón). Las muestras fueron analizadas en duplicado en los días 0, 3 y 6. Las muestras se almacenaron a 4°C en oscuridad. Las imágenes fueron analizadas con ImageJ 1.24d (Schneider et al., 2012)

### **5.7 Cinéticas de inactivación microbiana**

Una vez seleccionadas las emulsiones de vainillina y cinamaldehído más estables, se evaluó la inactivación microbiana en las bebidas proteicas. El efecto de los agentes antimicrobianos se evaluó sobre los microorganismos modelos *E. coli*, *L. innocua* y *S. cerevisiae*. Un volumen apropiado del agente antimicrobiano o su correspondiente emulsión fue añadido a 49,9 mL de bebida proteica bajo agitación. Se evaluó el efecto del cinamaldehído y E-CIN a concentraciones de 0,75 g/L y 1,0 g/L, mientras que vainillina y E-VN a concentraciones de 1,0 g/L y 1,5 g/L. En cada botella se inocularon 100 µL del cultivo del microorganismo correspondiente. La densidad final del inóculo del cultivo en las bebidas fue aproximadamente de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para *E. coli* y *L. innocua*, y de  $1 \times 10^5$  UFC/mL para *S. cerevisiae*. Una vez inoculado, se tomó una muestra (t = 0 día) y se realizó el respectivo recuento microbiológico. También se realizaron los controles inoculando las bebidas sin antimicrobianos. Las bebidas inoculadas fueron almacenadas a 4°C en oscuridad por 14 días y se fueron tomando

muestras para analizar cada 48 horas. Cada condición se evaluó por triplicado en ensayos independientes.

### **5.8 Enumeración de células supervivientes**

Con la muestra de bebida inoculada de cada botella almacenada, se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona 0,1% p/p. Las células sobrevivientes se enumeraron a través del método de conteo en placa. *E. coli* y *L. innocua* se incubaron usando placas con TSA a 37°C por 24 horas, mientras que *S. cerevisiae* se incubó en placas con PDA a 30°C por 48 horas. Dos diluciones sucesivas se sembraron por duplicado, reportándose el promedio obtenido.

### **5.9 Modelamiento de las curvas de supervivencia**

Los resultados de la enumeración de células supervivientes se graficaron obteniéndose las curvas de supervivencia. Las curvas de supervivencia se generaron a partir de los datos experimentales graficando  $\log N_t/N_0$  (donde  $N_t$  es el número de UFC/mL a un tiempo determinado y  $N_0$  es el número inicial de UFC/mL) versus el tiempo de tratamiento. Adicionalmente, se aplicaron los siguientes modelos matemáticos para cuantificar la respuesta microbiana a través de los parámetros correspondientes:

### 5.9.1 Modelo de Gompertz

Las curvas de supervivencia se ajustaron a una versión modificada de la ecuación general de Gompertz (Linton et al., 1995):

$$\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = C e^{-e(A+Bt)} - C e^{-e(A)}$$

donde los parámetros estimados (A, B y C) representan las diferentes regiones de la curva de supervivencia: donde (A) es el hombro inicial [min]; (B), la máxima tasa de muerte [ $\text{min}^{-1}$ ], y (C) es el cambio en el número de supervivientes [-].

### 5.9.2 Modelo de Weibull

Las curvas de supervivencia se ajustaron a la forma acumulativa de la distribución de resistencias tipo Weibull (Peleg y Cole, 1998):

$$S_{(t)} = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) = b * t^n$$

donde  $S$  es la fracción sobreviviente de microorganismos,  $t$  es el tiempo de reacción,  $b$  y  $n$  son los parámetros de escala y forma respectivamente. El parámetro  $b$  en la función de Weibull representa el grado de inactivación de las células, mientras que, el parámetro  $n$  indica la concavidad de la curva de supervivencia. Los valores de  $b$  y  $n$  son luego usados para generar las curvas de frecuencia de resistencias usando la siguiente ecuación

$$\frac{d\phi}{dt_c} = b n t_c^{n-1} \exp(-b t_c^n)$$

donde  $t_c$  es una medida de la resistencia o sensibilidad del organismo y  $\frac{d\phi}{dt_c}$  es la distribución de Weibull correspondiente a  $t_c$ . Otros parámetros estadísticos (moda de distribución:  $t_{cm}$ ; promedio:  $\bar{t}_c$ ; varianza:  $\sigma_{tc}^2$ ; coeficiente de sesgo:  $v_1$ ) se calcularon con las ecuaciones reportadas por Peleg y Cole, (1998) para explicar de mejor manera las frecuencias observadas. La moda de la distribución  $t_{cm}$  representa el tiempo de tratamiento al cual la mayoría de la población muere o es inactivada. El promedio  $\bar{t}_c$  corresponde al tiempo de inactivación promedio con su respectiva varianza  $\sigma_{tc}^2$ . El coeficiente de sesgo  $v_1$ , representa la falta de simetría de la distribución.

### **5.10 Análisis estadístico**

Se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey para analizar si hay diferencias significativas entre los parámetros físicos de las emulsiones ( $p < 0,05$ ). Los parámetros de los modelos se obtuvieron a través de técnicas de regresión no lineal. Los modelos fueron validados internamente mediante el test de ANOVA, el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{adj}$ ) y la prueba de Fisher. Todos los análisis de regresión fueron aplicados usando Statgraphics Centurion XV.II® (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Datos físicos y químicos de los materiales.

Se obtuvo una mezcla proteica que contiene 70% de suspensión de concentrado de proteína de suero de leche y 30% jugo de manzana clarificado, endulzado con estevia y ajustado a pH 4. Debido a que es una mezcla, posee propiedades intermedias entre el jugo y la suspensión de WPC (Tabla 4).

**Tabla 4**

#### **Caracterización física y química de los ingredientes y la bebida proteica**

	<b>pH</b>	<b>Acidez titulable</b>	<b>°Brix</b>
Jugo de manzana	3,65 ± 0,05	0,277 ± 0,020	10,6 ± 0,1
Suspensión de proteína 5%	6,65 ± 0,23	0,067 ± 0,007	5,7 ± 0,1
<b>Bebida proteica*</b>	<b>5,15 ± 0,13</b>	<b>0,197 ± 0,034</b>	<b>6,8 ± 0,3</b>

\*Medición antes de ajustar el pH

En cuanto a la composición de azúcares, se observó que la suspensión proteica tiene alrededor de un 6,7% de lactosa, mientras que el jugo de manzana fue alrededor de 11%, correspondiente principalmente a fructosa. Por ende, la bebida tendrá estos dos azúcares presentes en su composición y un valor de sólidos solubles de 6,8 °Brix. Asimismo, se observa que la acidez de la bebida viene principalmente del jugo de manzana, por el contenido de ácido málico de esta fruta.

Se desarrolló una bebida funcional nutritiva en base a concentrado de proteína de leche y jugo de manzana. Ha habido otros intentos de combinar jugos de fruta con WPC, analizando la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores (Amaral et al., 2018; Islam et al., 2021; Oliveira et al., 2022; Pandey y Ojha, 2020). Dentro de

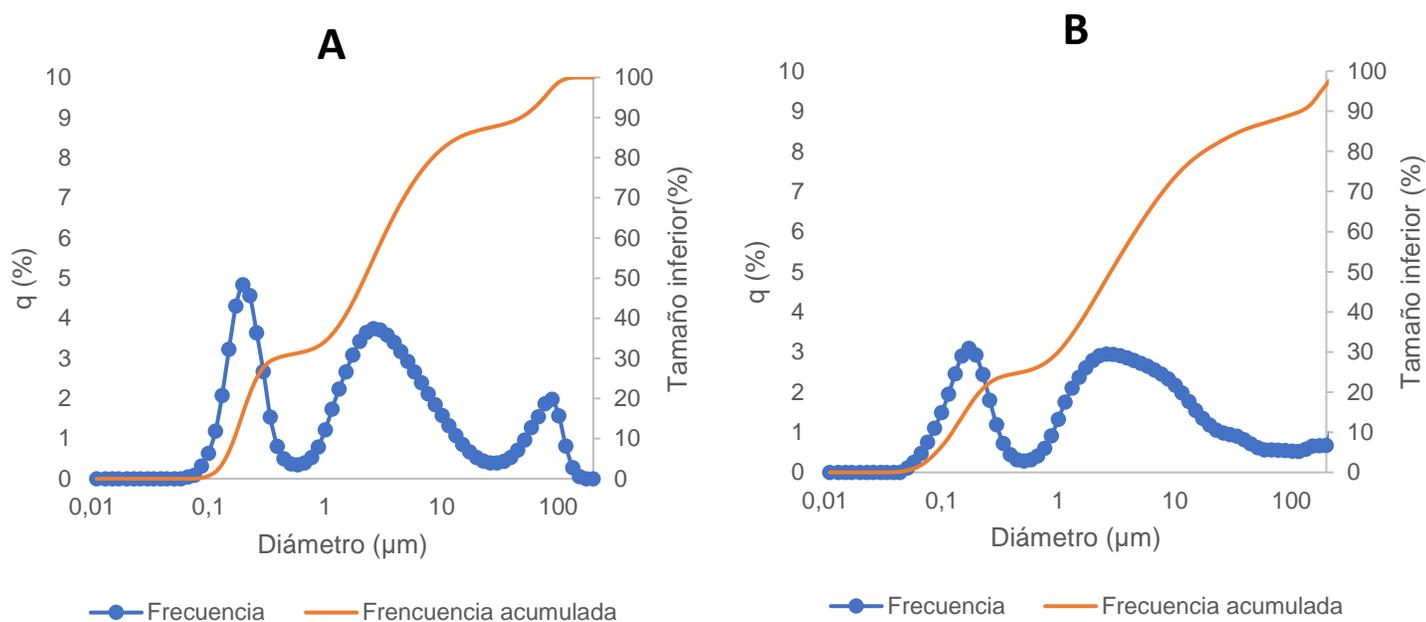
los desafíos, se encuentra obtener un producto que sea aceptado por los consumidores, ya que al aumentar el contenido de suero de leche, disminuye su aceptación (Oliveira et al., 2022). En el prototipo de producto desarrollado en esta investigación, se usó un 70% de suspensión de proteína de suero de leche (WPC reconstituido al 4%), con un 30% de jugo de manzana. El estudio de Islam et al., (2021), indica que al mezclar jugo de piña con suero de leche, este último podría alcanzar hasta un 35% de la bebida para ser aceptable. Nuestra bebida, tiene un porcentaje mayor de proteína (4%); sin embargo, hay que considerar que el concentrado de proteína difiere en composición con relación al suero de leche, que además aporta minerales y lactosa que influyen sobre el sabor. Además, hay que considerar el público objetivo, ya que una bebida alta en proteína estaría dirigida a personas que regularmente consumen productos altos en proteínas, como los deportistas. Asimismo, la intención era desarrollar una bebida lo más natural posible, por lo que se propuso reemplazar los antimicrobianos sintéticos por antimicrobianos naturales, para lo cual se desarrollaron emulsiones de cinamaldehído y vainillina. Éstos son los principales agentes antimicrobianos derivados de la canela y vainilla, respectivamente, con el fin de poder usarlos como método de conservación.

## **6.2 Propiedades físicas y químicas de las emulsiones**

### **6.2.1 Tamaño de partícula**

El tamaño de partícula es un primer indicador de estabilidad, ya que se ha observado que, a menor tamaño de partícula, más estable es la emulsión en el tiempo. Normalmente el rango observado en las micro emulsiones varía entre 0,2  $\mu\text{m}$  y 100

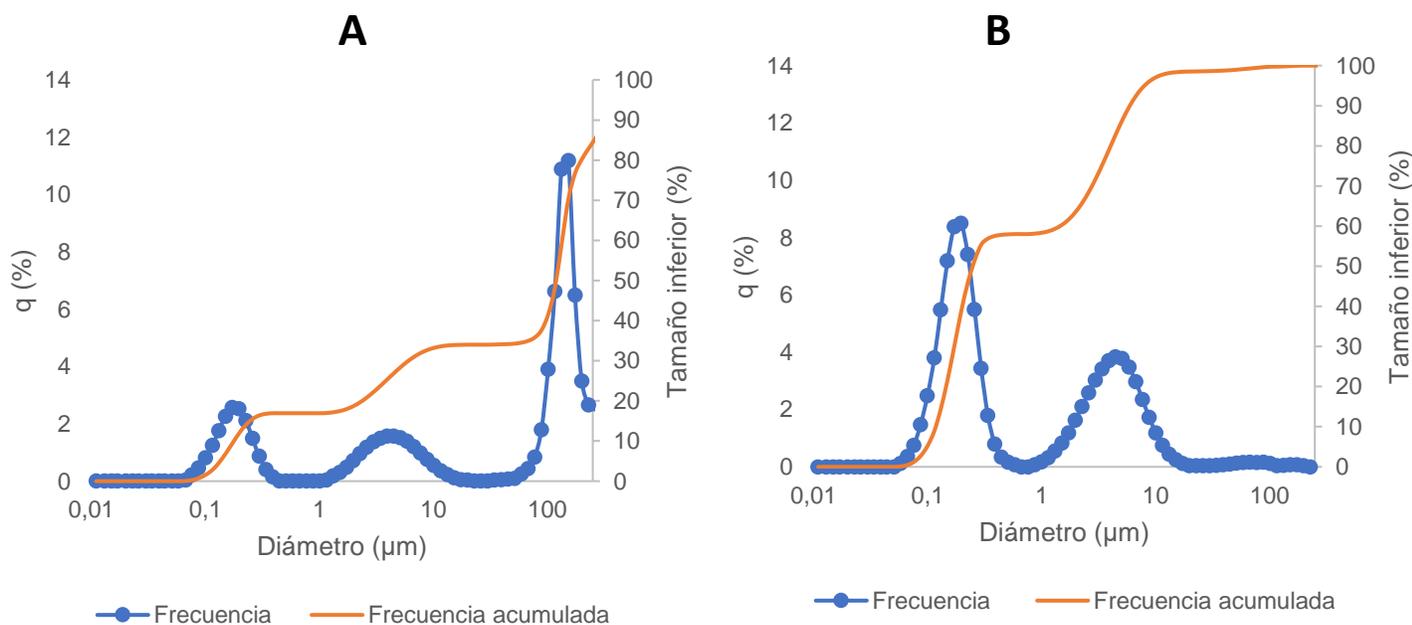
$\mu\text{m}$ . La emulsión de cinamaldehído E-CIN 1:1 obtuvo un promedio de  $11,3 \pm 23,8 \mu\text{m}$  (Figura 4A). La desviación estándar observada fue grande debido a que se presentaron 3 subpoblaciones de gotas, una con un promedio aproximado de  $0,2 \mu\text{m}$ , otra con un promedio de  $2 \mu\text{m}$  y otra en un promedio de  $90 \mu\text{m}$  (Figura 4A). El q10, la mediana y el q90 fueron de  $0,166 \pm 0,001 \mu\text{m}$ ;  $2,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$  y  $53,1 \pm 6,6 \mu\text{m}$ , respectivamente.



**Figura 4.** Distribución del tamaño de gota de la emulsión E-CIN. **A** 1:1; **B** 2:1

Mientras que, la emulsión de cinamaldehído E-CIN 2:1 obtuvo un promedio de  $17,8 \pm 27,9 \mu\text{m}$ . Se observaron dos poblaciones presentes en E-CIN 2:1, pero la población de mayor tamaño está menos definida (Figura 4B). El q10, la mediana y el q90 fueron de  $0,140 \pm 0,020 \mu\text{m}$ ;  $5,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$  y  $78,2 \pm 16,5 \mu\text{m}$ , respectivamente. No se apreciaron diferencias significativas entre ambas emulsiones, por lo cual se elige continuar los estudios con la E-CIN 1:1.

Por otro lado, la emulsión de vainillina E-VN 1:1 obtuvo un promedio de  $132,2 \pm 23,8 \mu\text{m}$ . (Figura 5). Se observaron tres subpoblaciones de gotas, en la cual la de mayor proporción tuvo un promedio aproximado de  $200 \mu\text{m}$  (Figura 5A). El q10, mediana y q90 fueron de  $0,182 \pm 0,020 \mu\text{m}$ ;  $119,0 \pm 14,1 \mu\text{m}$  y  $289,1 \pm 105,5 \mu\text{m}$ , respectivamente. Se observó que el tamaño de gota es demasiado grande, lo cual indica que probablemente sea una emulsión inestable. Mientras que, la emulsión de vainillina E-VN 2:1 obtuvo un promedio de  $3,1 \pm 10,4 \mu\text{m}$  (Figura 5B). El q10, mediana y q90 fueron de  $0,118 \pm 0,010 \mu\text{m}$ ,  $0,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$  y  $6,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$ , respectivamente. Se observó una disminución del tamaño de gota estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) al aumentar la concentración del agente emulsificante. Además, la población de mayor tamaño se redujo casi completamente, indicando que la emulsión E-VN 2:1 debería ser más estable.



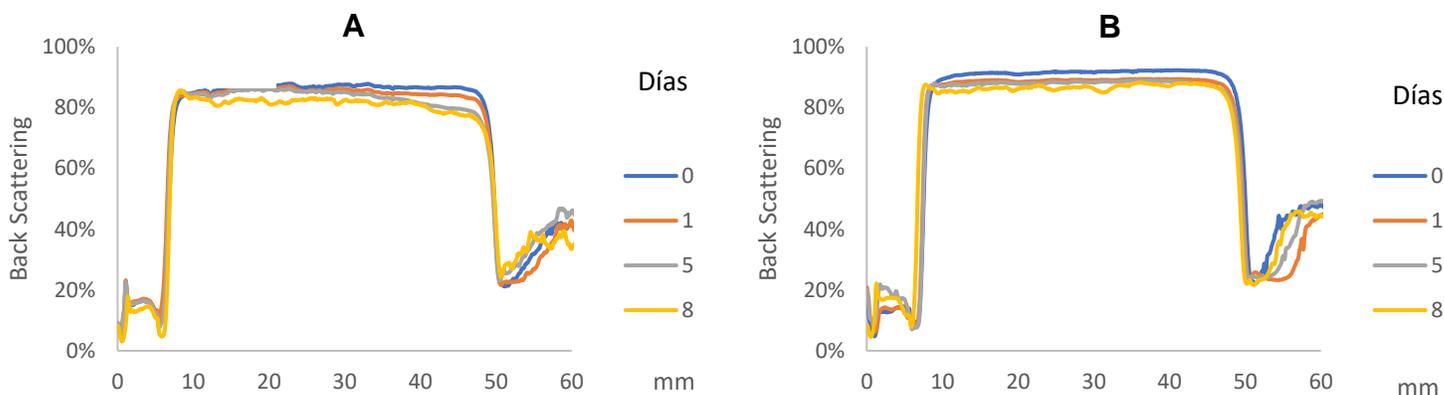
**Figura 5.** Distribución del tamaño de gota de la emulsión E-VN. **A** 1:1; **B** 2:1

El tamaño de gota de las emulsiones más estables fluctuó entre 3 - 15  $\mu\text{m}$ , lo cual es similar a lo obtenido por (Chen et al., (2017), en sus emulsiones de cinamaldehído con aislado de proteína de leche, elaboradas por homogenización a 12000 rpm por 3 minutos, obteniendo gotas de tamaño entre 5-10  $\mu\text{m}$ . En sus resultados, igualmente obtuvieron una segunda subpoblación de alrededor de 25  $\mu\text{m}$ , la cual también se ha observado en otros estudios al utilizar WPC como agente emulsificante (Ferraz et al., 2021). Campelo et al., (2017) obtuvo mejores resultados al usar proteína de suero de leche para emulsificar el aceite esencial de lima, obteniendo partículas de 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro usando ultrasonido como método de homogenización. Sharma et al., (2022) obtuvieron resultados similares con la emulsificación del aceite de clavo de olor al usar ultrasonido como método para formar las partículas. Asimismo, es favorable la combinación de técnicas para la obtención de emulsiones, tal como Turasan et al., (2015) al emulsificar el aceite de rosa mosqueta con una mezcla de WPC y maltodextrina obtiene un valor de tamaño de gota de 1,3  $\mu\text{m}$  usando homogenización a alta velocidad, el cual fue mejorado a 0,3  $\mu\text{m}$  cuando se combinó con la homogenización por ultrasonido. Es más, los estudios de Zhou et al., (2022) comparan diferentes métodos de emulsificación usando proteínas miofibrilares como agente encapsulante, observándose que el usar ultrasonido se obtienen emulsiones de tamaño de gota más pequeño y que son más estables en el tiempo.

### **6.2.2 Ensayos de estabilidad**

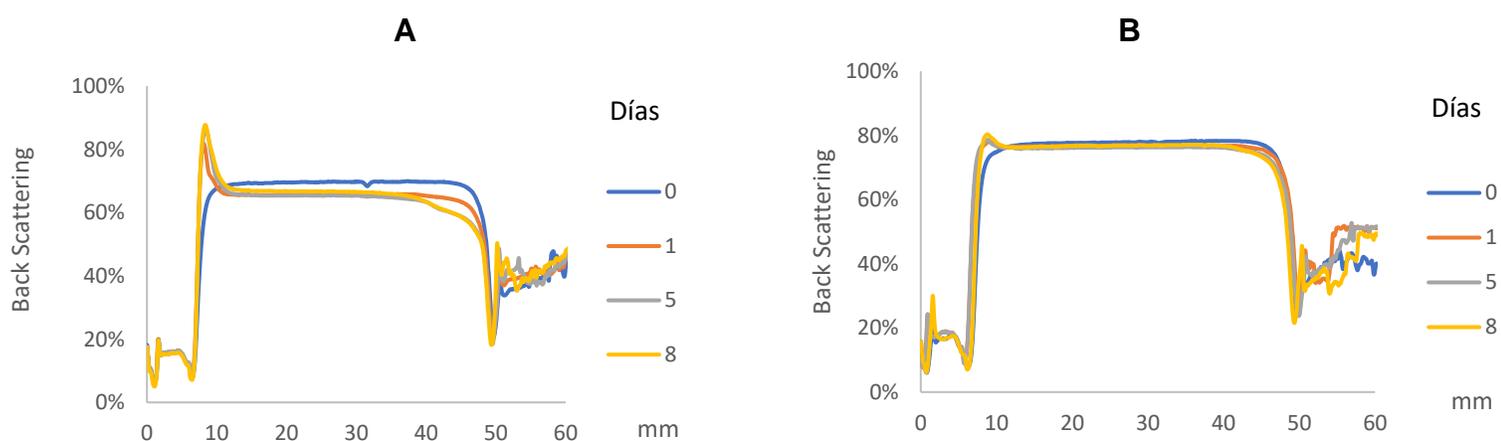
En este ensayo se midió la estabilidad de las emulsiones en el tiempo mediante la medición de la estabilidad óptica en base a la dispersión de luz (intensidad del *back*

*scattering*) durante el almacenamiento. Los resultados de las emulsiones de cinamaldehído indican que el principal proceso de desestabilización fue coalescencia, denotada por la disminución de la intensidad del *back scattering*. Asimismo, se puede observar un leve aumento en la parte inferior del tubo, indicando una leve sedimentación tanto para E-CIN 1:1 como para E-CIN 2:1 (Figura 6, Tabla 5). Además, se observó una disminución en la parte superior en E-CIN 1:1, el cual indica el aclarado, el cual no fue observado en la E-CIN 2:1, por lo que en el ensayo de estabilidad la emulsión E-CIN 2:1 es algo más estable que la E-CIN 1:1. Sin embargo, al comparar las variaciones de BS (Tabla 5), se observa claramente que no hay diferencias significativas entre  $\Delta$ BS de E-CIN 2:1 y E-CIN 1:1, ya que, a pesar de no tener el fenómeno de aclarado, presenta similar cambio en el *back scattering*.



**Figura 6.** Ensayo de estabilidad para las emulsiones de WPC:cinamaldehído. **A:** proporción 1:1; **B:** proporción 2:1

Por otro lado, la emulsión de vainillina E-VN 1:1 presentó una rápida desestabilización, presente desde el día 1 (Figura 7), la cual corresponde principalmente a sedimentación, observada por el claro aumento de *back scattering* en la parte inferior del tubo. En cambio, en la emulsión E-VN 2:1 se observó una leve sedimentación en comparación con E-VN 1:1. Además, hay un fenómeno de coalescencia, pero es mínimo. Al comparar los  $\Delta BS$ , se observan diferencias significativas de los valores entre E-VN 2:1 y E-VN 1:1, en especial en la parte inferior del tubo, corroborando la inestabilidad de E-VN 1:1 (Tabla 5).



**Figura 7.** Ensayo de estabilidad para las emulsiones de vainillina. **A:** proporción 1:1; **B:** proporción 2:1

**Tabla 5**

**Cambios en el back scattering (BS) en diferentes partes del tubo.**

	<b><math>\Delta</math> Back Scattering (<math>\Delta BS</math>)</b>			
	<b>E-CIN 1:1</b>	<b>E-CIN 2:1</b>	<b>E-VN 1:1</b>	<b>E-VN 2:1</b>
<b>Superior</b>	$-9,57 \pm 1,83\%^a$	$-7,33 \pm 0,10\%^a$	$-13,29 \pm 3,45\%^a$	$-7,03 \pm 0,62\%^b$
<b>Medio</b>	$-3,96 \pm 1,75\%^a$	$-3,01 \pm 1,91\%^a$	$-4,35 \pm 0,60\%^a$	$-2,20 \pm 0,73\%^b$
<b>Inferior</b>	$3,92 \pm 2,14\%^a$	$5,15 \pm 1,32\%^a$	$14,45 \pm 2,96\%^a$	$8,47 \pm 1,56\%^b$

Para los ensayos posteriores, se eligieron las emulsiones de E-CIN 1:1 y E-VN 2:1. Se seleccionó E-CIN 1:1, ya que no hubo diferencias significativas ni en el tamaño de gota ni en el ensayo de estabilidad, por lo tanto, se eligió a E-CIN 1:1 como óptima para ser usadas en las bebidas. Mientras que E-VN la proporción 1:1 claramente es inestable, y, por consiguiente, la formulación E-VN 2:1 fue seleccionada como la idónea para su uso posterior.

La estabilidad en el tiempo de almacenamiento es una de las características importantes a evaluar, ya que su desestabilización puede ocasionar la aparición de gotas en la superficie, cremación y separación de fases (Tomoda y Makino, 2014), lo cual es no deseable para el consumidor. Los resultados indicaron que tanto para las emulsiones de cinamaldehído y vainillina, ocurren los fenómenos de clarificación, floculación/coalescencia y sedimentación. La formulación E-VN 1:1 fue completamente inestable, lo cual fue solucionado parcialmente al añadir una mayor razón de agente encapsulante. Estudios anteriores, tanto realizados por homogenización a alta velocidad o por ultrasonido indican que el principal mecanismo de desestabilización es la coalescencia/floculación (Ferraz et al., 2021; Zhang et al., 2022). Otros estudios en los que utilizan mayores concentraciones de aceites esenciales (10 - 20%) indican que, además de la coalescencia ocurre un proceso de cremado, contrario a lo ocurrido en este estudio en el que se ocupó 5% de cinamaldehído (Gomes y Kurozawa, 2023; Paulo et al., 2020). Además, estos estudios que utilizan WPI y aislado de proteína de arroz, tienen en común que ocupan un porcentaje de proteína, entre un 0,5% - 1,5%, mientras que en esta investigación se utilizó al 5% y al 10%, indicando que este fenómeno es dependiente de la concentración de proteína usada. Por otro lado, un

resultado parecido fue obtenido por Fernández-Ávila et al., (2015), en el que al utilizar aislado de proteína de soya observa los mismos fenómenos que en este estudio, en el cual utilizaron un porcentaje de proteína similar (4%), pero usando un porcentaje alto de aceite de soya (20%). Interesantemente, al usar el aceite de soya al 10%, las emulsiones fueron más inestables, y su explicación a la desestabilización fue atribuida al gran tamaño de gota y al exceso de proteína usada. Por lo tanto, es importante evaluar cual es la relación agente emulsificante:antimicrobiano, ya que es un factor a considerar en la estabilidad de las emulsiones.

El fenómeno de sedimentación proteica ha sido minimizado previamente en emulsiones de cinamaldehído con proteína de suero de leche, en la que se añadieron triglicéridos de cadena media a bajas concentraciones (Chen et al., 2017). Por último, dentro de otros factores a considerar, está la denaturación proteica, ya que el WPC usado es reconstituido de un polvo obtenido por secado spray. Altos niveles de denaturación durante el secado producen partículas de mayor tamaño, las que tienden a precipitar al fondo del tubo y producir una clarificación en la parte superior, mientras que, bajos niveles de denaturación y tamaños de gotas pequeños aumentan la estabilidad de la emulsión (Dapueto et al., 2019).

### **6.2.3 Eficiencia de encapsulación y tasa de liberación**

Se analizó la eficiencia de encapsulación de las emulsiones seleccionadas E-CIN 1:1 y E-VN 2:1. Para E-CIN 1:1 la eficiencia fue de un 90,23%  $\pm$  0,29%; por lo tanto, la gran mayoría del compuesto activo se encuentra encapsulado en las gotas.

El porcentaje de cinamaldehído emulsificado es alto, siendo la encapsulación altamente eficiente.

Por otra parte, la eficiencia de encapsulación de E-VN 2:1 fue de 52,16%  $\pm$  1,44%, indicando que un poco más de la mitad del antimicrobiano no se encuentra emulsificado. En investigaciones posteriores se pueden estudiar modificaciones en las emulsiones de vainillina para aumentar la eficiencia de encapsulación.

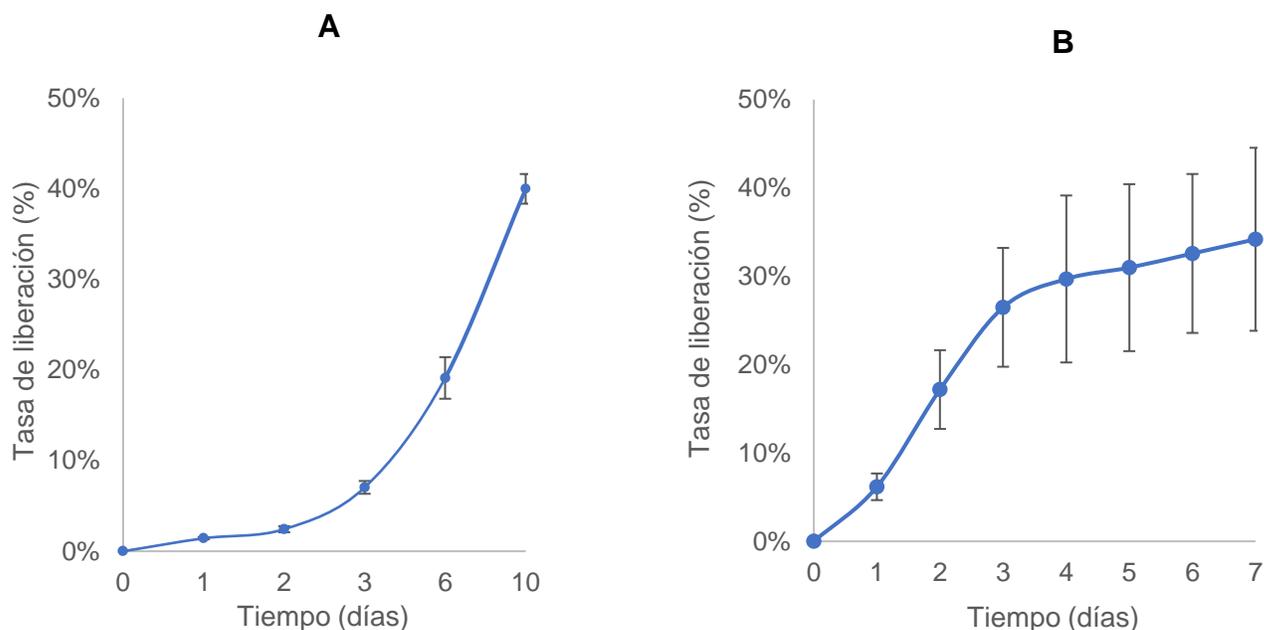
En cuanto a la eficiencia de encapsulación de cinamaldehído, Jo et al., (2015) obtuvieron eficiencias de encapsulación del 78% de cinamaldehído, usando Tween® 20 como agente emulsificante por homogenización con Ultraturax® a 10000 rpm, mientras que con WPC se obtuvo una mayor eficiencia de encapsulación, indicando la potencialidad de la proteína de suero de leche para encapsular agentes como el cinamaldehído. Este 90% de eficiencia es similar a los resultados de Zhang et al., (2023), quienes obtuvieron un porcentaje similar usando alginato de sodio como medio encapsulante. Por otro lado, si quisiéramos aumentar aún más la eficiencia de encapsulación, se podría usar una mezcla de WPC con un carbohidrato como la maltodextrina, ya que Ferraz et al., (2021) demostró que al co-encapsular aceite de resina de paprika y canela con WPC:maltodextrina en una relación 3:1, la eficiencia aumentó de un 84% a un 96%.

Mientras que, la encapsulación de vainillina obtuvo un valor similar al resultado de Noshad et al., (2015), quienes obtuvieron un 58% de eficiencia de encapsulación usando una mezcla de maltodextrina y aislado de proteína de soya por sonicación con ultrasonido. Sin embargo, este porcentaje podría ser mayor, tal como en el caso de Hundre et al., (2015) que lograron un 86% de eficiencia de encapsulación de vainillina

con WPI usando secado spray; mientras que Ferrario et al., (2020), obtuvieron un 95% de eficiencia de encapsulación usando una mezcla de carbohidratos (maltodextrina y HI-CAP). Dentro de las diferencias con este último estudio, se encuentra el método de emulsificación, el cual fue por sonicación seguido de secado spray, y la relación agente encapsulante:antimicrobiano, la cual fue 21:5, mientras que en este estudio se utilizó en proporción 2:1. Es posible que un aumento en la cantidad de WPC pueda aumentar el porcentaje de encapsulación de vainillina; sin embargo, hay que tener en cuenta que un exceso de proteína puede producir emulsiones poco estables.

#### **6.2.4 Tasa de liberación de los antimicrobianos naturales**

En cuanto a la tasa de liberación, la liberación de cinamaldehído de la emulsión con WPC es lenta durante los 3 primeros días, para luego pasar a una fase lineal de liberación, llegando a una liberación del 40% del activo a los 10 días (Figura 8A). El valor obtenido es similar a la tasa de liberación del estudio de Zhang et al., (2023), usando alginato como encapsulante. Sin embargo, los autores reportan que la liberación de cinamaldehído fue lineal, mientras que en este estudio observamos una curva bifásica, con una fase de lenta liberación, seguida de una segunda fase de liberación lineal. Mientras que, un comportamiento similar se observó en el estudio de Jo et al., (2015), en el cual no se observa la típica liberación rápida, sino una liberación lenta y estable, la cual aumenta a medida que pasa el tiempo. En ese estudio, se utilizó Tween® 20 como emulsificante. Las diferencias pueden deberse a que cinamaldehído debería tener más afinidad por el Tween® 20 que por el alginato, ya que este último es un polianión.



**Figura 8.** Curva de liberación de los antimicrobianos encapsulados. **A:** Cinamaldehído; **B:** Vainillina

Por el contrario, la vainillina comienza a liberarse inmediatamente de la emulsión con WPC. A los 3 días ya se ha liberado el 30% del total, llegando a una meseta del 33% de liberación a los 7 días (Figura 8B). Pocos estudios han analizado la liberación de vainillina encapsulada. Hasanvand y Rafe, (2019) encapsularon vainillina con  $\beta$ -ciclodextrina, y observaron solo un 15% de liberación a los 7 días de almacenamiento a 5°C, siguiendo la lógica de una rápida liberación, seguida de una meseta. Esta forma de liberación también se ha observado en la encapsulación de otros aceites esenciales, como la encapsulación del aceite esencial de timol con caseinato y gelatina (Alsakhawy et al., 2022), o la encapsulación del aceite de bayas de enebro con goma arábica y maldodextrina (Bajac et al., 2022).

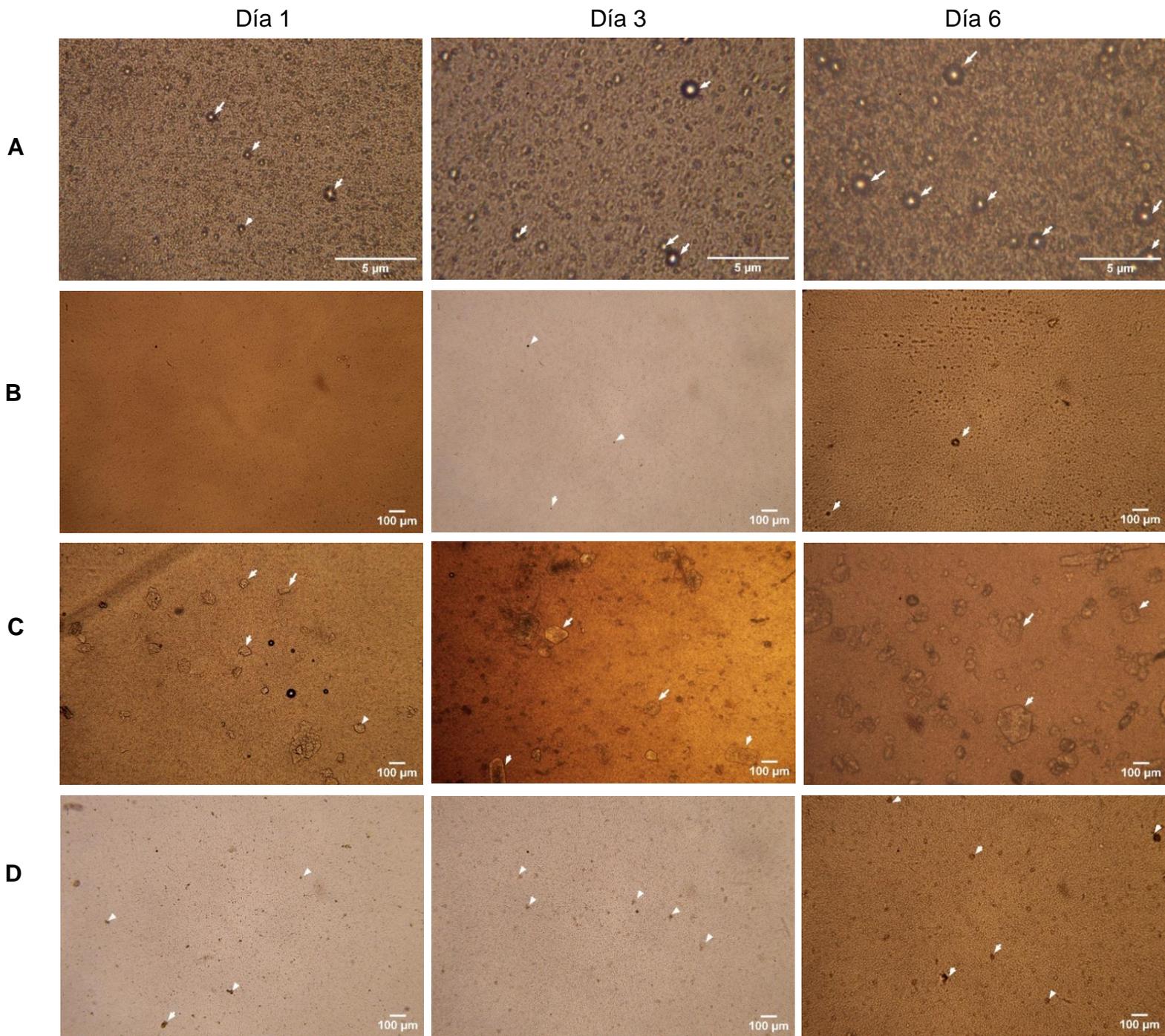
Las diferencias observadas entre las curvas de cinamaldehído y vainillina se deben a las interacciones formadas en los complejos proteína-antimicrobiano.

Cinamaldehído, presenta un grupo carbonilo, el cual puede formar un enlace covalente con grupos amino a través de la base de Schiff, como en los residuos de lisina y arginina, o la formación de ésteres con los grupos sulfhidrilos de cisteína. Zhao et al., (2022b) demostró que la cantidad de grupos aminos libres disminuye en la presencia del complejo WPC-cinamaldehído, indicando la presencia de la formación de la base de Schiff. Además, estos autores mencionaron que los ensayos de fluorescencia y dicroísmo circular indicaron que la conformación de WPC cambia en presencia de este compuesto, en la que incluye una mayor formación de hojas  $\beta$  y una disminución de las hélices  $\alpha$ , giro  $\beta$  y *random coil*. Asimismo, la orientación de los residuos de triptófano y tirosina se encuentran en un ambiente más hidrofóbico, lo que tiene sentido ya que cinamaldehído es un fenol de carácter hidrofóbico, por lo que estos residuos se orientan e interactúan con este compuesto. Si bien, en ese estudio no se evalúa la formación del enlace covalente entre el grupo carbonilo de cinamaldehído y los grupos sulfhidrilo de cisteína, otros estudios han demostrado la existencia de este tipo de enlace al estudiar los complejos formados por diferentes polifenoles con grupos carbonilos y WPC (Tian et al., 2023). En cambio, la vainillina es un compuesto más polar que presenta tres grupos funcionales, un grupo carbonilo, un grupo éter y un hidroxilo. Por su composición pareciera indicar que podría interactuar con múltiples grupos funcionales de diferentes residuos aminoacídicos. Boeve y Joye, (2020) estudiaron el complejo WPC-vainillina, demostrando que no había disminución de los grupos amino libre, indicando que no hay presencia de la formación de la base de Schiff. Además, los ensayos de FT-IR arrojaron que no había cambios aparentes en las estructuras secundarias de la proteína de WPC. Estos resultados en conjunto indican que probablemente las interacciones débiles predominan en la estabilización

del complejo WPC-vainillina, entre las que se pueden incluir las interacciones  $\pi$ - $\pi$ , las interacciones catión- $\pi$  y las interacciones sulfuro-aromáticas. Además, las interacciones entre WPC y vainillina son débiles (Houde et al., 2018). Los parámetros indican que tiene una baja constante de asociación y una alta constante de disociación, y por lo tanto, un bajo nivel de unión. Asimismo, estos autores reportan que los ensayos de fluorescencia indicaron que los triptófanos, los cuales deberían participar en la interacción con vainillina, se encuentran en un ambiente más hidrofílico, contrario a lo que sucede con cinamaldehído. En resumen, la bibliografía sugiere que el cinamaldehído establece enlaces covalentes con WPC, lo que explica la lenta liberación de este compuesto en la emulsificación; mientras que la vainillina interactúa débilmente con WPC, y por ende, se libera rápidamente.

### **6.2.5 Observación microscópica**

La Figura 9 muestra las microfotografías de las emulsiones E-CIN y E-VN y de la bebida proteica adicionada con las emulsiones a una concentración de 1,0 g/L almacenadas a 4°C durante 6 días. La emulsión de cinamaldehído (E-CIN 1:1) inicialmente presenta gotas circulares de pequeño tamaño. Asimismo, debido a que un 10% de cinamaldehído no ha sido emulsionado, se observan algunas pequeñas gotas de aceite (Figura 9A). Al avanzar los días, se puede apreciar que el activo se va liberando, observándose más gotas de aceite libre. Al día 6, se aprecian gotas de cinamaldehído libre en mayor proporción y de mayor tamaño que los días anteriores (Figura 9 A).



**Figura 9.** Imágenes microscópicas de las emulsiones de cinamaldehído y vainillina, y de las bebidas proteicas adicionadas con las emulsiones almacenadas a 4°C en oscuridad durante 6 días. **A:** E-CIN; **B:** E-CIN en bebida proteica; **C:** E-VN; **D:** E-VN en bebida proteica. Las flechas hacen referencia al antimicrobiano libre.

En la bebida proteica, si bien la emulsión E-CIN se encuentra en baja concentración (1,0 g/L), se puede apreciar que hay aparición visible de gotas oleosas de cinamaldehído en el día 3, lo cual es consistente con la mayor velocidad de liberación que ocurre a partir del tercer día de almacenamiento (Figura 8A). Además, al pasar los días se observa mayor presencia y mayor tamaño de gotas de cinamaldehído en la bebida (Figura 9B).

En el caso de la emulsión de vainillina (E-VN 2:1), se observan cristales de vainillina, los cuales no han sido encapsulados, ya que según el ensayo de liberación aproximadamente un 50% de este antimicrobiano se encuentra libre en la emulsión. La vainillina almacenada a 4°C disminuye su solubilidad y debido al bajo porcentaje de etanol y elevada concentración (cercana a la solución saturada) ésta cristaliza. Asimismo, a los 3 días de almacenamiento se observa la aparición de cristales en mayor proporción; mientras que, a los 6 días, se puede observar el crecimiento de los cristales. Este resultado es consistente con lo observado en la curva (Figura 8B), donde la liberación de vainillina es inmediata y creciente hasta el día 3, y luego la liberación de las emulsiones se torna más lenta entre el día 3 y 6 (Figura 9C). Por consiguiente, esto también se observa en la bebida, la cual al inicio ya presenta cristales de vainillina, pero de menor tamaño que en la emulsión, por encontrarse en menor concentración. Igualmente, los cristales van aumentando en proporción durante el almacenamiento (Figura 9 D).

Se comprobó la liberación de los activos a través de la microscopía óptica, en la que se observa la liberación de cinamaldehído en forma de microgotas de aceite. Por otro lado, la vainillina se encontraba tanto en suspensión, como en forma de cristal,

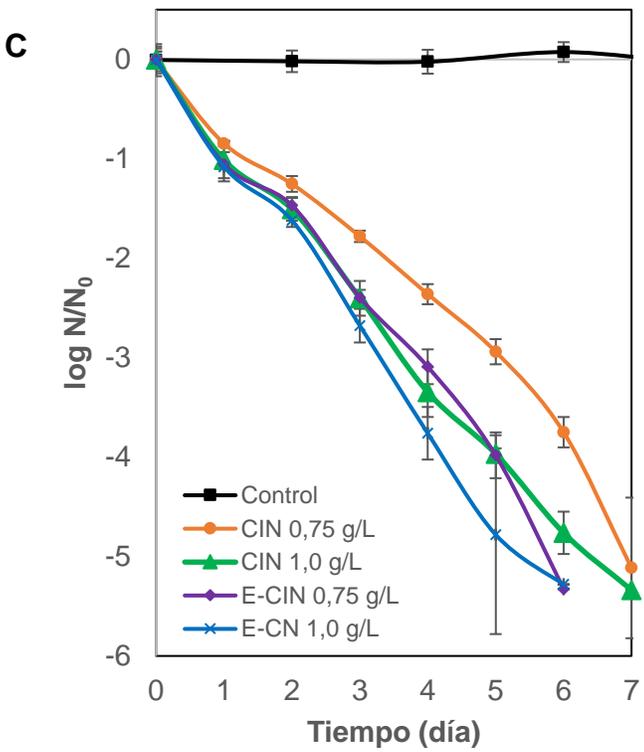
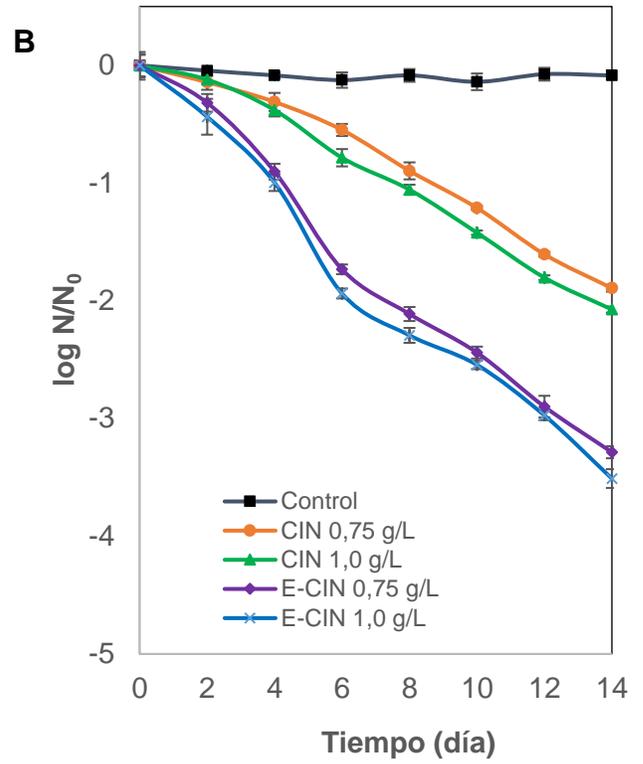
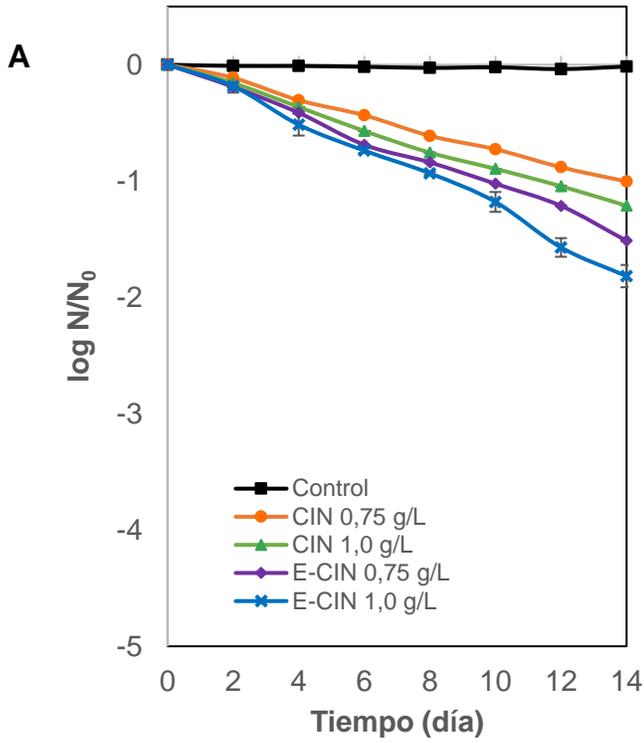
posiblemente debido a las bajas temperaturas de almacenamiento. Este fenómeno fue explicado por Liu et al., (2023), quienes argumentan que las partículas esféricas se rompen a bajas temperaturas y a baja concentración de sodio, resultando en la presencia de cristales de vainillina con aglomeración irregular.

### 6.3 Cinéticas de inactivación microbiana

Tanto los antimicrobianos cinamaldehído y vainillina, como las emulsiones de éstos incluidos en la formulación de bebidas proteicas provocaron distinto grado de inactivación de *E. coli*, *L. innocua* y *S. cerevisiae*. En el caso de cinamaldehído (Figura 10), se observó que *S. cerevisiae* fue el microorganismo más sensible, resultando en una inactivación mayor a 5 ciclos logarítmicos en todos los tratamientos, tanto con el antimicrobiano con o sin emulsionar, al cabo de 7 días de almacenamiento (Figura 10 C).

En el caso de *L. innocua*, cinamaldehído 0,75 g/L y 1,0 g/L produjo una reducción de 1,9 y 2,1 ciclos logarítmicos, respectivamente, en 14 días de almacenamiento. La emulsificación incrementó la efectividad del agente antimicrobiano. Las emulsiones E-CIN 0,75 g/L y E-CIN 1,0 g/L redujeron 3,2 y 3,5 ciclos log respectivamente (Figura 10 B).

En cambio, *E. coli* fue el microorganismo más resistente a cinamaldehído, ya que concentraciones de 0,75 g/L y 1,0 g/L redujeron 1,0 y 1,2 ciclos logarítmicos, respectivamente, a los 14 días de almacenamiento. Al igual que con *L. innocua*, la emulsificación incrementó la efectividad del tratamiento, permitiendo así que E-CIN



**Figura 10.** Evaluación de cinamaldehído y E-CIN en bebidas proteicas inoculadas con **A:** *E. coli.*; **B:** *L. innocua* y **C:** *S. cerevisiae*

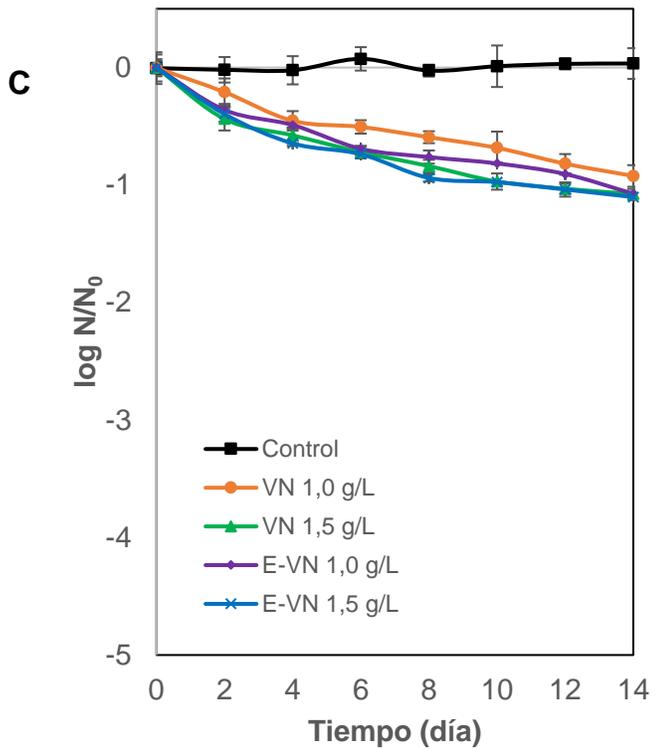
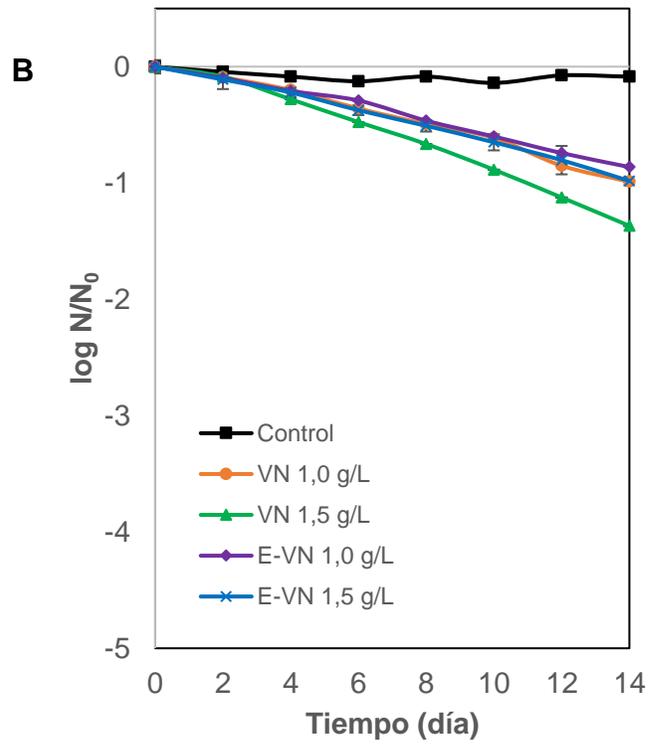
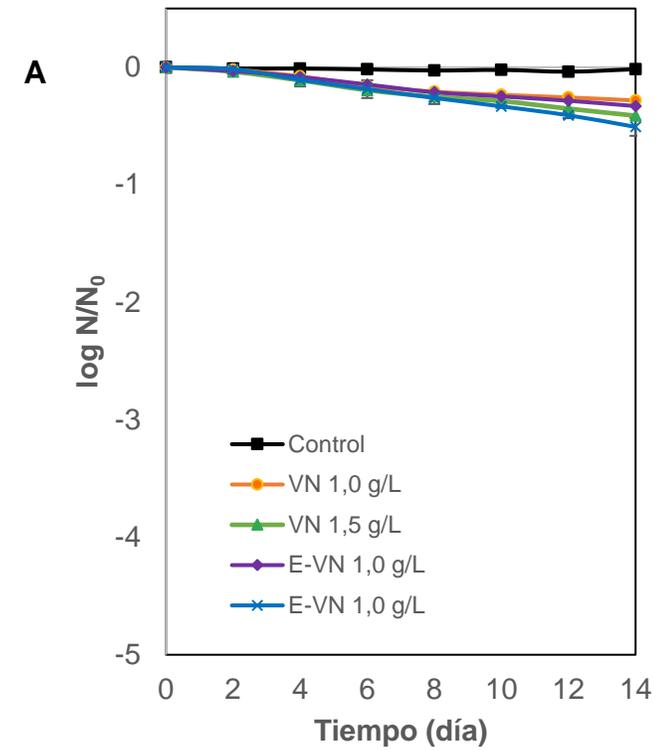
0,75 g/L y E-CIN 1,0 g/L redujeron 1,5 y 1,8 ciclos logarítmicos de *E. coli* respectivamente (Figura 10 A).

Por otro lado, *L. innocua* fue el microorganismo más sensible al tratamiento con vainillina (Figura 11 B). La concentración de 1,0 g/L y 1,5 g/L disminuyeron la población en 1,0 y 1,4 ciclos logarítmicos respectivamente. No se observó ningún aumento de la actividad antimicrobiana con las emulsiones del agente antimicrobiano. E-VN 1,0 g/L y E-VN 1,5 g/L, los cuales redujeron solamente 0,9 y 1,0 ciclos logarítmicos.

En cuanto a *S. cerevisiae*, la levadura tuvo una resistencia leve mayor. No hubo diferencias entre el tratamiento con vainillina y su emulsión correspondiente. Vainillina 1,0 g/L y 1,5 g/L redujeron 0,9 y 1,0 ciclos logarítmicos, mientras que las emulsiones E-VN 1,0 g/L y E-VN 1,5 g/L provocaron una reducción de 1,0 y 1,1 ciclos logarítmicos al cabo de 14 días de almacenamiento (Figura 11 C).

Al igual que con cinamaldehído, *E. coli* fue el microorganismo más resistente. La reducción en esta bacteria fue mínima, ya que vainillina 1,0 g/L y 1,5 g/L redujo 0,3 y 0,4 ciclos logarítmicos, mientras que las emulsiones E-VN 1,0 g/L y E-VN 1,5 g/L redujeron 0,3 y 0,5 ciclos logarítmicos (Figura 11 A).

Se observó que cinamaldehído fue capaz de reducir la población de *S. cerevisiae*, *L. innocua* y *E. coli*, siendo este último el organismo más resistente. Estudios previos ya habían determinado que *L. innocua* es más sensible que *E. coli* frente al cinamaldehído (Muthuswamy et al., 2008), lo cual fue corroborado en esta tesis. Se usaron concentraciones sobre la concentración mínima inhibitoria (MIC) descrita *in vitro* para este agente, que es de 0,31 g/L para *E. coli* y *S. aureus* (Ye et al., 2013). Esta decisión fue tomada ya que estudios han demostrado que la matriz



**Figura 11.** Evaluación de vainillina y E-VN en bebidas proteicas inoculadas con **A:** *E. coli.*; **B:** *L. innocua* y **C:** *S. cerevisiae*

alimentaria afecta la concentración mínima efectiva para la inhibición del crecimiento microbiano, siendo necesario aumentar de tres a cuatro veces el MIC para obtener el mismo efecto en matrices alimenticias (Shaaban, 2020). Se ha observado que al utilizar cinamaldehído para inhibir *S. aureus* en leche se necesitó aplicar al menos 4 veces el MIC (Babic et al., 2019). Además, otros estudios han confirmado, que el MIC para aceites esenciales puede aumentar más de 5 veces al pasar del medio de cultivo de laboratorio a una matriz como la leche, debido a la interacción que tienen estos compuestos con las proteínas de la leche (Nielsen et al., 2016).

Se observó una reducción de hasta 1,2 ciclos logarítmicos para *E. coli*, valores por debajo de lo analizado previamente por Baskaran et al., (2010) en jugos de manzana y sidra de manzana, en las que cinamaldehído ~0,8 g/L presentó una reducción de 5 ciclos logarítmicos a los 5 días de almacenamiento a 4° C. Dentro de las diferencias entre los alimentos evaluados, se encuentra el pH, el cual fue más ácido (pH 3,6 para la sidra y 3,8 para el jugo), la cepa utilizada que fue *E. coli* O157:H7, y la presencia de las proteínas del suero de leche. Estudios han demostrado que las proteínas de la leche interfieren en la actividad antimicrobiana. El estudio de Nielsen et al., (2016) utilizando isoeugenol demostró que la MIC en la leche es más de 20 veces mayor a la MIC en el jugo de zanahoria. Para *L. innocua* se logró una reducción de hasta 2,1 ciclos logarítmicos con cinamaldehído libre y de hasta 3,5 ciclos logarítmicos con cinamaldehído emulsificado. Los estudios de Guan et al., (2023) usaron 1,0 g/L de cinamaldehído en sistema modelo, y se observó una reducción de 3,9 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento a 4 °C. Por último, para cinamaldehído se vio una gran actividad antifúngica frente a *S. cerevisiae*,

con una disminución de 5 ciclos logarítmicos a los 7 días de almacenamiento a 4 °C. Esta alta efectividad también se había observado en medios de cultivo, al usar una concentración de 0,25 g/L se obtuvo una reducción de 6 ciclos logarítmicos a las 40 horas de almacenamiento a 35° C (Liu et al., 2021). Como ya se ha discutido, la matriz proteica del suero de leche aumenta la MIC.

En cambio, para vainillina se ha determinado que para *E. coli* y *L. monocytogenes* la MIC es de 1,0 g/L y 2,8 g/L respectivamente, en leche semidescremada (Cava-Roda et al., 2012b). En este mismo estudio, en leche semidescremada usando vainillina 3,0 g/L se observó una reducción en *L. monocytogenes* de ~1 ciclo logarítmico, mientras que al usar vainillina 1,5 g/L en *E. coli*, se observó una reducción de ~1,5 ciclos logarítmicos a los 14 días de almacenamiento a 7° C. En esta tesis se demostró un comportamiento similar al usar vainillina 1,5 g/L en las bebidas proteicas, con una reducción de hasta 0,5 y 1,4 ciclos logarítmicos para *E. coli* y *L. innocua*, respectivamente. Sin embargo, los autores demostraron que *L. monocytogenes* fue más resistente que *E. coli*, mientras que en este trabajo ocurrió lo contrario. Probablemente, haya diferencias entre las sensibilidades entre las cepas de *L. innocua* y *L. monocytogenes*, y también diferencias en el pH y temperatura usadas en los ensayos. Asimismo, la morfología de las bacterias Gram positiva como *L. innocua* presentan una pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram negativa como *E. coli* presentan una membrana externa con porinas que las hace más resistentes a los agentes antimicrobianos (Cava-Roda et al., 2012b). En el caso de *S. cerevisiae*, el tratamiento con vainillina o vainillina emulsificada redujo la población de levaduras en 1 ciclo

logarítmico. Este resultado es similar a lo observado en el estudio de Fitzgerald et al. (2004a), en donde se observa una reducción de 1 ciclo logarítmico, al usar vainillina 1,5 g/L a las dos semanas en el almacenamiento en jugo de manzana almacenado a 8° C.

Uno de los objetivos de esta investigación era evaluar el efecto de la emulsificación de los compuestos naturales cinamaldehído y vainillina sobre la actividad microbiológica de estos compuestos. Se demostró que emulsificar cinamaldehído pudo aumentar su capacidad como antimicrobiano tanto sobre *E. coli*, *L. innocua* y *S. cerevisiae*. Estudios previos han demostrado que la encapsulación de cinamaldehído con alginato aumenta la capacidad antifúngica en maní, siendo la principal razón la liberación sostenida del compuesto, la que permite proteger al antimicrobiano (Zhang et al., 2023). Este efecto también fue corroborado con los ensayos de liberación, en la que se observa una liberación sostenida en el tiempo. Sin embargo, también se han visto estudios en que la encapsulación de cinamaldehído no ha tenido efecto en la actividad antimicrobiana. Por ejemplo, al encapsular cinamaldehído con lecitina de soya o caseinato, Liao et al., (2021) no observaron un aumento aparente en la reducción de *E. coli* o *L. innocua*. Sin embargo, hay que considerar que los ensayos se realizaron en agar, en la incubación de un solo día, y que compararon 50  $\mu$ L de cinamaldehído puro con 50  $\mu$ L de la emulsión de cinamaldehído al 10%. Por ende, la cantidad añadida de cinamaldehído no era la misma. Asimismo, tampoco se explica el aumento en la actividad antimicrobiana debido a la mayor estabilidad del compuesto en el tiempo. Otros estudios en que emulsificaron cinamaldehído con triglicéridos de cadena media y Tween 80

demonstraron que la concentración mínima inhibitoria en *E. coli* tanto para cinamaldehído libre, como emulsificado, era la misma. Sin embargo, cuando se media el efecto en el tiempo se observaba mayor actividad antimicrobiana del compuesto emulsificado (Tian et al., 2016). Una de las hipótesis es que, debido a la emulsificación, la estabilidad oxidativa del agente antimicrobiano aumenta, lo cual ya se ha verificado en otros estudios con aceites esenciales (Hebishy et al., 2022). Es probable que esta sea otra de las razones por la que cinamaldehído emulsificado presenta mayor actividad antimicrobiana en el almacenamiento. Para vainillina no se encontraron estudios en donde comparan el antimicrobiano libre y el antimicrobiano emulsificado. Los resultados experimentales indican que la emulsificación de vainillina no tuvo ningún efecto en la actividad antimicrobiana de este compuesto. También se había observado en la emulsificación de aceite de mirto limón con Tween 80 (Buranasuksombat et al., 2011) y en la encapsulación de carvacrol con triglicéridos de cadena media y Tween 80 (Chang et al., 2013). Estudios futuros mejorando la emulsificación de vainillina, evitando su cristalización podrían resultar en el aumento de la capacidad antimicrobiana de este compuesto.

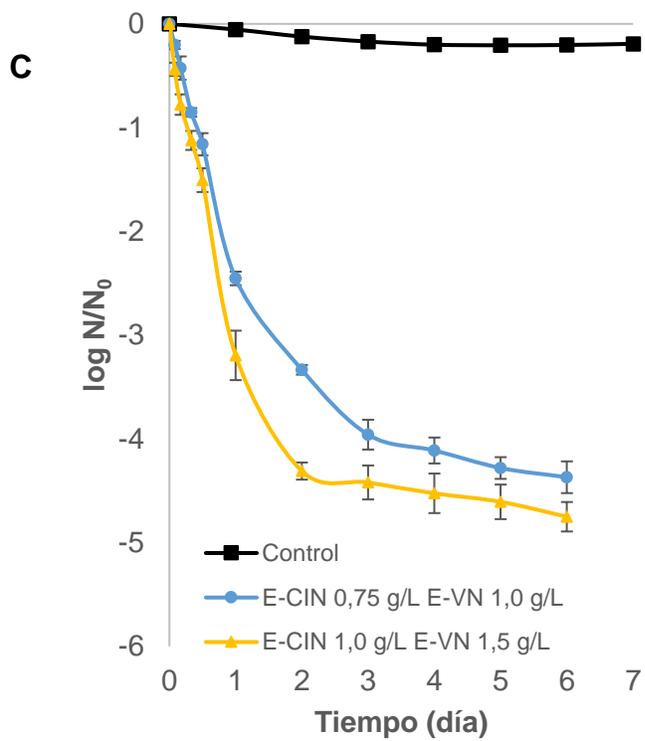
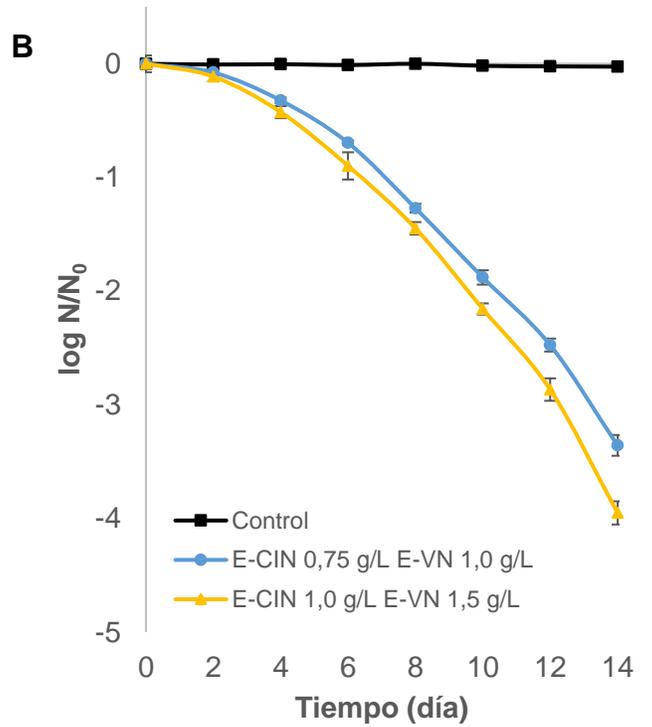
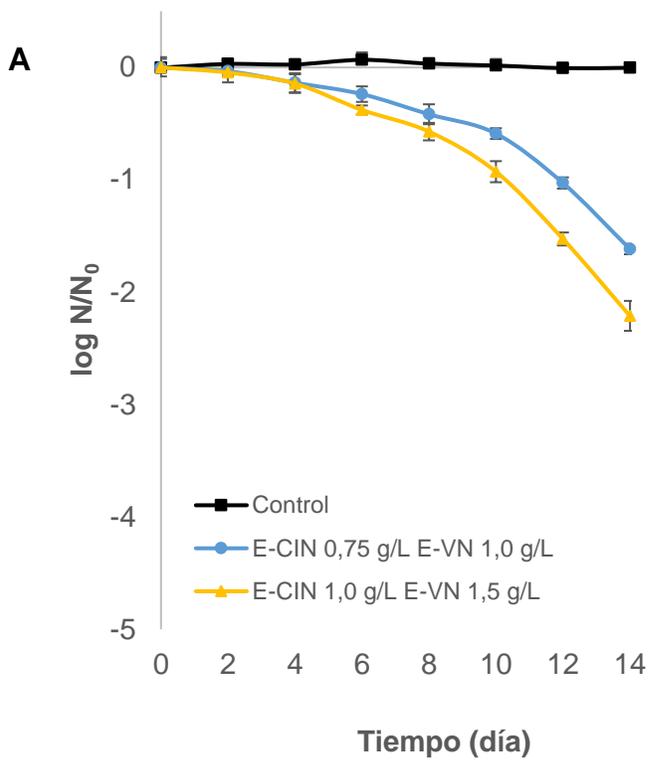
#### **6.4 Cinéticas de inactivación de las combinaciones de antimicrobianos emulsionados**

Además, se evaluaron los tratamientos combinados de E-CIN con E-VN. Para esto se usaron las dos concentraciones mínimas E-CIN 0,75 g/L con E-VN 1,0 g/L y las dos concentraciones máximas E-CIN 1,0 g/L con E-VN 1,5 g/L. Las concentraciones máximas se usaron para determinar la máxima capacidad

antimicrobiana al usar ambos compuestos como agentes antimicrobianos. En cambio, se usaron las concentraciones mínimas para poder así evaluar un posible efecto aditivo o sinérgico entre ambos agentes con la menor modificación de aroma y sabor de la bebida. En el caso de *E. coli*, éste fue el microorganismo más resistente al tratamiento combinado, ya que E-CIN 0,75 g/L + E-VN 1,0 g/L y E-CIN 1,0 g/L + E-VN 1,5 g/L redujeron 1,6 y 2,2 ciclos logarítmicos respectivamente, a los 14 días de almacenamiento (Figura 12A). El añadir la emulsión de vainillina a las emulsiones de cinamaldehído produjo un leve aumento de actividad antimicrobiana en la combinación de mayor concentración, aumentando la inactivación en 0,4 ciclos logarítmicos respecto que E-CIN, produciendo un efecto aditivo. En cambio, para la combinación de emulsiones de menor concentración, la adición de la emulsión de vainillina fue indiferente a los 14 días de almacenamiento.

Por otro lado, sobre *L. innocua* las emulsiones E-CIN 0,75 g/L + E-VN 1,0 g/L y E-CIN 1,0 g/L + E-VN 1,5 g/L produjeron una reducción de 3,4 y 4,0 ciclos logarítmicos, respectivamente, en 14 días de almacenamiento. Al compararlo con la efectividad de la emulsión de cinamaldehído, se observa que hubo un leve aumento de la actividad antimicrobiana, alcanzándose una reducción de 0,2 y 0,5 ciclos logarítmicos adicionales, al añadir E-VN 1,0 g/L y E-VN 1,5 g/L respectivamente, lo que da cuenta de que existe un leve aumento del efecto antimicrobiano, sin llegar a la sumatoria de las actividades de ambas emulsiones por separado (Figura 12B).

En cuanto a *S. cerevisiae*, ambos tratamientos combinados alcanzaron una inactivación de casi 5 ciclos logarítmicos a los 6 días de almacenamiento. Se observa



**Figura 12.** Evaluación de tratamientos combinados E-VN + E-CIN en bebidas proteicas inoculadas con **A:** *E. coli*.; **B:** *L. innocua* y **C:** *S. cerevisiae*

un sinergismo entre cinamaldehído y vainillina tanto en E-CIN 0,75 g/L + E-VN 1,0 g/L y E-CIN 1,0 g/L + E-VN 1,5 g/L, ya que a los dos días de almacenamiento ya producían una inactivación de 3,3 y 4,3 ciclos logarítmicos respectivamente, aumentando 1,6 y 2,2 ciclos log la inactivación respecto de la suma de los efectos de E-VN y E-CIN actuando por separado (Figura 12C) (Tabla 6).

Se pudo comprobar que el cinamaldehído es un agente antimicrobiano más efectivo que vainillina sobre los microorganismos evaluados. Las diferencias podrían derivar del mecanismo de acción de ambos compuestos y de los cambios introducidos por la emulsificación. Lamentablemente, hay pocos estudios del mecanismo de acción de vainillina, el cual genera la disrupción de la membrana plasmática, y como consecuencia, la disipación del gradiente de K<sup>+</sup>, la alteración de la homeostasis del pH interno y la inhibición de la respiración celular (Fitzgerald et al., 2004b). Mientras que, cinamaldehído también es un disruptor de membrana (Shen et al., 2015), pero se le han atribuido más mecanismos de acción. Entre ellos, se ha observado un aumento en la oxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana plasmática,

**Tabla 6**

**Resumen de los resultados de los tratamientos individuales y combinados en las bebidas proteicas**

Microorganismo	Tratamiento E-CIN	Reducción E-CIN	Tratamiento E-VN	Reducción E-VN	Tiempo (día)	Reducción Tratamiento combinado	Resultado
<i>E. coli</i>	E-CIN 0,75 g/L	1,5	E-VN 1,0 g/L	0,3	14	1,6	Sin efecto
	E-CIN 1,0 g/L	1,8	E-VN 1,5 g/L	0,5	14	2,2	Aditivo
<i>L. innocua</i>	E-CIN 0,75 g/L	3,2	E-VN 1,0 g/L	0,9	14	3,4	Sin efecto
	E-CIN 1,0 g/L	3,4	E-VN 1,5 g/L	1,0	14	4,0	Sin efecto
<i>S. cerevisiae</i>	E-CIN 0,75 g/L	1,4	E-VN 1,0 g/L	0,3	2	3,3	Sinérgico
	E-CIN 1,0 g/L	1,6	E-VN 1,5 g/L	0,5	2	4,3	Sinérgico

produciendo especies reactivas de oxígeno (He et al., 2019). Además, es capaz de unirse a la proteína FtsZ, inhibiendo la división celular bacteriana (Domadia et al., 2007), y es capaz de interferir en la biosíntesis de UPD-N-acetilglucosamina, compuesto precursor en la vía de síntesis de la pared celular (Sun et al., 2021). Este último mecanismo de acción podría ser la razón por la que *L. innocua* es más sensible que *E. coli*, ya que la bacteria Gram positiva es más dependiente de la integridad de su gruesa capa de peptidoglucano para protegerse. Por otro lado, estudios en *S. cerevisiae* indican que bajo el estrés de vainillina se fosforila la proteína Yrrp1, la que se transloca al núcleo y es un factor de transcripción para los genes SNQ2 y YOR1, que están encargados de la resistencia a vainillina (Zhao et al., 2023), razón por la que la levadura es más resistente a vainillina que a cinamaldehído. Sin embargo, se ha demostrado que hay efectos antifúngicos con este agente. Se ha demostrado que tiene un efecto a nivel de disrupción de membrana plasmática, pero no en la pared celular (Li y Zhu, 2021). Además, o-vainillina que es un isómero de vainillina, ha demostrado producir disrupción en la membrana plasmática, produciendo especies reactivas de oxígeno, disminuyendo el contenido total de lípidos, ergosterol y trehalosa en la membrana plasmática e inhibiendo la síntesis de ergosterol (Li et al., 2022). Mientras que, cinamaldehído no afecta a los niveles de ergosterol y del total de lípidos en la membrana plasmática, sino más bien afecta a la estabilidad de la pared celular inhibiendo las quitina-sintasas (OuYang et al., 2019). Si bien es extraño el resultado que cinamaldehído no afecte los niveles de ergosterol ya que es un inhibidor de la esterol C-24 reductasa (Wei et al., 2020), queda claro que al combinar cinamaldehído con vainillina, la levadura tiene una desestabilización tanto a nivel de pared celular y

de membrana plasmática, explicando así el sinergismo observado en las curvas de inactivación con ambas concentraciones evaluadas.

Dentro de los métodos para la conservación de alimentos, se encuentra la tecnología de barreras (Hurdle technology), en la que se utilizan dos o más estrategias de reducción de microorganismos, para llegar a una reducción de 5 ciclos logarítmicos, como lo exige la FDA (FDA, 2001). En el caso de cinamaldehído, este se ha usado con diferentes estrategias como son la combinación con el tratamiento con luz UV-C (Beristaín-Bauza et al., 2018), procesamiento a altas presiones (Zhou et al., 2020), irradiación (Lacroix et al., 2004), campos eléctricos pulsados (Pina-Pérez et al., 2012), tratamientos térmicos suaves (Ding et al., 2023), combinación con ácidos orgánicos (Yossa et al., 2012), combinación con ácidos grasos de cadena media (Kim y Rhee, 2016) y mezcla de antimicrobianos. En este último aspecto, se ha determinado que el cinamaldehído tiene efectos aditivos tanto con timol, eugenol (Yuan et al., 2019) y carvacrol frente a *E. coli* en estudios *in vitro* (Ye et al., 2013). Mientras que, para vainillina se han descrito estudios combinando este agente antimicrobiano con ultrasonido (Tomadoni et al., 2016), tratamientos térmicos suaves (Char et al., 2009; Orizano et al., 2022), combinación con ácidos grasos de cadena media (Kim y Rhee, 2016), tratamiento con luz UV-C (Ferrario et al., 2020), en combinación con ácidos orgánicos (Choi et al., 2013) y mezcla de antimicrobianos. Estudios *in vitro* han demostrado un efecto aditivo con timol, eugenol y carvacrol (Yuan et al., 2019). En cuanto a la combinación de antimicrobianos usada en esta investigación, no se han encontrado estudios en donde midan la actividad combinada de cinamaldehído y vainillina. Lo más cercano, es un estudio donde utilizan vainillina en combinación con

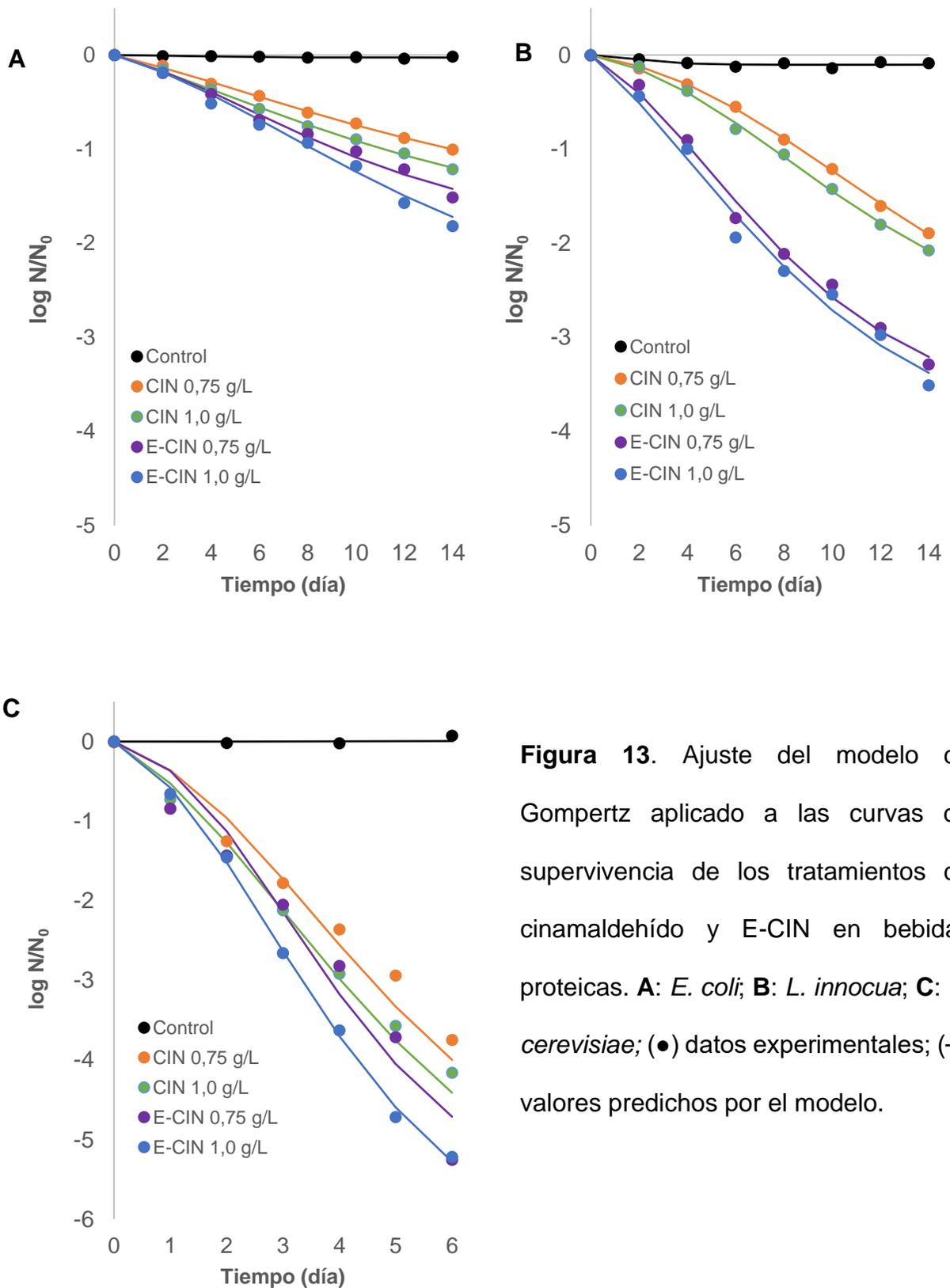
extractos de corteza de canela y hojas de canela (Cava-Roda et al., 2021). En el caso de la reducción de *L. monocytogenes*, se observa un efecto aditivo entre los extractos oleicos y vainillina, mientras que para *E. coli*, los autores describen sinergismo entre los componentes. Sin embargo, los isobogramas indican que la curva está apenas desplazada hacia el sinergismo, siendo probablemente más un efecto aditivo que un efecto sinérgico. Estos resultados son similares a los realizados en esta investigación, donde se observaron efectos aditivos tanto en *E. coli* y *L. innocua*, además de encontrar un efecto sinérgico para *S. cerevisiae*.

## **6.5 Modelamiento matemático de las curvas de supervivencia**

### **6.5.1 Aplicación del modelo de Gompertz**

Se aplicó el modelo de Gompertz a los datos de la curva de supervivencia, cuya ecuación explicó sobre el 93% de la variación observada de los datos experimentales, ya que los coeficientes de determinación ajustados ( $R^2_{adj.}$ ) variaron entre 93,4 – 99,9% (Tablas 7, 8 y 9).

La versión modificada de la ecuación general de Gompertz para curvas de supervivencia entrega tres parámetros,  $C$  que es el cambio global en el número de supervivientes, que está asociado con el número de ciclos logarítmicos que se reduce la población inicial después del tratamiento,  $A$  es el hombro inicial, y  $B$  la máxima tasa de muerte, relacionado con la pendiente de la curva de supervivencia. Como se observa en la figura 13, las curvas predichas se correlacionaron adecuadamente con los datos experimentales. Los tratamientos con cinamaldehído y E-CIN donde se logra mayor inactivación (*L. innocua* y *S. cerevisiae*) presentan curvas más sigmoideas.



**Figura 13.** Ajuste del modelo de Gompertz aplicado a las curvas de supervivencia de los tratamientos de cinamaldehído y E-CIN en bebidas proteicas. **A:** *E. coli*; **B:** *L. innocua*; **C:** *S. cerevisiae*; (●) datos experimentales; (—) valores predichos por el modelo.

**Tabla 7**

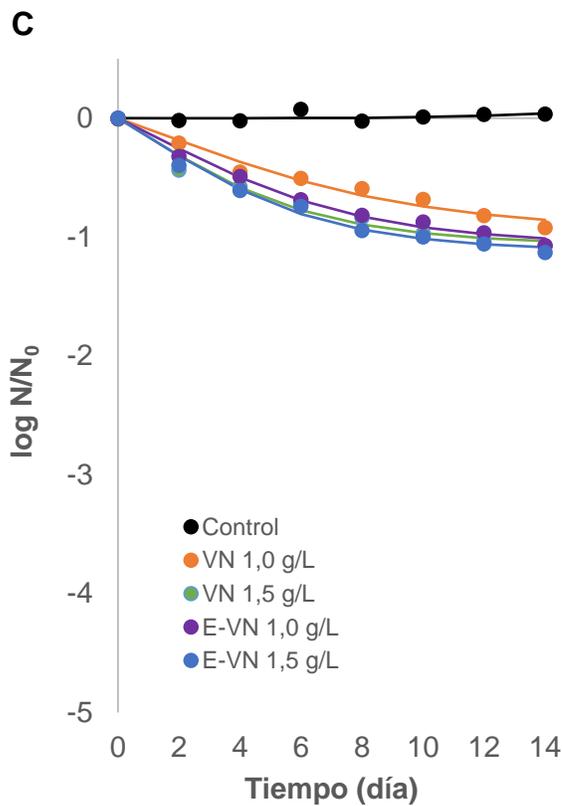
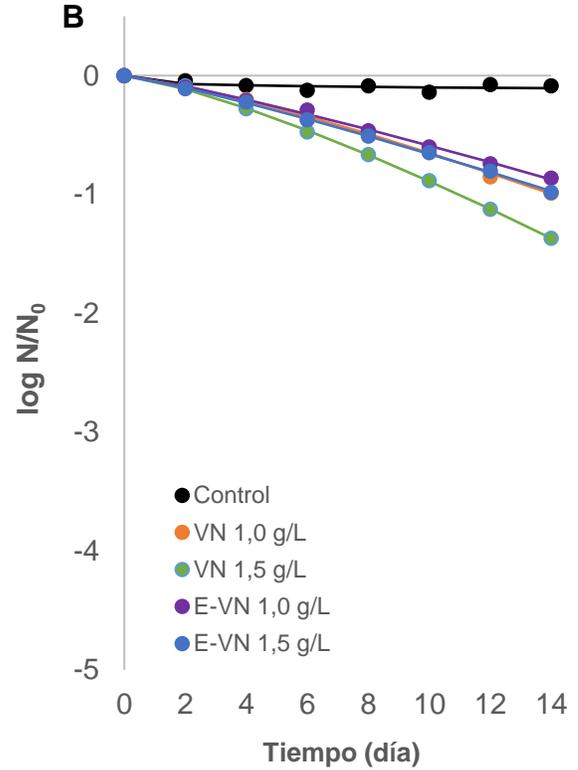
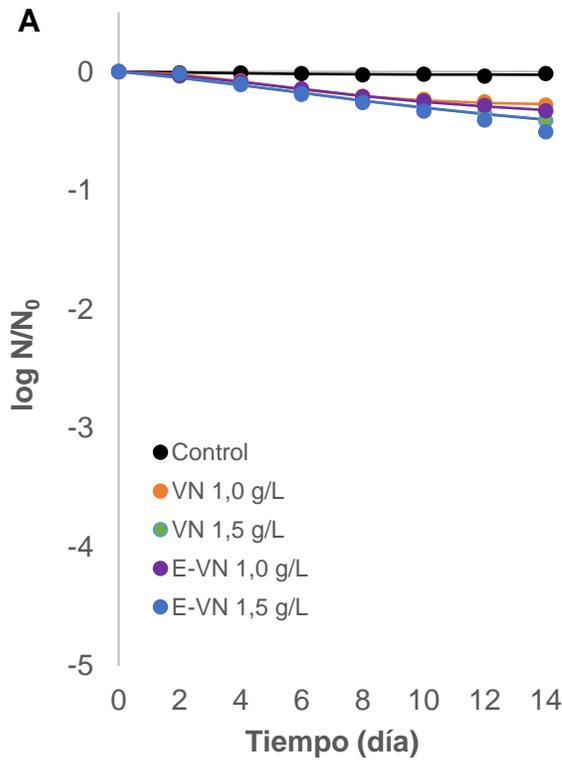
**Parámetros estimados de Gompertz en los tratamientos con cinamaldehído**

Microorganismo	Tratamiento	C	A	B	VE% (R <sup>2</sup> <sub>adj.</sub> )	Fisher
<i>E. coli</i>	CIN 0,75 g/L	-1,97	0,60	-0,11	99,8	2027**
	CIN 1,0 g/L	-2,30	0,49	-0,11	99,8	2744**
	E-CIN 0,75 g/L	-2,09	0,89	-0,16	98,5	300**
	E-CIN 1,0 g/L	-2,96	0,93	-0,13	98,4	272**
<i>L. innocua</i>	CIN 0,75 g/L	-3,71	1,31	-0,13	99,9	3458**
	CIN 1,0 g/L	-3,22	1,25	-0,16	99,8	1595**
	E-CIN 0,75 g/L	-4,13	0,97	-0,20	99,1	490**
	E-CIN 1,0 g/L	-4,84	0,70	-0,17	98,3	283**
<i>S. cerevisiae</i>	CIN 0,75 g/L	-6,28	1,24	-0,36	93,4	65*
	CIN 1,0 g/L	-6,86	1,03	-0,35	98,1	238**
	E-CIN 0,75 g/L	-6,16	1,42	-0,47	93,3	64*
	E-CIN 1,0 g/L	-7,05	1,19	-0,44	99,8	2074**

\*Estadísticamente significativo al 0,05%; \*\*Estadísticamente significativo al 0,01%

En cuanto a los parámetros del modelo (Tabla 7), en general a mayor concentración del antimicrobiano y por lo tanto mayor efectividad antimicrobiana, disminuyó el valor del hombro (A), aumentó la tasa de muerte (B) y la inactivación global (C) (en valores absolutos). En el caso de *L. innocua*, la emulsificación del cinamaldehído disminuyó el valor del hombro (A), y aumentó los valores de B y C lo que indica el aumento de la efectividad del agente antimicrobiano al ser emulsificado. Mientras que en el caso de *E. coli* y *S. cerevisiae* se observó un aumento de la velocidad de muerte y de la inactivación global al usar la emulsión E-CIN, pero no se observó una tendencia definida del parámetro A.

En el caso de vainillina (Figura 14), se observa que las curvas de supervivencia presentan diferente forma según el tipo de microorganismo: son de carácter lineal con escasa inactivación en el caso de *E. coli*, con hombro en el caso de *L. innocua*, y sin hombro y mayor pendiente en el caso de *S. cerevisiae*, indicando mayor sensibilidad



**Figura 14.** Ajuste del modelo de Gompertz aplicado a las curvas de supervivencia de los tratamientos de vainillina y E-VN en bebidas proteicas. **A:** *E. coli*; **B:** *L. innocua*; **C:** *S. cerevisiae*; (●) datos experimentales; (—) valores predichos por el modelo.

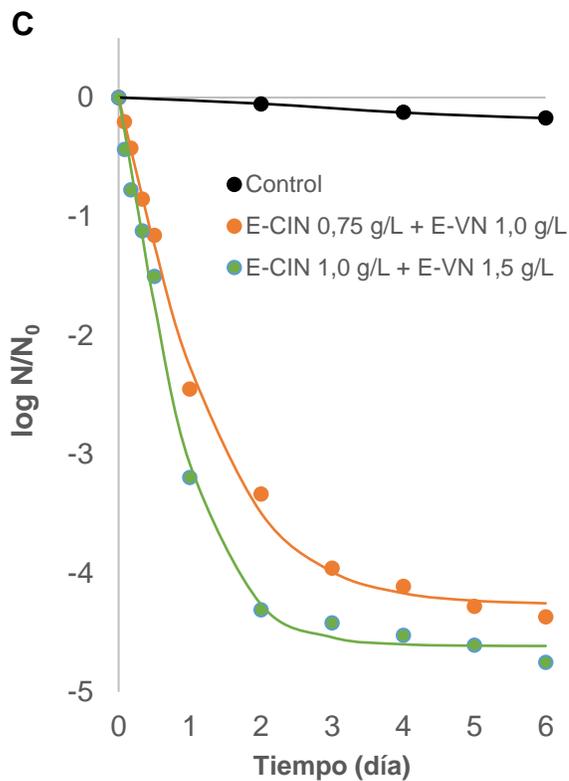
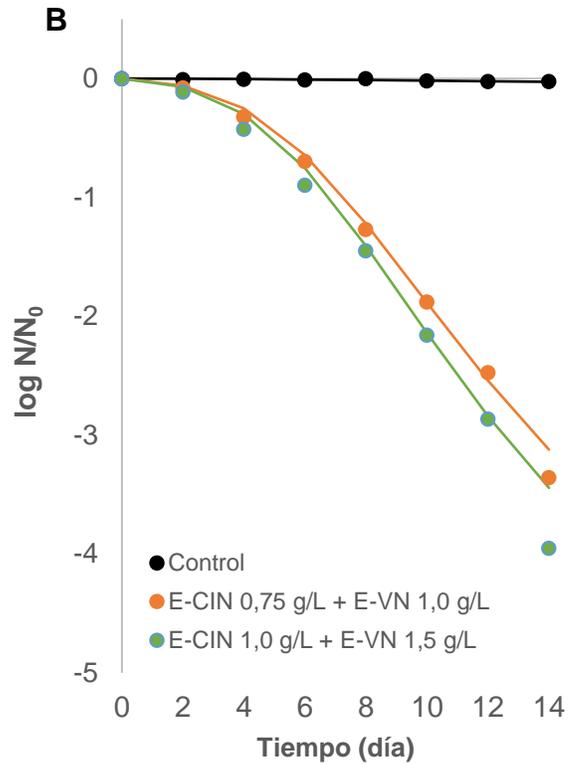
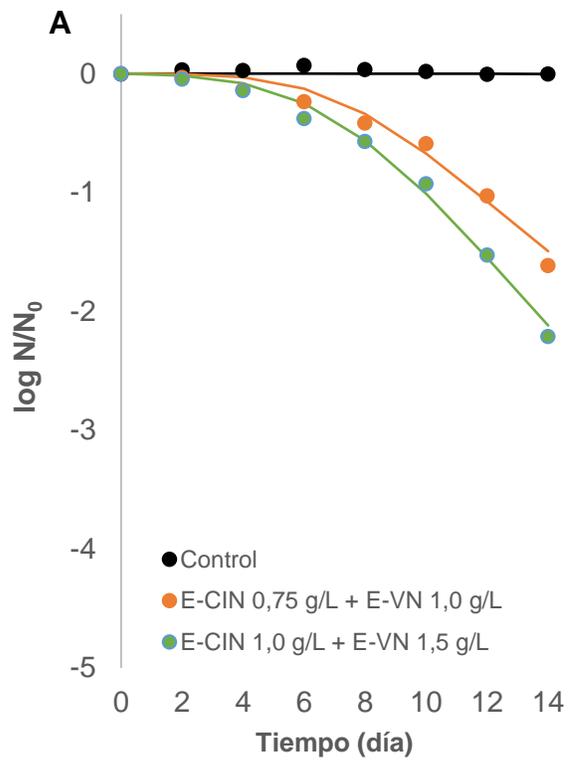
**Tabla 8**

**Parámetros estimados de Gompertz en los tratamientos con vainillina**

Microorganismo	Tratamiento	C	A	B	VE% (R <sup>2</sup> <sub>adj.</sub> )	Fisher
<i>E. coli</i>	VN 1,0 g/L	-0,29	1,59	-0,34	99,5	996**
	VN 1,5 g/L	-0,69	0,72	-0,13	99,2	553**
	E-VN 1,0 g/L	-0,41	1,12	-0,20	99,7	1296**
	E-VN 1,5 g/L	-0,95	1,10	-0,12	99,3	560**
<i>L. innocua</i>	VN 1,0 g/L	-1,26	1,43	-0,20	98,3	229**
	VN 1,5 g/L	-1,69	1,49	-0,21	98,8	330**
	E-VN 1,0 g/L	-1,33	1,12	-0,15	99,5	842**
	E-VN 1,5 g/L	-1,48	1,06	-0,14	99,1	457**
<i>S. cerevisiae</i>	VN 1,0 g/L	-1,25	0,37	-0,21	95,7	143*
	VN 1,5 g/L	-1,48	0,24	-0,29	96,4	207*
	E-VN 1,0 g/L	-1,39	0,38	-0,26	98,4	417**
	E-VN 1,5 g/L	-1,45	0,39	-0,30	98,2	409**

\*Estadísticamente significativo al 0,05%; \*Estadísticamente significativo al 0,01%

en este último caso. En cuanto al efecto de los tratamientos, en *L. innocua* se observa una disminución de A (hombro) y por lo tanto mayor sensibilidad al usar vainillina emulsionada, al igual que en el tratamiento con cinamaldehído. Sin embargo, usando 1,5 g/L de vainillina libre sin emulsionar, existe un aumento de los parámetros B (pendiente) y C (cambio global en el número de microorganismos) lo que conlleva a una mayor velocidad de inactivación del microorganismo (Tabla 8). En tanto que en *S. cerevisiae*, presentó los menores valores de hombro (A) y la mayor velocidad de muerte (parámetro B), al usar 1,5 g/L de vainillina emulsionada. Sin embargo, los parámetros muestran escasa variación entre los valores con vainillina libre y emulsionada, indicando que la emulsificación no mejoró sustancialmente la actividad antimicrobiana de la vainillina, alcanzando una inactivación menor a 2 ciclos logarítmicos en todos los microorganismos evaluados.



**Figura 15.** Ajuste del modelo de Gompertz aplicado a las curvas de supervivencia de los tratamientos combinados en bebidas proteicas. **A:** *E. coli*; **B:** *L. innocua*; **C:** *S. cerevisiae*; (●) datos experimentales; (—) valores predichos por el modelo.

**Tabla 9**

**Parámetros estimados de Gompertz de los tratamientos combinados**

Microorganismo	Tratamiento	C	A	B	VE% (R <sup>2</sup> <sub>adj.</sub> )	Fisher
<i>E. coli</i>	E-CIN 0,75 g/L + E-VN 1,0 g/L	-3,11	2,27	-0,18	96,5	77*
	E-CIN 1,0 g/L + E-VN 1,5 g/L	-4,92	2,03	-0,16	98,8	230**
<i>L. innocua</i>	E-CIN 0,75 g/L + E-VN 1,0 g/L	-4,90	1,83	-0,19	99,0	324**
	E-CIN 1,0 g/L + E-VN 1,5 g/L	-5,16	1,82	-0,19	97,0	104*
<i>S. cerevisiae</i>	E-CIN 0,75 g/L + E-VN 1,0 g/L	-6,43	0,09	-1,07	99,7	1020**
	E-CIN 1,0 g/L + E-VN 1,5 g/L	-6,08	0,35	-1,59	99,4	688**

\*Estadísticamente significativo al 0,05%; \*\*Estadísticamente significativo al 0,01%

Por otro lado, en los tratamientos combinados de E-VN + E-CIN se observan curvas que se desvían de la linealidad para los tres microorganismos (Figura 15). En el caso de *E. coli*, cuyo efecto fue descrito como aditivo, se observa un aumento (en valor absoluto) de los 3 parámetros: C, A y B, respecto del tratamiento individual con E-CIN, relacionados con una mayor inactivación de los microorganismos (C) y a una mayor velocidad (B). Sin embargo, se presenta un aumento del parámetro A, indicando un aumento en el tiempo de fase lag, lo que se puede deber a la lenta liberación del cinamaldehído emulsionado durante los primeros 2 días de almacenamiento (Tabla 9). Es decir, que la inactivación es más lenta al principio, pero alcanza una mayor inactivación global.

En el caso de *S. cerevisiae*, cuyo efecto fue sinérgico, hubo una gran disminución del parámetro de hombro A, junto a un aumento de la velocidad de inactivación B, sin grandes cambios en el parámetro C. Esto conlleva a una misma reducción del número de microorganismos en menor tiempo, demostrando el efecto sinérgico de la combinación de los antimicrobianos emulsionados.

En cuanto a *L. innocua*, no se observan cambios en la velocidad de muerte (parámetro *B*), pero si se demuestra un aumento de *C* y un aumento en *A*, lo que explica que a los 14 días no haya marcadas diferencias respecto de E-CIN. Hay una mayor disminución de microorganismos, pero la reducción empieza a ser efectiva algunos días más tarde. El modelo matemático de Gompertz modificado explicó muy bien la mayoría de las curvas de inactivación microbiana, tanto las lineales de los tratamientos con vainillina, como las curvas con hombro y las curvas con cola observadas en los tratamientos combinados. Sin embargo, las curvas más irregulares tuvieron un menor valor de  $R^2_{adj}$  (Figura 10, CIN 0,75 g/L y E-CIN 0,75 g/L), disminuyendo la precisión del modelo.

Se han reportado diferentes estudios donde se aplicó el modelo modificado de Gompertz. Uno de ellos fue el tratamiento combinado de quitosano y ultrasonido contra *S. cerevisiae* (Guerrero et al., 2005), en donde se observan curvas lineales y sigmoideas, en las cuales el modelo explicó por sobre un 98% de los datos experimentales. Asimismo, se observó que el tratamiento combinado presentaba una disminución del parámetro *A*, junto a un aumento de los parámetros *C* y *B*, y, por lo tanto, que la combinación de tratamientos era más efectiva que la incubación con quitosano, siendo un resultado similar al obtenido en este trabajo con los tratamientos combinados contra *S. cerevisiae*. Otro ejemplo de aplicación del modelo combina la luz UV-C con tratamientos térmicos suaves contra *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* en jugos de zanahoria (García, 2020). En general, el aumento de la temperatura en el tratamiento combinado ejerció mayor efecto inhibitor, lo que llevó a un aumento en los parámetros *B* y *C*, mientras que no se observó ningún patrón en el parámetro *A*,

explicando así la eficacia del tratamiento combinado. Este resultado es similar al efecto de la emulsificación de cinamaldehído, la que presentó cambios en los mismos parámetros, explicando así el aumento de la actividad antimicrobiana.

### **6.5.2 Aplicación del modelo de Weibull**

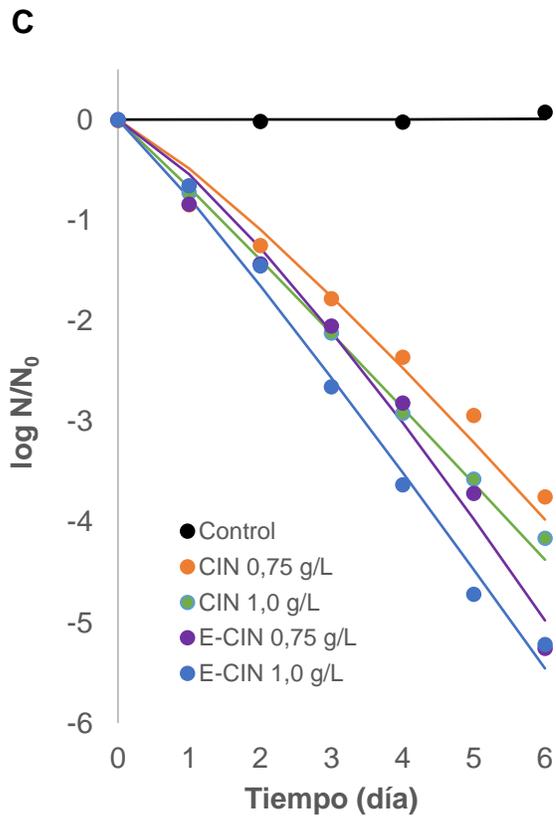
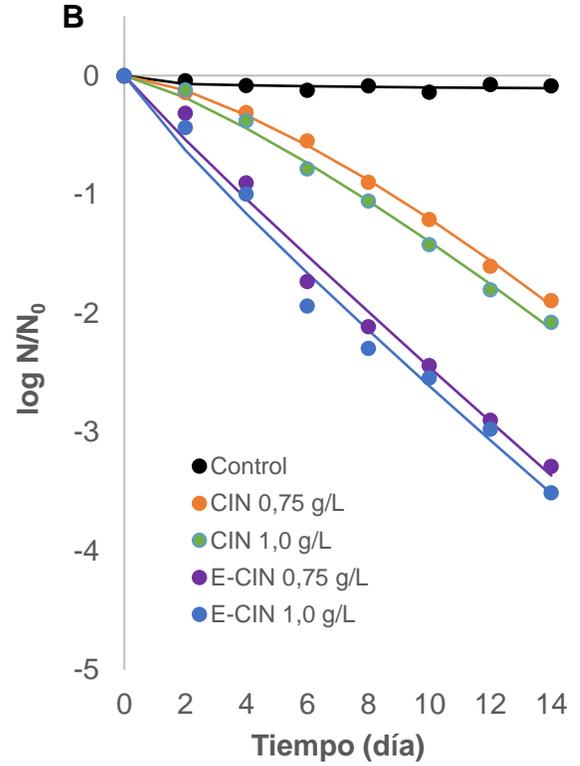
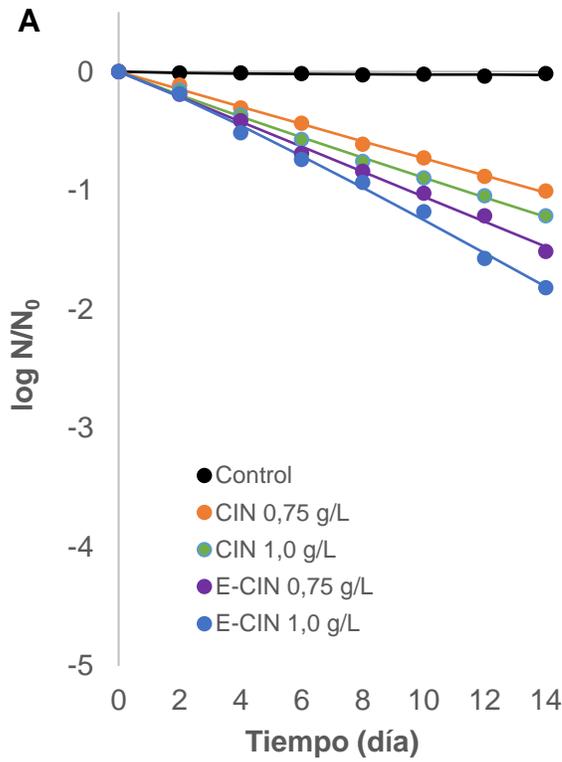
Al aplicar modelo de Weibull a los datos experimentales se observa que la ecuación explica sobre el 90% de los datos experimentales, ya que la variación explicada por el modelo mediante el coeficiente de determinación ( $R^2_{adj.}$ ) presenta valores entre 91,9 – 99,9%, indicando un buen ajuste del modelo (Tabla 10, 11 y 12). Las curvas de supervivencia de los tratamientos combinados E-CIN + E-VN contra *S. cerevisiae* (Figura 19C) fueron las que mostraron menor ajuste del modelo a los datos experimentales. Esto debido a que presentan una curva bifásica con una caída muy rápida de la población y luego una pequeña subpoblación más resistente que permaneció viable durante el tiempo de almacenamiento (Tabla 12, Figura 20 C).

El modelo de Weibull describe los datos con dos parámetros,  $b$  que es el parámetro de escala, que da cuenta de la magnitud o grado de la inactivación microbiana, y  $n$  que es el parámetro de forma o tendencia de la curva de supervivencia (Peleg y Cole, 1998). La importancia de la aplicación de este modelo radica en el estudio de las frecuencias de resistencias del microorganismo, que se producen debido a que la totalidad de la población microbiana no tiene exactamente el mismo nivel de resistencia al tratamiento aplicado. Por lo tanto, cada individuo no se inactiva al mismo tiempo durante el proceso, generando toda una distribución de resistencias (Peleg y Cole, 1998). Las curvas de distribución de frecuencias de resistencias se

graficaron a partir de los parámetros del modelo ( $b$  y  $n$ ) y se calcularon los estadísticos asociados (moda, media, varianza y coeficiente de sesgo).

En los tratamientos con cinamaldehído (Figura 16), se observa que el parámetro  $b$  aumentó con la emulsificación del cinamaldehído, indicando mayor grado de inactivación a mayor concentración de E-CIN, especialmente frente a *L. innocua* y *S. cerevisiae* (Tabla 10). El mayor efecto del cinamaldehído emulsificado se observó sobre *L. innocua*, en el que  $b$  aumentó más de 4 veces, desde 0,05 - 0,08 a 0,28 - 0,34, respectivamente. Además, se observó un cambio en la concavidad de las curvas, las cuales pasaron de tener concavidad hacia abajo ( $n > 1$ ) a curvas con concavidad hacia arriba ( $n < 1$ ), lo cual es consistente con la mayor efectividad de los tratamientos con E-CIN. Este comportamiento se verifica al observar las curvas de frecuencia de resistencias (Figura 17), donde se observa claramente el cambio en la respuesta de población de *L. innocua* frente a la emulsión, pasando desde una amplia distribución de tiempos de muerte con CIN, a distribuciones más angostas, con menor moda, media y varianza cuando se utilizó E-CIN, indicando un mayor efecto letal con una rápida inactivación de la mayor parte de la población microbiana.

En el caso de *S. cerevisiae*, si bien aumentó el grado de inactivación  $b$ , y disminuyó el valor de  $n$  con la emulsión, la magnitud del efecto fue menor que en *L. innocua*. Sin embargo, las curvas de frecuencia de resistencias demuestran que tuvo una mayor influencia la dosis de cinamaldehído utilizada, ya que la concentración de



**Figura 16.** Ajuste del modelo de Weibull aplicado a las curvas de supervivencia de los tratamientos de cinamaldehído y E-CIN en bebidas proteicas. **A:** *E. coli*; **B:** *L. innocua*; **C:** *S. cerevisiae*; (●) datos experimentales; (—) valores predichos por el modelo.

Tabla 10

Parámetros estimados de Weibull en los tratamientos con cinamaldehído

Microorganismo	Tratamiento	$b$ ( $d^{-n}$ )	$n$	VE% ( $R^2_{adj}$ )	Fisher	Moda (día)	Media (día)	Varianza ( $día^2$ )	Coef. sesgo (-)
<i>E. coli</i>	CIN 0,75 g/L	0,08	0,99	99,7	1275*	0,16	13,81	195,5	2,1
	CIN 1,0 g/L	0,10	0,94	99,7	1283*	0,62	11,64	154,2	2,3
	E-CIN 0,75 g/L	0,11	1,00	99,5	722*	0,00	9,51	90,3	2,1
	E-CIN 1,0 g/L	0,10	1,10	98,6	640*	0,95	7,88	51,2	1,9
<i>L. innocua</i>	CIN 0,75 g/L	0,05	1,41	99,8	1352*	3,62	7,98	33,1	1,6
	CIN 1,0 g/L	0,08	1,26	99,5	698*	2,16	7,13	32,7	1,7
	E-CIN 0,75 g/L	0,28	0,94	98,4	247*	0,20	3,96	17,8	2,3
	E-CIN 1,0 g/L	0,34	0,88	98,1	214*	0,34	3,59	16,5	2,4
<i>S. cerevisiae</i>	CIN 0,75 g/L	0,48	1,17	97,5	144*	0,37	1,75	2,2	1,8
	CIN 1,0 g/L	0,68	1,04	99,6	872*	0,07	1,43	1,9	2,0
	E-CIN 0,75 g/L	0,54	1,24	98,1	187*	0,43	1,53	1,5	1,8
	E-CIN 1,0 g/L	0,78	1,09	99,1	377*	0,12	1,22	1,3	2,0

\*Estadísticamente significativo al 0,01%

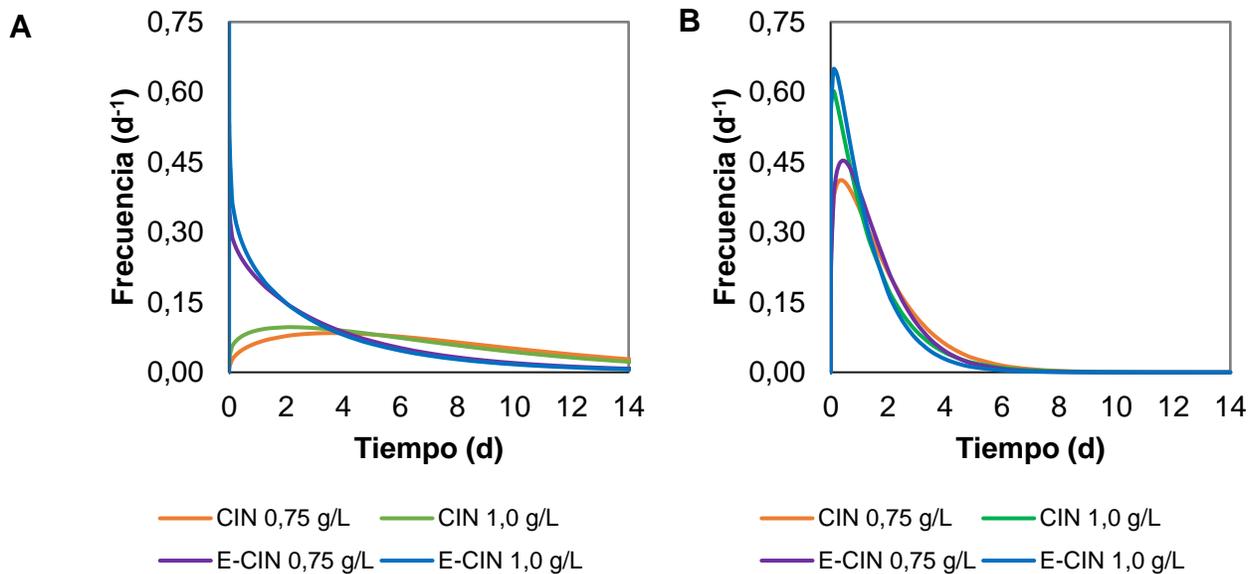


Figura 17. Distribución de resistencias de Weibull para los tratamientos con cinamaldehído y E-CIN en **A**: *L. innocua*; **B**: *S. cerevisiae*

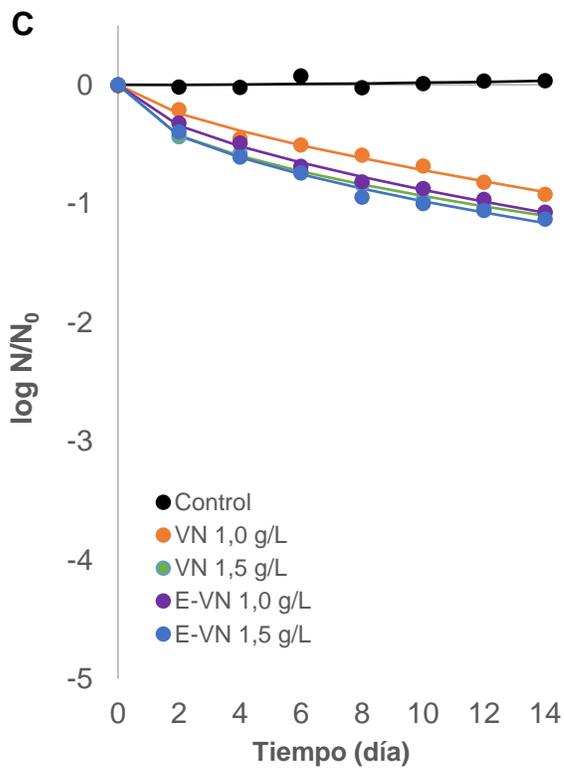
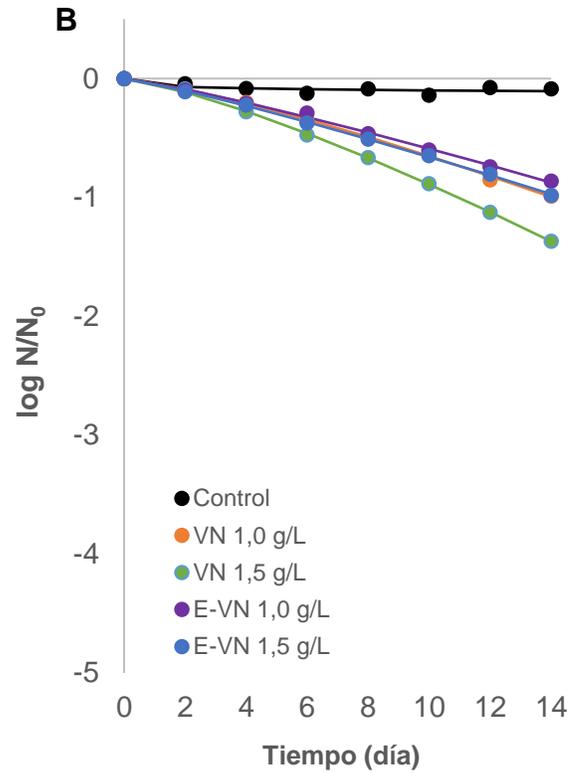
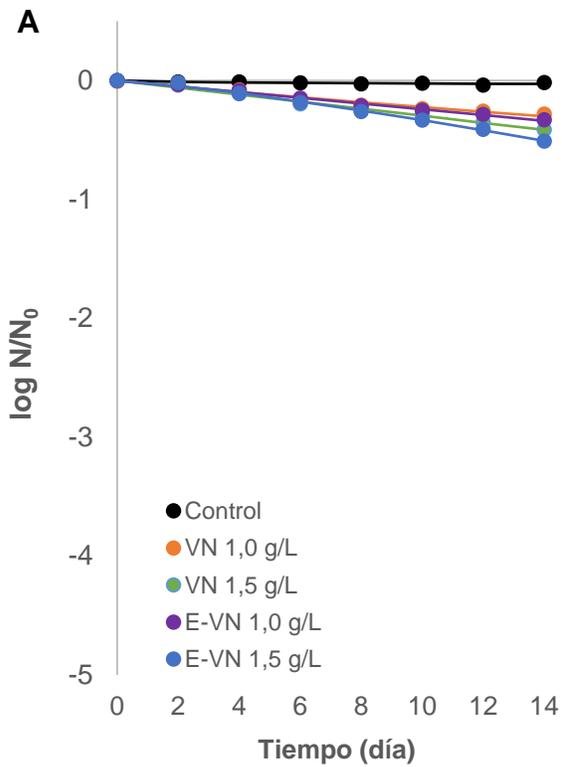
1 g/L de CIN y E-CIN presentaron un mayor peak, con curvas más estrechas, con menor moda, media y varianza que con la concentración 0,75 g/L y, por ende, la

población de microorganismos responde de manera más uniforme al cinamaldehído, inactivándose la mayoría a tiempos similares (Figura 17).

Por otro lado, el comportamiento de *E. coli* mostró poca influencia de la concentración y de la emulsificación del cinamaldehído sobre los valores de  $b$ , que demostraron las más baja efectividad antimicrobiana y valores de  $n$  cercanos a 1, con curvas de supervivencia lineales. Además, la baja inactivación alcanzada impidió generar curvas de frecuencia adecuadas ya que presentaron una gran varianza (entre 51,2 y 195,6 día<sup>2</sup>) con una gran dispersión de tiempos de muerte microbiana.

En cuanto al antimicrobiano vainillina (Figura 18), *S. cerevisiae* fue el microorganismo que mostró mayor grado de inactivación, con valores de  $b$  entre 0,15 y 0,30 donde vuelve a manifestar mayor influencia de la dosis de vainillina, que de la emulsificación (Tabla 11). Además, presentó valores  $n < 1$ , con curvas con concavidad hacia arriba indicando una relativamente rápida muerte inicial y luego efecto cola con una gran población resistente que permanece viable. En este sentido, las distribuciones de frecuencia de resistencias (Figura 19 B) mostraron valores muy grandes de media y varianza, con distribuciones asintóticas, demostrando que el modelo matemático de Weibull está limitado cuando las inactivaciones microbianas son bajas.

En cuanto a *E. coli* y *L. innocua*, no se observó nada concluyente en relación con los cambios en los parámetros del modelo. El  $b$  presentó valores muy bajos indicando baja inactivación microbiana, mientras que  $n$  presentó valores cercanos a  $n = 1$  para *E. coli* y  $n > 1$  para *L. innocua*. Por esta razón, las curvas de frecuencia acumulada de *E. coli* no se adecuaron bien al modelo (no mostradas). Es decir, que el



**Figura 18** Ajuste del modelo de Weibull aplicado a las curvas de supervivencia de los tratamientos de vainillina y E-VN en bebidas proteicas. **A:** *E. coli*; **B:** *L. innocua*; **C:** *S. cerevisiae*; (●) datos experimentales; (—) valores predichos por el modelo.

**Tabla 11**

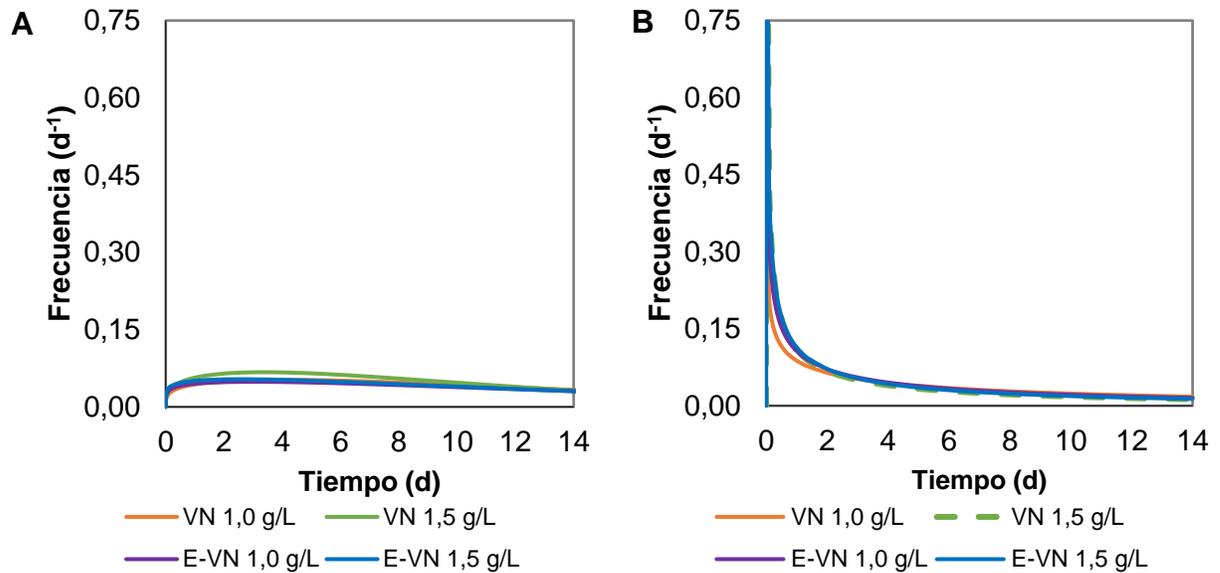
**Parámetros estimados de Weibull en los tratamientos con vainillina**

Microorganismo	Tratamiento	$b$ (d <sup>-n</sup> )	$n$	VE% (R <sup>2</sup> <sub>adj.</sub> )	Fisher	Moda (día)	Media (día)	Varianza (día <sup>2</sup> )	Asimetría (-)
<i>E. coli</i>	VN 1,0 g/L	0,028	0,90	95,8	91*	4,63	56,05	3889,3	2,4
	VN 1,5 g/L	0,030	1,00	99,2	447**	0,01	33,81	1144,0	2,1
	E-VN 1,0 g/L	0,024	1,01	98,9	334**	0,40	40,76	1630,1	2,1
	E-VN 1,5 g/L	0,019	1,25	99,5	618**	6,65	22,46	327,1	1,7
<i>L. innocua</i>	VN 1,0 g/L	0,036	1,26	99,6	864**	3,98	13,08	109,5	1,7
	VN 1,5 g/L	0,046	1,28	99,9	4737**	3,38	10,15	63,5	1,7
	E-VN 1,0 g/L	0,040	1,17	99,7	1168**	3,03	14,86	162,1	1,8
	E-VN 1,5 g/L	0,046	1,16	99,9	5261**	2,57	13,63	139,3	1,9
<i>S. cerevisiae</i>	VN 1,0 g/L	0,15	0,68	98,6	361**	5,45	21,31	1048,5	3,5
	VN 1,5 g/L	0,30	0,49	99,7	1852**	12,74	24,10	3123,1	6,5
	E-VN 1,0 g/L	0,23	0,59	99,4	983**	6,79	19,14	1196,4	4,4
	E-VN 1,5 g/L	0,30	0,51	99,1	658**	9,43	19,91	1846,7	5,8

\*Estadísticamente significativo al 0,05%; \*\*Estadísticamente significativo al 0,01%

efecto del agente antimicrobiano con y sin emulsionar es técnicamente el mismo, por lo que no hay diferencia entre los tratamientos de *L. innocua* con vainillina libre y vainillina emulsificada (Figura 19A).

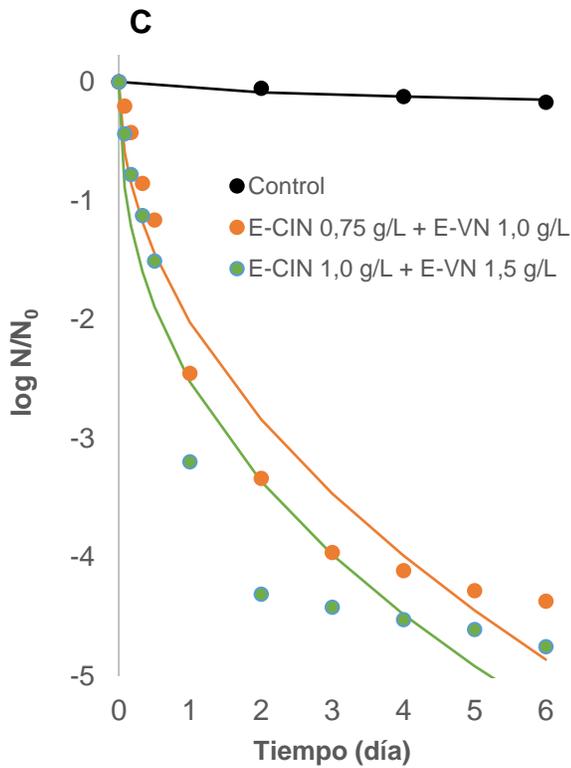
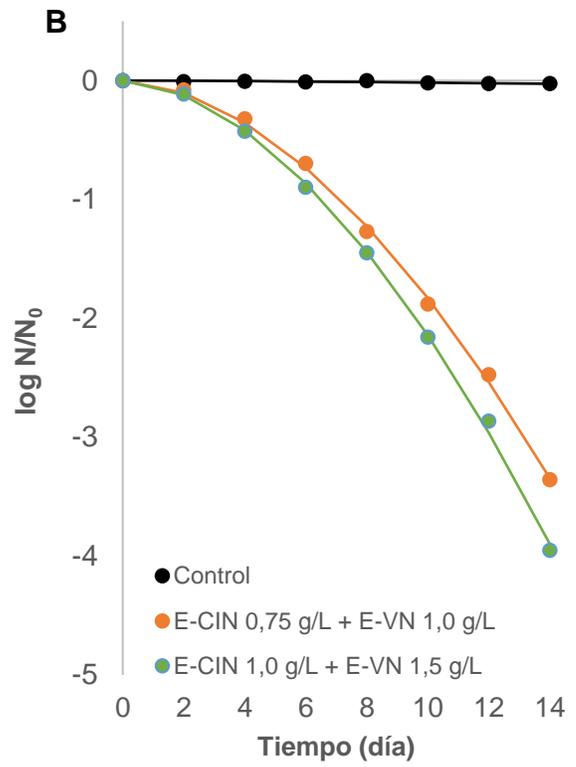
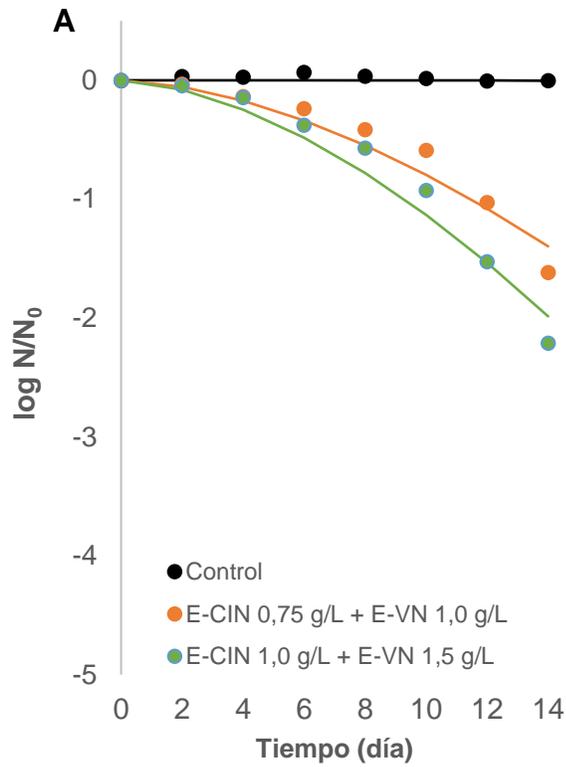
Por otro lado, el modelo de Weibull aplicado a los tratamientos combinados muestra curvas con diferente concavidad según el microorganismo evaluado. En *E. coli* se observan pequeños valores del parámetro  $b$  con valores del parámetro  $n > 1$ , lo que conlleva a bajos niveles de inactivación con curvas con concavidad hacia abajo (Figura 20, Tabla 12). Al comparar 2 curvas, el valor de  $b$  refleja adecuadamente el grado de inactivación solo cuando los valores de  $n$  están en el mismo rango (Peleg, 2006). Debido a que los tratamientos de *E. coli* con E-CIN presentaron valores  $n = 1$ , y los parámetros de E-CIN + E-VN presentaron valores  $n > 1,5$ , estos deben compararse a través de los parámetros de las distribuciones de frecuencia. Se puede observar que tanto E-CIN como el tratamiento combinado presentan modas parecidas. Sin embargo, los tratamientos combinados presentan menor varianza, y por ende, son



**Figura 19.** Distribución de resistencias de Weibull para los tratamientos con vainillina y E-VN en **A:** *L. innocua*; **B:** *S. cerevisiae*

más efectivos, aunque las distribuciones de frecuencia siguen siendo bastante amplias (Tabla 12, Figura 21).

En el caso de *L. innocua*, el tratamiento combinado significó la reducción del valor  $b$ , pero con un aumento del valor de  $n$ . Al igual que con el tratamiento con *E. coli*, debido a que los valores de  $n$  son diferentes en ambos tratamientos, solo se pueden comparar los efectos entre E-CIN y E-CIN + E-VN con los parámetros estadísticos. En este sentido, se puede observar que el efecto combinado conlleva a un aumento de los valores de moda y media, con una reducción en los valores de varianza. Asimismo, se observa un cambio en la concavidad de la curva, presentando valores de  $n < 1$  en el tratamiento con E-CIN, y valores  $n > 1$  en el tratamiento combinado. Es decir, que el tratamiento combinado al tener mayor  $n$  aumenta el tiempo en que hace efecto el tratamiento, pero la población responde de manera más uniforme (menor varianza), y



**Figura 20.** Ajuste del modelo de Weibull aplicado a las curvas de supervivencia de los tratamientos combinados en bebidas proteicas. **A:** *E. coli*; **B:** *L. innocua*; **C:** *S. cerevisiae*; (●) datos experimentales; (—) valores predichos por el modelo.

**Tabla 12**

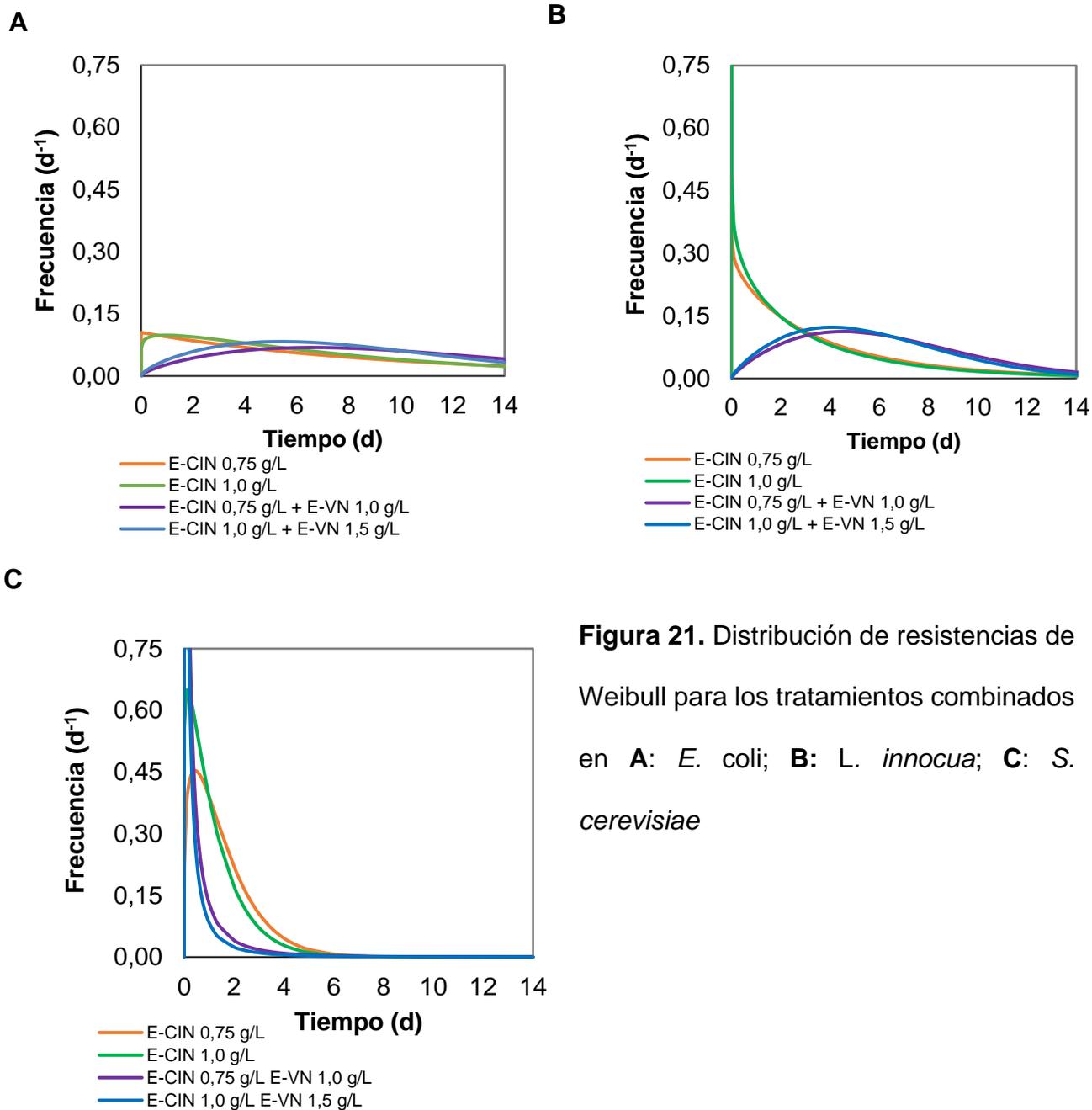
**Parámetros estimados de Weibull en los tratamientos combinados**

Microorganismo	Tratamiento	$b$ (d <sup>-n</sup> )	$n$	VE% (R <sup>2</sup> <sub>adj.</sub> )	Fisher	Moda (día)	Media (día)	Varianza (día <sup>2</sup> )	Asimetría (-)
<i>E. coli</i>	E-CIN 0,75 g/L + E-VN 1,0 g/L	0,017	1,68	93,6	34*	6,68	10,25	39,5	1,4
	E-CIN 1,0 g/L + E-VN 1,5 g/L	0,024	1,67	95,7	53**	5,36	8,29	26,1	1,4
<i>L. innocua</i>	E-CIN 0,75 g/L + E-VN 1,0 g/L	0,029	1,79	99,9	2029***	4,54	6,35	13,4	1,4
	E-CIN 1,0 g/L + E-VN 1,5 g/L	0,036	1,78	99,9	2273***	4,09	5,80	11,4	1,4
<i>S. cerevisiae</i>	E-CIN 0,75 g/L + E-VN 1,0 g/L	2,02	0,49	94,9	60**	0,26	0,49	1,3	6,4
	E-CIN 1,0 g/L + E-VN 1,5 g/L	2,52	0,41	91,9	42**	0,25	0,32	0,9	9,7

\*Estadísticamente significativo al 0,10%; \*\*Estadísticamente significativo al 0,05%; \*\*\*Estadísticamente significativo al 0,01%

por lo tanto, no hay efecto aditivo. Además, se mencionó anteriormente, que en *L. innocua* no existe un efecto adicional al combinar ambas emulsiones y, al igual que *E. coli*, el mecanismo de acción se basa en la acumulación de daño.

Por último, en *S. cerevisiae* se observa un aumento de más de tres veces el valor de  $b$  junto a una disminución del parámetro  $n$ . Las curvas de frecuencia nos dan a entender que el mecanismo de acción es una reducción marcada del microorganismo a tiempos muy cortos (Figura 21). Asimismo, al comparar E-CIN y E-CIN + E-VN, los tratamientos combinados obtuvieron curvas de frecuencia que presentan menores valores en la moda, media y varianza, indicando así un aumento en la actividad antimicrobiana al utilizar ambas emulsiones. Además, la curva de frecuencia cae rápidamente, indicando que la mayoría de la población antimicrobiana ha sido eliminada en ese corto período de tiempo.



**Figura 21.** Distribución de resistencias de Weibull para los tratamientos combinados en **A:** *E. coli*; **B:** *L. innocua*; **C:** *S. cerevisiae*

En el estudio del tratamiento combinado de quitosano y ultrasonido contra *S. cerevisiae* (Guerrero et al., 2005), se observó una disminución del parámetro  $b$  junto a un aumento del parámetro de  $n$ , al igual que los tratamientos combinados de E-CIN + E-VN en *E. coli* y *L. innocua*. Al igual que en esta tesis, las curvas de distribución permiten explicar el efecto del tratamiento combinado. Los parámetros estadísticos

indican un menor valor de media, al igual que el tratamiento combinado contra *E. coli*. Asimismo, en el tratamiento más efectivo se observa un cambio en la concavidad de la curva, pasando de una concavidad hacia abajo ( $n > 1$ ) a una concavidad hacia arriba ( $n < 1$ ), demostrando que el tratamiento inactiva a los microorganismos de manera más rápida y uniforme, similar a lo ocurrido en el tratamiento combinado en *S. cerevisiae*. Por otro lado, en el tratamiento combinado de la luz UV-C con tratamientos térmicos suaves contra *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* en jugos de zanahoria, no se observa ningún patrón claro en la variación de los parámetros  $b$  y  $n$ . Sin embargo, se observa una disminución en la varianza y la media de las distribuciones de frecuencia, similar al efecto observado en la emulsificación de cinamaldehído, indicando así el aumento en la actividad antimicrobiana.

En general, ambos modelos pudieron explicar en gran medida los resultados experimentales, llegando a obtener valores de  $R^2_{adj}$  cercanos al 99,9%. Sin embargo, los modelos matemáticos tienen sus propias limitaciones. Uno de los problemas del ajuste de Weibull es que no predice bien cuando hay curvas bifásicas, como en el caso de los tratamientos combinados con E-CIN 1,0 g/L + E-VN 1,5 g/L contra *S. cerevisiae*, donde el valor de  $R^2_{adj}$  disminuyó a un 91,9%. En este gráfico, la curva presenta una cola desde el día 3, y el modelo no explica este tipo de comportamientos en las curvas de supervivencia. Para este caso, el ajuste del modelo de Gompertz modificado fue mejor. Asimismo, el otro caso particular es cuando se presentan hombros en las curvas, como en el tratamiento E-CIN 0,75 g/L + E-VN 1,0 g/L contra *E. coli*, el cual obtuvo un valor de  $R^2_{adj}$  que disminuyó a un 93,6%. Este comportamiento también se ha observado en otros tratamientos, como en la

combinación de luz UV-C con tratamientos térmicos suaves en jugos de zanahoria, en donde se observan curvas bifásicas (García, 2020). Al igual que en esta tesis, en estos casos el ajuste del modelo Gompertz fue más adecuado que el modelo de Weibull. Para las curvas más sigmoides, se han descritos variantes del modelo matemático de Weibull para poder explicar este tiempo comportamientos (Buzrul, 2022).

Por otro lado, una ventaja del modelo de Weibull es que entrega gráficos de distribuciones de frecuencia, y parámetros estadísticos para poder describir los comportamientos de cada individuo de la población microbiana frente a los tratamientos. Sin embargo, la distribución también tiene sus limitantes, ya que, cuando los microorganismos son muy resistentes al tratamiento, como los es en el caso de los tratamientos de cinamaldehído y E-CIN contra *E. coli*, o los tratamientos con vainillina pueden observarse gráficos de frecuencia que podrían dar a conclusiones equivocadas, ya que la varianza presenta valores excesivamente altos.

Por otro lado, el modelo matemático de Gompertz pudo describir las curvas en la cual el modelo matemático de Weibull está limitado, como son los casos anteriormente expuestos: la presencia de hombro o colas en la curva, y cuando la reducción del número de microorganismos es baja, como lo es en el caso del efecto de la emulsificación de cinamaldehído, ya que al comparar los parámetros  $C$ ,  $A$  y  $B$ , se entiende el efecto de la emulsificación. Esto también se observa en el estudio de tratamientos combinados de quitosano con ultrasonido contra *S. cerevisiae* (Guerrero et al., 2005), en las que los parámetros  $C$ ,  $A$  y  $B$  del modelo de Gompertz explica de mejor manera que los parámetros  $b$  y  $n$  del modelo de Weibull. Sin embargo, este modelo también tiene sus limitantes, cuyas carencias si pueden ser explicadas por el

modelo de Weibull. Uno de estos casos es el efecto combinado de E-CIN + E-VN contra *L.innocua*, la cual pareciera encontrarse un efecto aditivo, ya que se presentan aumentos en los valores de  $C$  y  $B$ . No obstante, el comportamiento de la población frente a este tratamiento presenta mayor media en el tiempo de tratamiento, y, como consecuencia, no hay efecto a los 14 días de almacenamiento. Esto también ocurre al comparar los parámetros  $C$ ,  $B$  y  $A$  del tratamiento combinado de luz UC-C con un tratamiento de 45 °C y 50 °C (García, 2020), en donde al observar los parámetros del modelo de Gompertz uno no puede determinar cuál es el mejor tratamiento. Sin embargo, el análisis de la distribución de la población del modelo de Weibull permite explicar esto, ya que no hay diferencias en la moda observada, pero si en la varianza, demostrando que el tratamiento a 50° C, al tener una menor moda, es más eficaz. En resumen, la aplicación de ambos modelos fue necesaria para entender a cabalidad los procesos de inactivación realizados por cinamaldehído, vainillina y sus correspondientes emulsiones.

## 7. CONCLUSIONES

Los aceites esenciales tienen propiedades antimicrobianas que fueron descritas en la medicina tradicional, y que son utilizados en diversos ámbitos de la industria alimentaria. La emulsificación de estos compuestos hidrófobos como la vainillina y cinamaldehído con concentrado de proteína de suero de leche permitió incrementar su solubilidad e incorporarlos en matrices acuosas, como una bebida láctea. Con cinamaldehído, se pudieron formar emulsiones estables con similar tamaño de gota sin importar la proporción de emulsificante:antimicrobiano usada. Mientras que, la emulsificación de vainillina en proporciones WPC:vainillina 1:1 formó emulsiones inestables y con gran tamaño de gota. En cambio, la proporción WPC:vainillina 2:1 formó emulsiones más estables.

En todos los ensayos, E-CIN demostró tener mayor actividad antimicrobiana que E-VN, siendo muy eficaz para *S. cerevisiae*, alcanzando reducciones de 5 ciclos logarítmicos a los 7 días de almacenamiento. Asimismo, E-CIN alcanzó una reducción de hasta 1,8 y 3,5 ciclos logarítmicos para *E. coli* y *L. innocua* respectivamente a los 14 días de almacenamiento. La emulsificación de cinamaldehído aumentó la capacidad antimicrobiana de este compuesto. Los estudios de liberación permitieron demostrar que una de las posibles razones del incremento de la actividad antimicrobiana es la liberación controlada de cinamaldehído.

En cambio, E-VN produjo una reducción de hasta 0,5, 1,0 y 1,1 ciclos logarítmicos para *E. coli*, *L. innocua* y *S. cerevisiae*, respectivamente, a los 14 días de almacenamiento. La emulsificación de vainillina no tuvo ningún efecto en la actividad antimicrobiana de este compuesto.

Las emulsiones aplicadas en combinación en bebidas inoculadas con *S. cerevisiae*, mostraron un sinergismo, lo que permitió una reducción de más 4,0 ciclos logarítmicos a los dos días de almacenamiento. Además, se observó un efecto aditivo de la combinación contra *E. coli*, y un nulo efecto en la inactivación de *L. innocua*.

Tanto el modelo matemático de Gompertz como el de Weibull describieron el efecto de la emulsificación de los antimicrobianos. El modelo de Gompertz describió todo tipo de curvas: lineales, con hombros y/o cola, y en aquellas donde el microorganismo presenta alta resistencia al tratamiento. Mientras que, el modelo de Weibull describió el comportamiento de cada individuo de la población a través de las distribuciones de frecuencia de resistencias, y permitió describir de mejor manera el efecto de los tratamientos combinados.

La emulsificación de cinamaldehído con proteína de suero de leche demostró ser una buena estrategia para mejorar la incorporación de los aceites esenciales a alimentos e incrementó la actividad antimicrobiana, lo que podría permitir su futura implementación como agente antimicrobiano en bebidas proteicas. Es necesario seguir estudiando la emulsificación de la vainillina para mejorar su incorporación y su actividad antimicrobiana en alimentos.

## **8. PROYECCIONES FUTURAS**

En esta tesis se ha demostrado el potencial del cinamaldehído para ser incorporado como agente antimicrobiano en bebidas proteicas. Asimismo, se demostró que la emulsificación de cinamaldehído permite aumentar la capacidad antimicrobiana del compuesto. Sin embargo, incluso con la combinación con vainillina, este no logra una reducción de 5 ciclos logarítmicos para ser considerado como único factor de preservación y es necesario combinarlo con alguna otra tecnología de procesamiento mínimo.

Es posible proponer esta emulsión E-CIN como un preservante para alargar la vida útil del producto. Para cumplir este criterio, habría que evaluar la estabilidad microbiológica con el recuento de aeróbios mesófilos, según lo estipulado en el Reglamento Sanitario de los Alimentos.

Por otra parte, otro posible planteamiento también sería reformular la emulsificación de vainillina, para ver si algún otro agente encapsulante u otra técnica permite aumentar la actividad antimicrobiana. Otro aspecto importante es evaluar la aceptabilidad del producto en consumidores, a través de un panel de evaluación sensorial, cuya investigación también se está realizando en el laboratorio.

Por último, en términos comerciales, habría que hacer un estudio de mercado para evaluar el público objetivo, debido a que el uso de antimicrobianos y la creación de esta bebida funcional tendría un costo más elevado que si se usaran los métodos convencionales de la industria. Sin embargo, si el mercado objetivo tiene presente la obtención de productos más naturales, sin conservantes artificiales y la tendencia a

este tipo de productos sigue creciendo, es posible que esta bebida pueda salir al mercado en algún futuro.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- A. Shaaban, H. (2020). Essential Oil as Antimicrobial Agents: Efficacy, Stability, and Safety Issues for Food Application. In M. Santana De Oliveira, W. Almeida Da Costa, & S. Gomes Silva (Eds.), *Essential Oils—Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92305>
- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2014). Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*, 122, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.034>
- Alsakhawy, S. A., Baghdadi, H. H., El-Shenawy, M. A., Sabra, S. A., & El-Hosseiny, L. S. (2022). Encapsulation of thymus vulgaris essential oil in caseinate/gelatin nanocomposite hydrogel: In vitro antibacterial activity and in vivo wound healing potential. *International Journal of Pharmaceutics*, 628, 122280. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122280>
- Amaral, G. V., Silva, E. K., Costa, A. L. R., Alvarenga, V. O., Cavalcanti, R. N., Esmerino, E. A., Guimarães, J. T., Freitas, M. Q., Sant'Ana, A. S., Cunha, R. L., Moraes, J., Silva, M. C., Meireles, M. A. A., & Cruz, A. G. (2018). Whey-grape juice drink processed by supercritical carbon dioxide technology: Physical properties and sensory acceptance. *LWT*, 92, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.005>
- Arya, S. S., Rookes, J. E., Cahill, D. M., & Lenka, S. K. (2021). Vanillin: A review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. *Advances in Traditional Medicine*, 21(3), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00531-w>
- Ashakirin, S. N., Tripathy, M., Patil, U. K., & Majeed, A. B. A. (2017). Chemistry and bioactivity of cinnamaldehyde: A natural molecule of medicinal importance. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(6), 2333–2340. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8\(6\).2333-40](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8(6).2333-40)
- Babic, M., Glisic, M., Zdravkovic, N., Djordjevic, J., Velebit, B., Ledina, T., Baltic, M. Z., & Boskovic, M. (2019). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by cinnamaldehyde and its effect on sensory properties of milk. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 333, 012042. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/333/1/012042>
- Baer, D. J., Stote, K. S., Paul, D. R., Harris, G. K., Rumpler, W. V., & Clevidence, B. A. (2011). Whey Protein but Not Soy Protein Supplementation Alters Body Weight and Composition in Free-Living Overweight and Obese Adults. *The Journal of Nutrition*, 141(8), 1489–1494. <https://doi.org/10.3945/jn.111.139840>
- Bajac, J., Nikolovski, B., Lončarević, I., Petrović, J., Bajac, B., Đurović, S., & Petrović, L. (2022). Microencapsulation of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L.) by spray drying: Microcapsule characterization and release kinetics of the oil. *Food Hydrocolloids*, 125, 107430. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107430>

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Baskaran, S. A., Amalaradjou, M. A. R., Hoagland, T., & Venkitanarayanan, K. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider by trans-cinnamaldehyde. *International Journal of Food Microbiology*, *141*(1–2), 126–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.002>
- Beristáin-Bauza, S., Martínez-Niño, A., Ramírez-González, A. P., Ávila-Sosa, R., Ruíz-Espinosa, H., Ruiz-López, I. I., & Ochoa-Velasco, C. E. (2018). Inhibition of *Salmonella* Typhimurium growth in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by hurdle technology. *Food Control*, *92*, 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.010>
- Boeve, J., & Joye, I. J. (2020). Food-grade strategies to increase stability of whey protein particles: Particle hardening through aldehyde treatment. *Food Hydrocolloids*, *100*, 105353. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105353>
- Bounous, G. (2000). Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Research*, *20* 6C, 4785–4792.
- Bourbon, A. I., Pereira, R. N., Pastrana, L. M., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2019). Protein-Based Nanostructures for Food Applications. *Gels*, *5*(1), 9. <https://doi.org/10.3390/gels5010009>
- Buranasuksombat, U., Kwon, Y. J., Turner, M., & Bhandari, B. (2011). Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. *Food Science and Biotechnology*, *20*(3), 793–800. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0110-x>
- Buzrul, S. (2022). The Weibull Model for Microbial Inactivation. *Food Engineering Reviews*, *14*(1), 45–61. <https://doi.org/10.1007/s12393-021-09291-y>
- Cai, Z., Wei, Y., Shi, A., Zhong, J., Rao, P., Wang, Q., & Zhang, H. (2023). Correlation between interfacial layer properties and physical stability of food emulsions: Current trends, challenges, strategies, and further perspectives. *Advances in Colloid and Interface Science*, 102863. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102863>
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, *54*, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Camargo, L. da R., Doneda, D., & Oliveira, V. R. (2020). Whey protein ingestion in elderly diet and the association with physical, performance and clinical outcomes. *Experimental Gerontology*, *137*, 110936. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110936>

- Campelo, P. H., Junqueira, L. A., Resende, J. V. de, Zacarias, R. D., Fernandes, R. V. de B., Botrel, D. A., & Borges, S. V. (2017). Stability of lime essential oil emulsion prepared using biopolymers and ultrasound treatment. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S564–S579. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1303707>
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of The Total Environment*, 445–446, 385–396. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- Cava-Roda, R. M., Taboada, A., Palop, A., López-Gómez, A., & Marin-Iniesta, F. (2012a). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in semi-skim milk supplemented with vanillin. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.003>
- Cava-Roda, R. M., Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M. T., & Marín-Iniesta, F. (2012b). Antimicrobial Activity of Vanillin and Mixtures with Cinnamon and Clove Essential Oils in Controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Milk. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2120–2131. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0484-4>
- Cava-Roda, R., Taboada-Rodríguez, A., López-Gómez, A., Martínez-Hernández, G. B., & Marín-Iniesta, F. (2021). Synergistic Antimicrobial Activities of Combinations of Vanillin and Essential Oils of Cinnamon Bark, Cinnamon Leaves, and Cloves. *Foods*, 10(6), 1406. <https://doi.org/10.3390/foods10061406>
- Chalé, A., Cloutier, G. J., Hau, C., Phillips, E. M., Dallal, G. E., & Fielding, R. A. (2013). Efficacy of Whey Protein Supplementation on Resistance Exercise–Induced Changes in Lean Mass, Muscle Strength, and Physical Function in Mobility-Limited Older Adults. *The Journals of Gerontology: Series A*, 68(6), 682–690. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls221>
- Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2013). Physicochemical Properties and Antimicrobial Efficacy of Carvacrol Nanoemulsions Formed by Spontaneous Emulsification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(37), 8906–8913. <https://doi.org/10.1021/jf402147p>
- Char, C., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. (2009). Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. *Food Control*, 20(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.004>
- Chen, E., Wu, S., McClements, D. J., Li, B., & Li, Y. (2017). Influence of pH and cinnamaldehyde on the physical stability and lipolysis of whey protein isolate-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 69, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.028>

- Choi, M. J., Kim, S. A., Lee, N. Y., & Rhee, M. S. (2013). New decontamination method based on caprylic acid in combination with citric acid or vanillin for eliminating *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in reconstituted infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.016>
- Chung, H.-S., Toivonen, P. M. A., & Moon, K.-D. (2009). Effect of High Vanillin Treatment on Storage Quality of Fresh-cut Apples. *Food Science and Biotechnology*, 18(3), 636–640.
- Dapueto, N., Troncoso, E., Mella, C., & Zúñiga, R. N. (2019). The effect of denaturation degree of protein on the microstructure, rheology and physical stability of oil-in-water (O/W) emulsions stabilized by whey protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 263, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.07.005>
- de Castro, R. J. S., Domingues, M. A. F., Ohara, A., Okuro, P. K., dos Santos, J. G., Brexó, R. P., & Sato, H. H. (2017). Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. *Food Structure*, 14, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.05.004>
- De Simone, C., Picariello, G., Mamone, G., Stiuso, P., Dicitore, A., Vanacore, D., Chianese, L., Addeo, F., & Ferranti, P. (2009). Characterisation and cytomodulatory properties of peptides from Mozzarella di Bufala Campana cheese whey: Bioactive peptides in mozzarella di Bufala whey. *Journal of Peptide Science*, 15(3), 251–258. <https://doi.org/10.1002/psc.1093>
- Deeth, H., & Bansal, N. (2019). Whey Proteins. In *Whey Proteins* (pp. 1–50). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00001-1>
- Ding, Q., Ge, C., Baker, R. C., Buchanan, R. L., & Tikekar, R. V. (2023). Assessment of trans-cinnamaldehyde and eugenol assisted heat treatment against *Salmonella* Typhimurium in low moisture food components. *Food Microbiology*, 112, 104228. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104228>
- Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., & Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, 74(6), 831–840. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.029>
- Doyle, A. A., & Stephens, J. C. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139, 104405. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>
- El-Loly, M. M. (2007). Bovine Milk Immunoglobulins in Relation to Human Health. *International Journal of Dairy Science*, 2(3), 183–195. <https://doi.org/10.3923/ijds.2007.183.195>

Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F., & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)

Fernández-Ávila, C., Escriu, R., & Trujillo, A. J. (2015). Ultra-High Pressure Homogenization enhances physicochemical properties of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Research International*, 75, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.026>

Ferrario, M., Fenoglio, D., Chantada, A., & Guerrero, S. (2020). Hurdle processing of turbid fruit juices involving encapsulated citral and vanillin addition and UV-C treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 332, 108811. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108811>

Ferraz, M. C., Procópio, F. R., de Figueiredo Furtado, G., Munhoz Moya, A. M. T., Cazarin, C. B. B., & Hubinger, M. D. (2021). Cinnamon and paprika oleoresin emulsions: A study of physicochemical stability and antioxidant synergism. *Food Research International*, 150, 110777. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110777>

Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2004a). The Potential Application of Vanillin in Preventing Yeast Spoilage of Soft Drinks and Fruit Juices. *Journal of Food Protection*, 67(2), 391–395. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.2.391>

Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., Ueckert, J., Bos, A., & Narbad, A. (2004b). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 104–113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02275.x>

Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. (2023, June 29). 21 CFR 120.24. <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-120/subpart-B/section-120.24>

Friedman, M. (2017). Chemistry, Antimicrobial Mechanisms, and Antibiotic Activities of Cinnamaldehyde against Pathogenic Bacteria in Animal Feeds and Human Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10406–10423. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04344>

Gallo, V., Giansanti, F., Arienzo, A., & Antonini, G. (2022). Antiviral properties of whey proteins and their activity against SARS-CoV-2 infection. *Journal of Functional Foods*, 89, 104932. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104932>

García, Mercedes. (2020). *Evaluación de la efectividad del uso de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) asistido por temperatura moderada en la preservación de jugos turbios*. Universidad de Buenos Aires.

Gomes, M. H. G., & Kurozawa, L. E. (2023). Performance of rice protein hydrolysates as a stabilizing agent on oil-in-water emulsions. *Food Research International*, 172, 113099. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113099>

Guan, P., Wang, X., Dong, Z., Song, M., Zhu, H., & Suo, B. (2023). Cinnamaldehyde inactivates *Listeria monocytogenes* at a low temperature in ground pork by disturbing the expression of stress regulatory genes. *Food Bioscience*, 51, 102277. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102277>

Guerrero, S., Tognon, M., & Alzamora, S. M. (2005). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food Control*, 16(2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.01.003>

Hasanvand, E., & Rafe, A. (2019). Development of vanillin/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion microcapsules using flax seed gum-rice bran protein complex coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.066>

He, T.-F., Wang, L.-H., Niu, D., Wen, Q., & Zeng, X.-A. (2019). Cinnamaldehyde inhibit *Escherichia coli* associated with membrane disruption and oxidative damage. *Archives of Microbiology*, 201(4), 451–458. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1572-5>

Hebishy, E., Collette, L., Ihezor-Ejiofor, P., & Onarinde, B. A. (2022). Stability and antimicrobial activity of lemongrass essential oil in nanoemulsions produced by high-intensity ultrasounds and stabilized by soy lecithin, hydrolyzed whey proteins, gum Arabic, or their ternary admixture. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(10). <https://doi.org/10.1111/jfpp.16840>

Ho, J. C. S., Nadeem, A., & Svanborg, C. (2017). HAMLET – A protein-lipid complex with broad tumoricidal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 454–458. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.092>

Houde, M., Khodaei, N., & Karboune, S. (2018). Assessment of interaction of vanillin with barley, pea and whey proteins: Binding properties and sensory characteristics. *LWT*, 91, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.022>

Hulmi, J. J., Lockwood, C. M., & Stout, J. R. (2010). Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutrition & Metabolism*, 7(51), 11. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-51>

Hundre, S. Y., Karthik, P., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Effect of whey protein isolate and  $\beta$ -cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray-freeze drying method. *Food Chemistry*, 174, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.016>

Hutson, S. M., Lieth, E., & LaNoue, K. F. (2001). Function of Leucine in Excitatory Neurotransmitter Metabolism in the Central Nervous System. *The Journal of Nutrition*, 131(3), 846S-850S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.3.846S>

Islam, M. Z., Tabassum, S., Harun-ur-Rashid, M., Vegarud, G. E., Alam, M. S., & Islam, M. A. (2021). Development of probiotic beverage using whey and pineapple (*Ananas comosus*) juice: Sensory and physico-chemical properties and probiotic survivability during in-vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Agriculture and Food Research*, 4, 100144. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100144>

Jelen, P. (2009). Whey-based functional beverages. In *Functional and Speciality Beverage Technology* (pp. 259–280). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845695569.2.259>

Jo, Y.-J., Chun, J.-Y., Kwon, Y.-J., Min, S.-G., Hong, G.-P., & Choi, M.-J. (2015). Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.041>

Kelly, P. (2019). Manufacture of Whey Protein Products. In *Whey Proteins* (pp. 97–122). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00003-5>

Kerksick, C., & Willoughby, D. (2005). The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2(2), 38. <https://doi.org/10.1186/1550-2783-2-2-38>

Kim, S. A., & Rhee, M. S. (2016). Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol,  $\beta$ -resorcylic acid, trans -cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control*, 60, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.022>

Krogsgård Nielsen, C., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., Schwarz, K., Serfert, Y., & Meyer, R. L. (2016). Enhancing the antibacterial efficacy of isoeugenol by emulsion encapsulation. *International Journal of Food Microbiology*, 229, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.002>

Kryuchkova, V. V., Gorlov, I. F., Slozhenkina, M. I., Mosolova, N. I., Lomonova, N. V., Belik, S. N., & Skripin, P. V. (2022). Consumer properties and environmental safety of a functional curd product. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 965(1), 012042. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/965/1/012042>

Kumar, R., Sharma, P. K., & Mishra, P. S. (2012). A Review on the Vanillin derivatives showing various Biological activities. *International Journal of PharmTech Research*, 4(1), 266–279.

Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2014a). Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides*, *54*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.002>

Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2014b). Overview of food products and dietary constituents with antidiabetic properties and their putative mechanisms of action: A natural approach to complement pharmacotherapy in the management of diabetes. *Molecular Nutrition & Food Research*, *58*(1), 61–78. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300223>

Lacroix, M., Chiasson, F., Borsa, J., & Ouattara, B. (2004). Radiosensitization of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* in presence of active compounds. *Radiation Physics and Chemistry*, *71*(1–2), 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.04.060>

Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, *141*(2), 975–984. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>

Leidy, H. J., Clifton, P. M., Astrup, A., Wycherley, T. P., Westerterp-Plantenga, M. S., Luscombe-Marsh, N. D., Woods, S. C., & Mattes, R. D. (2015). The role of protein in weight loss and maintenance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *101*(6), 1320S–1329S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.084038>

Li, Q., & Zhu, X. (2021). Vanillin and its derivatives, potential promising antifungal agents, inhibit *Aspergillus flavus* spores via destroying the integrity of cell membrane rather than cell wall. *Grain & Oil Science and Technology*, *4*(2), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2021.03.002>

Li, Q., Zhu, X., Zhao, Y., & Xie, Y. (2022). The antifungal activity of o-vanillin against *Aspergillus flavus* via disrupting ergosterol biosynthesis and promoting oxidative stress, and an RNA-seq analysis thereof. *LWT*, *164*, 113635. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113635>

Linton, R. H., Carter, W. H., Pierson, M. D., & Hackney, C. R. (1995). Use of a Modified Gompertz Equation to Model Nonlinear Survival Curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, *58*(9), 946–954. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.9.946>

Liu, X., Chen, L., Kang, Y., He, D., Yang, B., & Wu, K. (2021). Cinnamon essential oil nanoemulsions by high-pressure homogenization: Formulation, stability, and antimicrobial activity. *LWT*, *147*, 111660. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111660>

Ma, Y., Liu, J., Shi, H., & Yu, L. (Lucy). (2016). Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein. *Journal of Dairy Science*, *99*(9), 6902–6912. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11186>

- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Chruszcz, M., & Minor, W. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, *52*(3–4), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>
- Martău, G. A., Călinoiu, L.-F., & Vodnar, D. C. (2021). Bio-vanillin: Towards a sustainable industrial production. *Trends in Food Science & Technology*, *109*, 579–592. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.059>
- Martínez-Graciá, C., González-Bermúdez, C. A., Cabellero-Valcárcel, A. M., Santaella-Pascual, M., & Frontela-Saseta, C. (2015). Use of herbs and spices for food preservation: Advantages and limitations. *Current Opinion in Food Science*, *6*, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.011>
- Marwaha, S. S., & Kennedy, J. F. (2007). Whey-pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science & Technology*, *23*(4), 323–336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb00586.x>
- Mauriello, E., Ferrari, G., & Donsì, F. (2021). Effect of formulation on properties, stability, carvacrol release and antimicrobial activity of carvacrol emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *197*, 111424. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111424>
- Mazorra-Manzano (SNI I), M. Á., & Moreno-Hernández, J. M. (2019). Propiedades y opciones para valorizar el lactosuero de la quesería artesanal. *CienciaUAT*, *14*(1), 133. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v14i1.1134>
- McClements, D. J. (2016). General Characteristics of Food Emulsions. In *Food emulsions: Principles, practices and techniques* (3rd ed., pp. 1–26). CRC Press.
- McClements, D. J., & Jafari, S. M. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *251*, 55–79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.001>
- Merens, W., Booij, L., Markus, R., Zitman, F. G., Onkenhout, W., & Van der Does, A. J. W. (2005). The effects of a diet enriched with  $\alpha$ -lactalbumin on mood and cortisol response in unmedicated recovered depressed subjects and controls. *British Journal of Nutrition*, *94*(3), 415–422. <https://doi.org/10.1079/BJN20051492>
- Moguel-Castañeda, J. G., González-Salomón, M., Hernández-García, H., Morales-Zarate, E., Puebla, H., & Hernandez-Martinez, E. (2020). Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of raw cheese whey: Experimental evaluation and mathematical modeling. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, *18*(7). <https://doi.org/10.1515/ijcre-2020-0022>

- Muthuswamy, S., Rupasinghe, H. P. V., & Stratton, G. W. (2008). Antimicrobial effect of cinnamon bark extract on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua* and fresh-cut apple slices: Cinnamon as an antimicrobial source for fresh-cut apples. *Journal of Food Safety*, 28(4), 534–549. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2008.00129.x>
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>
- Newsholme, P., Gaudel, C., & McClenaghan, N. H. (2010). Nutrient Regulation of Insulin Secretion and  $\beta$ -Cell Functional Integrity. In Md. S. Islam (Ed.), *The Islets of Langerhans* (Vol. 654, pp. 91–114). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3_6)
- Niu, H., Wang, W., Dou, Z., Chen, X., Chen, X., Chen, H., & Fu, X. (2023). Multiscale combined techniques for evaluating emulsion stability: A critical review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 311, 102813. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102813>
- Noshad, M., Mohebbi, M., Koocheki, A., & Shahidi, F. (2015). Microencapsulation of vanillin by spray drying using soy protein isolate-maltodextrin as wall material: Microencapsulation of vanillin by spray drying. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(5), 387–391. <https://doi.org/10.1002/ffj.3253>
- OECD. (2022, February 13). *DAIRY - OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027*. <https://stats.oecd.org/Index.aspx?QueryId=84955>
- Olatunde, A., Mohammed, A., Ibrahim, M. A., Tajuddeen, N., & Shuaibu, M. N. (2022). Vanillin: A food additive with multiple biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 5, 100055. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100055>
- Oliveira, G. A. R., Guimarães, J. T., Ramos, G. L. P. A., Esmerino, E. A., Pimentel, T. C., Neto, R. P. C., Tavares, M. I. B., Sobral, L. A., Souto, F., Freitas, M. Q., Costa, L. E. O., & Cruz, A. G. (2022). Benefits of thermosonication in orange juice whey drink processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 75, 102876. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102876>
- O'Mahony, J. A., & Fox, P. F. (2013). Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. In P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry* (pp. 43–85). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_2)
- OuYang, Q., Duan, X., Li, L., & Tao, N. (2019). Cinnamaldehyde Exerts Its Antifungal Activity by Disrupting the Cell Wall Integrity of *Geotrichum citri-aurantii*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 55. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00055>
- Pandey, S., & Ojha, P. (2020). Preparation and Quality Evaluation of Mango based Whey Beverage. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, 12(12), 59–61. <https://doi.org/10.3126/jfstn.v12i12.33375>

- Paulo, B. B., Alvim, I. D., Reineccius, G., & Prata, A. S. (2020). Performance of oil-in-water emulsions stabilized by different types of surface-active components. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *190*, 110939. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110939>
- Pei, X., Tekliye, M., & Dong, M. (2021). Isolation and identification of fungi found in contaminated fermented milk and antifungal activity of vanillin. *Food Science and Human Wellness*, *10*(2), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.02.011>
- Peleg, M. (2006). *Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems: Models for Predicting Growth and Inactivation* (0 ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420005370>
- Peleg, M., & Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of Microbial Survival Curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *38*(5), 353–380. <https://doi.org/10.1080/10408699891274246>
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., & Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine L-lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1526*, 131–140.
- Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00076>
- Pina-Pérez, M. C., Martínez-López, A., & Rodrigo, D. (2012). Cinnamon antimicrobial effect against *Salmonella typhimurium* cells treated by pulsed electric fields (PEF) in pasteurized skim milk beverage. *Food Research International*, *48*(2), 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.027>
- Prakash, A., Baskaran, R., Paramasivam, N., & Vadivel, V. (2018). Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. *Food Research International*, *111*, 509–523. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.066>
- Qu, S., Yang, K., Chen, L., Liu, M., Geng, Q., He, X., Li, Y., Liu, Y., & Tian, J. (2019). Cinnamaldehyde, a Promising Natural Preservative Against *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2895. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02895>
- Reig, M., Vecino, X., & Cortina, J. L. (2021). Use of Membrane Technologies in Dairy Industry: An Overview. *Foods*, *10*(11), 2768. <https://doi.org/10.3390/foods10112768>
- Rice, B. H., Cifelli, C. J., Pikosky, M. A., & Miller, G. D. (2011). Dairy Components and Risk Factors for Cardiometabolic Syndrome: Recent Evidence and Opportunities for Future Research. *Advances in Nutrition*, *2*(5), 396–407. <https://doi.org/10.3945/an.111.000646>

Rood, T., Muilwijk, H., & Westhoek, H. (2017). *Food for the circular economy*. PBL Netherlands Environmental Assessment Agency.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Schoina, V., Terpou, A., Papadaki, A., Bosnea, L., Kopsahelis, N., & Kanellaki, M. (2019). Enhanced Aromatic Profile and Functionality of Cheese Whey Beverages by Incorporation of Probiotic Cells Immobilized on Pistacia terebinthus Resin. *Foods*, 9(1), 13. <https://doi.org/10.3390/foods9010013>

Senthil Kumar, R., Naveena, S., Praveen, S., & Yogadharshini, N. (2023). Therapeutic aspects of biologically potent vanillin derivatives: A critical review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 13(7), 177–189. <https://doi.org/10.22270/jddt.v13i7.6159>

Sharma, M., Mann, B., Pothuraju, R., Sharma, R., & Kumar, R. (2022). Physico-chemical characterization of ultrasound assisted clove oil-loaded nanoemulsion: As enhanced antimicrobial potential. *Biotechnology Reports*, 34, e00720. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00720>

Shen, S., Zhang, T., Yuan, Y., Lin, S., Xu, J., & Ye, H. (2015). Effects of cinnamaldehyde on Escherichia coli and Staphylococcus aureus membrane. *Food Control*, 47, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.003>

Shreaz, S., Wani, W. A., Behbehani, J. M., Raja, V., Irshad, M., Karched, M., Ali, I., Siddiqi, W. A., & Hun, L. T. (2016). Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112, 116–131. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.016>

Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold.’ *International Dairy Journal*, 18(7), 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>

Stobaugh, H. C., Ryan, K. N., Kennedy, J. A., Grise, J. B., Crocker, A. H., Thakwalakwa, C., Litkowski, P. E., Maleta, K. M., Manary, M. J., & Trehan, I. (2016). Including whey protein and whey permeate in ready-to-use supplementary food improves recovery rates in children with moderate acute malnutrition: A randomized, double-blind clinical trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 103(3), 926–933. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.124636>

Sun, L., Rogiers, G., & Michiels, C. W. (2021). The Natural Antimicrobial trans-Cinnamaldehyde Interferes with UDP-N-Acetylglucosamine Biosynthesis and Cell Wall Homeostasis in *Listeria monocytogenes*. *Foods*, 10(7), 1666. <https://doi.org/10.3390/foods10071666>

Teplá, J., Šustová, K., Lužová, T., Dostálová, L., Kalhotka, L., & Růžičková, G. (2016). Effect of Some Essential Oils on the Shelf Life of Whey. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 64(1), 177–183. <https://doi.org/10.11118/actaun201664010177>

Tian, R., Han, X., Tian, B., Li, G., Sun, L., Tian, S., Qin, L., & Wang, S. (2023). Effects of covalent binding of different polyphenols on structure, rheology and functional properties of whey protein isolate. *LWT*, 184, 114968. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114968>

Tian, W.-L., Lei, L.-L., Zhang, Q., & Li, Y. (2016). Physical Stability and Antimicrobial Activity of Encapsulated Cinnamaldehyde by Self-Emulsifying Nanoemulsion: Encapsulation of Natural Lipophilic Essential Oils. *Journal of Food Process Engineering*, 39(5), 462–471. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12237>

Tomadoni, B., Cassani, L., Ponce, A., Moreira, M. R., & Agüero, M. V. (2016). Optimization of ultrasound, vanillin and pomegranate extract treatment for shelf-stable unpasteurized strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.024>

Tomoda, K., & Makino, K. (2014). Nanoparticles for transdermal drug delivery system (TDDS). In *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development* (pp. 131–147). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62614-1.00007-7>

Turasan, H., Sahin, S., & Sumnu, G. (2015). Encapsulation of rosemary essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.036>

Ulfman, L. H., Leusen, J. H. W., Savelkoul, H. F. J., Warner, J. O., & van Neerven, R. J. J. (2018). Effects of Bovine Immunoglobulins on Immune Function, Allergy, and Infection. *Frontiers in Nutrition*, 5, 52. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00052>

Wan, S., Liu, Q., Yang, D., Guo, P., Gao, Y., Mo, R., & Zhang, Y. (2023). Characterization of high amylose corn starch-cinnamaldehyde inclusion films for food packaging. *Food Chemistry*, 403, 134219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134219>

Wang, W., & de Mejia, E. G. (2005). A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(4), 63–78. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2005.tb00075.x>

Wei, J., Bi, Y., Xue, H., Wang, Y., Zong, Y., & Prusky, D. (2020). Antifungal activity of cinnamaldehyde against *Fusarium sambucinum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 129(2), 256–265. <https://doi.org/10.1111/jam.14601>

WHO. (2021). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Wilde, P. J. (2019). Improving Emulsion Stability Through Selection of Emulsifiers and Stabilizers. In *Reference Module in Food Science* (p. B9780081005965223378). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22337-8>

Yang, J., Chi, Y., Burkhardt, B. R., Guan, Y., & Wolf, B. A. (2010). Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells: *Nutrition Reviews*®, Vol. 68, No. 5. *Nutrition Reviews*, 68(5), 270–279. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00282.x>

Yang, K., Liu, A., Hu, A., Li, J., Zen, Z., Liu, Y., Tang, S., & Li, C. (2021). Preparation and characterization of cinnamon essential oil nanocapsules and comparison of volatile components and antibacterial ability of cinnamon essential oil before and after encapsulation. *Food Control*, 123, 107783. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107783>

Ye, H., Shen, S., Xu, J., Lin, S., Yuan, Y., & Jones, G. S. (2013). Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food Control*, 34(2), 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.032>

Yossa, N., Patel, J., Millner, P., & Lo, Y. M. (2012). Essential Oils Reduce Escherichia coli O157:H7 and Salmonella on Spinach Leaves. *Journal of Food Protection*, 75(3), 488–496. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-344>

Yuan, W., Teo, C. H. M., & Yuk, H.-G. (2019). Combined antibacterial activities of essential oil compounds against Escherichia coli O157:H7 and their application potential on fresh-cut lettuce. *Food Control*, 96, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.005>

Zhang, C., Pan, L., Ma, J., Yu, Q., Yu, X., Hussain, S., Li, X., Li, Y., Guan, Y., Li, Y., & Xing, F. (2023). Microencapsulation enhances the antifungal activity of cinnamaldehyde during the period of peanut storage. *LWT*, 180, 114657. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114657>

Zhang, M., Fan, L., Liu, Y., & Li, J. (2022). Relationship between protein native conformation and ultrasound efficiency: For improving the physicochemical stability of water-in-oil emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 651, 129737. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129737>

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., & Quek, S. (2016a). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Food Control*, 59, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.032>

- Zhang, Y., Ma, Q., Critzer, F., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2016b). Organic thyme oil emulsion as an alternative washing solution to enhance the microbial safety of organic cantaloupes. *Food Control*, 67, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.032>
- Zhao, C., Chen, N., & Ashaolu, T. J. (2022). Whey proteins and peptides in health-promoting functions – A review. *International Dairy Journal*, 126, 105269. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105269>
- Zhao, R., Fu, W., Chen, Y., Li, B., Liu, S., & Li, Y. (2022). Structural modification of whey protein isolate by cinnamaldehyde and stabilization effect on  $\beta$ -carotene-loaded emulsions and emulsion gels. *Food Chemistry*, 366, 130602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130602>
- Zhao, W., Wang, X., Yang, B., Wang, Y., Li, Z., & Bao, X. (2023). Unravel the regulatory mechanism of Yrr1p phosphorylation in response to vanillin stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02056-8>
- Zhou, L., Zhang, W., Wang, J., Zhang, R., & Zhang, J. (2022). Comparison of oil-in-water emulsions prepared by ultrasound, high-pressure homogenization and high-speed homogenization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 82, 105885. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105885>
- Zhou, S., Sheen, S., Zhao, G., Chuang, S., & Liu, L. (2020). Prediction of Salmonella inactivation in sliced tomato subject to high pressure processing and trans-cinnamaldehyde treatment using selective and non-selective growth media for survival evaluations. *Food Control*, 118, 107441. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107441>
- Zhu, R., Liu, H., Liu, C., Wang, L., Ma, R., Chen, B., Li, L., Niu, J., Fu, M., Zhang, D., & Gao, S. (2017). Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. *Pharmacological Research*, 122, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.019>
- Zhu, Y., Li, C., Cui, H., & Lin, L. (2021). Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. *Food Control*, 123, 107856. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107856>