

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MATERIALES DE SÍLICE MESOPOROSA
BIOINSPIRADOS PARA LA LIBERACIÓN
CONTROLADA DE MOLÉCULAS
NATURALES BIOACTIVAS

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: ESTHER GARCÍA CASADO

TUTOR: ÉDGAR PÉREZ ESTEVE
TUTORA EXTERNA: ANDREA BERNARDOS BAU
TUTOR EXTERNO: PAVEL KLOUČEK

CURSO ACADÉMICO: 2019-2020

VALENCIA, JUNIO 2020

RESUMEN

La actividad antimicrobiana de los componentes de los aceites esenciales (CAEs) es bien conocida. Sin embargo, su alta volatilidad y su potente aroma limitan su aplicación en la formulación de una amplia gama de productos alimenticios. Este estudio tuvo por objetivo desarrollar nuevos sistemas biocompatibles y bioinspirados para la liberación controlada de CAEs y comparar su actividad antimicrobiana frente a la de los compuestos libres. Para esto, se cargaron cuatro CAEs diferentes (carvacrol, timol, cinamaldehído y eugenol) en nanopartículas de sílice mesoporosa, y, posteriormente la superficie de las partículas se funcionalizó con derivados de azúcar para que actuaran como puertas moleculares. Posteriormente se estudió la actividad antibacteriana de los CAEs libres y encapsulados frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados mostraron que en presencia de los estímulos las puertas se "abrieron" y permitieron la liberación de CAEs. También se demostró que la encapsulación en los materiales de sílice mesoporosa bioinspirados mejoró la actividad antimicrobiana de los CAEs libres necesitando de concentraciones más bajas para conseguir el mismo efecto inhibitorio. Esto concluye la eficacia de la encapsulación en la preservación de las sustancias bioactivas y en su liberación en el tiempo y lugar adecuado con la adición de puertas moleculares, superando los principales problemas en la aplicación de los CAEs y mejorando su actuación. En cambio, en la mayoría de los test no se consiguió demostrar una diferencia clara entre los resultados obtenidos de los CAEs en su forma libre y encapsulados en las partículas mesoporosas sin funcionalizar, por lo que la funcionalización para la liberación controlada se presenta como una tecnología ventajosa y necesaria. Por otro lado, se reafirmó la variación de resultados en función del aceite utilizado, su forma de aplicación y el microorganismo objetivo, sugiriendo que para presentar cifras y para optimizar la futura utilización de los CAEs como conservantes hay que realizar estudios concretos según objetivos y condiciones de uso.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, componentes de los aceites esenciales, encapsulación, *Escherichia coli*, puertas moleculares, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The antimicrobial activity of essential oils components (EOCs) is well-known. However, their high volatility and powerful aroma limit their application in the formulation of a wide range of food products. In this study, we aimed the development of new biocompatible and bioinspired systems for the controlled release of EOCs and the comparison of its antimicrobial activity with those of pure compounds. With this purpose, four different EOCs (carvacrol, thymol, cinnamaldehyde and eugenol) were loaded into mesoporous silica nanoparticles, which were then capped with sugar derivatives acting as molecular gates. Then the antibacterial activity of free and encapsulated EOCs was studied against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Results showed that in the presence of the stimuli the gates were "opened" and allowed the release of the EOCs. It was also demonstrated that encapsulation in the bio-inspired capped-mesoporous silica materials improved the antimicrobial activity of EOCs being able to achieve the inhibitory effect in a lower concentration. Therefore, the efficiency of encapsulation process has been proved as much as for the preservation of biomolecules as for its controlled release with the addition of molecular gates, solving the main problems of EOCs and improving their activity. On the other hand, most of the completed tests didn't show differences between the results obtained from the free and the encapsulated but not capped EOCs. For these reasons, functionalization of the particles was confirmed as an advantageous and necessary technology. Furthermore, it was confirmed the variation of results depending on the essential oil type, its application and the target microorganism. This suggests that in order to present figures and for the future application of EOCs as food preservatives, a study must be done for the specific case according to the objectives and conditions to establish the most accurate form of use.

Key words: antimicrobial activity, encapsulation, *Escherichia coli*, essential oil components, molecular gates, *Staphylococcus aureus*.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 8 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 8 |
| 3.1. Materia prima y reactivos | 8 |
| 3.2. Síntesis de las partículas | 9 |
| 3.3. Caracterización de los sólidos | 9 |
| 3.4. Cargado de los aceites esenciales en las MSP | 9 |
| 3.5. Síntesis de las puertas moleculares | 9 |
| 3.6. Funcionalización de las partículas | 9 |
| 3.7. Determinación del contenido de aceite esencial mediante GC | 9 |
| 3.8. Test microbiológicos | 10 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 10 |
| 4.1. Caracterización de los sólidos | 10 |
| 4.2. Cuantificación del aceite liberado mediante análisis cromatográfico | 12 |
| 4.4. Ensayos microbiológicos | 14 |
| 4.4.1. <i>Escherichia coli</i> | 15 |
| 4.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> | 16 |
| 5. CONCLUSIONES | 18 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 19 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. Patrones de difracción de rayos X de los sólidos | 10 |
| FIGURA 2. Isotermas adsorción-desorción del N ₂ | 11 |
| FIGURA 3. Imágenes de los análisis TEM y FESEM de las partículas | 12 |
| FIGURA 4. Curvas de calibrado de los CAEs | 13 |
| FIGURA 5. Ejemplo de cromatograma obtenido tras la digestión de una partícula MCM-Eu con NaOH, permitiendo observar la presencia del pico del Eugenol | 13 |
| FIGURA 6. Ejemplo de cuantificación de las cantidades de eugenol liberado por diferentes lotes de partículas analizadas | 14 |
| FIGURA 7. Cantidades de CAEs liberadas por las partículas | 14 |
| FIGURA 8. Fotografías de las placas de <i>Escherichia coli</i> | 15 |
| FIGURA 9. Fotografías de las placas de <i>Staphylococcus aureus</i> | 17 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA 1. Caracterización textural de las partículas | 11 |
| TABLA 2. Diámetro hidrodinámico de los sólidos medido con DLS y potencial Zeta | 12 |
| TABLA 3. Tabla de CMI de <i>Escherichia coli</i> (EC) | 16 |
| TABLA 4. Tabla de CMI de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA) | 18 |

1. INTRODUCCIÓN

El acceso a una cantidad suficiente de alimentos inocuos y nutritivos constituye un requisito fundamental para la salud humana, siendo la inocuidad de los alimentos la ausencia, o niveles seguros y aceptables, de peligro en los alimentos que puede dañar la salud de los consumidores (UN, 2019).

Aproximadamente un tercio de las partes comestibles de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde o desperdicia, lo que representa alrededor de 1300 millones de toneladas al año y una gran cantidad de recursos desperdiciados. En 2012, las pérdidas se evaluaron alrededor de 936 billones de USD. Esta pérdida de alimentos impacta tanto en la seguridad como en la nutrición y sostenibilidad de los sistemas alimentarios, ya que al reducir la disponibilidad y hacer un uso insostenible de los recursos naturales se condiciona el futuro de la producción de alimentos. Para la reducción de la pérdida de alimentos es importante la mejora de los métodos de producción, distribución y conservación, y de su sostenibilidad con un eficiente desarrollo y utilización de los recursos naturales (FAO, 2018).

La calidad de los alimentos está influenciada por factores físicos, químicos, bioquímicos, y microbiológicos. Controlar estos factores, sobre todo el factor microbiológico, es fundamental para la preservación de los alimentos, ya que la pérdida de alimentos producidos por la acción de los microorganismos se estima en más del 20%. Además, los alimentos alterados pueden presentar un peligro para la salud del consumidor (Lueck, 1980; Saucedo, 2011). Más de 200 enfermedades son transmitidas por los alimentos, generalmente de carácter infeccioso o tóxico, debido a la acción de bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que contaminan los alimentos o el agua de consumo. Se estima que anualmente en el mundo casi 1 de cada 10 habitantes enferma, y 420000 mueren por ingerir alimentos contaminados, siendo el 40% de esta cifra niños menores de 5 años por su mayor vulnerabilidad.

En cuanto a los patógenos que las causan, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli enterohemorrágica* son los más comunes, afectando a millones de personas con posibles consecuencias graves o mortales. La infección por *Listeria* tiene una frecuencia relativamente baja, pero también es conocida por sus consecuencias como una de las infecciones más graves. Otra infección importante es causada por *Vibrio cholerae*. Para el tratamiento de estas infecciones causadas por bacterias son esenciales los antimicrobianos, no obstante, ha habido un uso de ellos excesivo o erróneo por parte de la medicina veterinaria y humana que se ha vinculado con la aparición y propagación de bacterias resistentes, que producen ineficacia a la hora de tratar enfermedades infecciosas en animales y humanos (OMS, 2019). Por ello, se debe tratar de minimizar el desarrollo y propagación de los microorganismos resistentes frente a los medicamentos existentes, y, al mismo tiempo intentar desarrollar nuevas opciones de tratamiento (OMS, 2014).

Los alimentos pueden haber sufrido alguna contaminación con componentes naturales del propio alimento, toxinas producidas por alguna bacteria, productos derivados del procesamiento y de la contaminación ambiental, y contaminantes que resultan de su manipulación (Barboza-Corona *et al.*, 2004). También es posible que contengan aditivos alimentarios, sustancias esenciales para preservar la salubridad de los alimentos elaborados y mantenerlos en buenas condiciones durante su transporte, pues mantienen o mejoran su inocuidad, frescura, sabor, textura o aspecto (OMS, 2018). Dentro de los tipos de aditivos encontramos los conservadores, colorantes, antioxidantes, emulsionantes, saborizantes, acidulantes, edulcorantes y humectantes (Barboza-Corona *et al.*, 2004). Los conservantes pueden ralentizar el deterioro de los alimentos causado por los microorganismos, mantener la calidad de los alimentos y evitar la contaminación que puede provocar enfermedades de origen alimentario (OMS, 2018). Estos pueden ser químicos, entre los que se encuentran el benzoato de sodio, el ácido sódico, sulfitos, nitritos, nitratos, peróxido de hidrógeno y cloruro de sodio. A pesar de ser los más utilizados en alimentos, existen diversos de origen natural provenientes de plantas y microorganismos, que pueden ser usados como bioconservadores (Barboza-Corona *et al.*, 2004).

Los antimicrobianos de origen natural son considerados como seguros, aunque en pocos casos se han utilizado para un uso real en productos alimenticios, por lo que todos aquellos que desearan utilizarse deberían ser estudiados toxicológicamente. La legislación en muchos países

tiene intención de hacer extensivo el uso de cantidades mínimas de conservadores de origen químico para la próxima década, con esta modificación legislativa hacia estrategias no químicas se favorecería las probabilidades y ventajas económicas de los conservadores de origen natural (Sauceda, 2011). Además, hay una creciente demanda de los consumidores por productos seguros y naturales, sin conservantes químicos, la cual ha dirigido las investigaciones a la evaluación de la viabilidad de las técnicas de preservación suave o de sustancias naturales alternativas como conservantes, que aseguren la calidad microbiana y la seguridad de los productos mientras mantienen sus propiedades nutricionales y organolépticas. Esta tendencia hacia las sustancias naturales alternativas ha renovado el interés científico por los aceites esenciales, que han sido sugeridos para la prevención de la transmisión de cepas patógenas resistentes y perjudiciales (Goñi *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales son líquidos oleosos y volátiles, ampliamente utilizados como saborizantes en alimentos (Burt, 2004; Goñi *et al.*, 2009). Constituidos de mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos, son compuestos olorosos y muy solubles en alcohol (Sauceda, 2011). Sus vapores son conocidos por sus propiedades antimicrobianas desde el siglo 4 a.C, y ya en 1960 se investigó su potencial. Más recientemente se ha demostrado que el uso de los componentes de los aceites esenciales (CAEs) tiene efectos antimicrobianos contra bacterias y hongos, y muchas aplicaciones han sido identificadas, incluso en el área alimentaria (Laird & Philips, 2011). Actualmente son reconocidos por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, insecticidas y antioxidantes (Kordali *et al.*, 2005; Pezo, Salafranca, & Nerin, 2006; Goñi *et al.*, 2009). Aunque la composición puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas (Smid & Gorris, 1999; Sauceda, 2011). En general, los aceites esenciales con propiedades antibacterianas más potentes contra patógenos alimentarios contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el carvacrol, eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil) fenol) y timol (Burt, 2004). La actividad antimicrobiana ha sido atribuida a sus componentes fenólicos, que interactuarían con las membranas celulares de los microorganismos causando la fuga de iones y contenido citoplasmático, y produciendo una rotura de las células (Burt, 2004; Suntres, Coccimiglio, & Alipour, 2015; Ruiz-Rico *et al.*, 2017). Esta actividad los presenta como una alternativa a pesticidas sintéticos y conservantes de la comida (Bakkali *et al.*, 2008; Nedorostova *et al.*, 2009; Antunes & Cavaco, 2010; Janatova *et al.*, 2015).

Los aceites esenciales más utilizados se aíslan de las plantas que los contienen mediante métodos físicos, y se derivan del mevalonato, el metil-eritritol y las rutas del ácido shikímico, cada uno produciendo diferentes compuestos (Baser & Buchbauer, 2010; Carocho, 2016). Se encuentran en la mayoría de plantas ampliamente distribuidos, pudiendo extraerse de diferentes partes de estas como las hojas, tallos, flores, raíces y frutos. Para su extracción existen diferentes métodos, siendo los convencionales por arrastre de vapor y con disolventes, aunque la elección del método depende de la finalidad para la que son requeridos (Peredo *et al.*, 2009).

De los 300 aceites esenciales conocidos de diferentes plantas, algunos han sido utilizados en alimentos debido a su actividad antimicrobiana, incluso algunos han logrado la etiqueta GRAS (Generally Recognized as Safe) en los Estados Unidos. Ejemplos de los CAEs utilizados son los del orégano, el timol, el carvacrol, el clavo y el aceite de canela. Algunos de los alimentos a los que se han aplicado son la carne, pescado, productos lácteos, verduras, arroz y fruta (Burt, 2004; Carocho, 2016). Además, también se han aplicado en la tecnología del empaquetado, utilizando películas impregnadas con carvacrol y timol (Carocho, 2016).

Podemos encontrar diversos estudios sobre la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales contra distintos tipos de microorganismos. En un estudio realizado por Helander *et al.* (1998), *E. coli* y *S. typhimurium* fueron inhibidos por carvacrol, timol y cinamaldehído. Más tarde, Pitarch (2000) comprobó la eficacia de los mismos contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Además, Oussalah *et al.* (2007) testaron 28 aceites esenciales, de los cuales la mayoría inhibían a *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Por otro lado, Pei *et al.* (2009) inhibieron *E. coli* con eugenol, cinamaldehído, timol y carvacrol, y Palaniappan & Holley (2010) a *E. coli* resistente a los antibióticos con carvacrol, cinamaldehído y timol. En conclusión, todos ellos con resultados consistentes y puntos en común entre ellos.

A pesar de la alta eficiencia de los aceites contra patógenos alimentarios y microorganismos de descomposición en los estudios *in vitro* (Chorianopoulos et al., 2004; Fisher & Phillips, 2006; Goñi et al., 2009), para conseguir el mismo efecto en el alimento es necesario utilizar concentraciones mayores (Burt, 2004; Goñi et al., 2009). Varios estudios han observado el efecto de los alimentos en la resistencia microbiana a los CAEs, sugiriendo posibles causas: la mayor disponibilidad de nutrientes en los alimentos en comparación con los medios de laboratorio, que puede permitir que las bacterias reparen las células dañadas más rápido (Gill et al., 2001; Burt, 2004); las propiedades intrínsecas de los alimentos (contenido de grasas/proteínas/agua, antioxidantes, conservantes, pH, sal y otros aditivos) y los determinantes extrínsecos (temperatura, envasado al vacío/gas/aire, características de los microorganismos) (Shelef, 1983; Tassou et al., 1995; Burt, 2004). Por otro lado, la sensibilidad de las bacterias al efecto antimicrobiano de los CAEs parece aumentar con la disminución del pH de los alimentos al aumentar la hidrofobicidad de estos, permitiendo que se disuelvan más fácilmente en los lípidos de la membrana celular de las bacterias (Juven et al., 1994; Burt, 2004). También aumentarían su poder inhibitorio con la temperatura de almacenamiento y la cantidad de oxígeno dentro del envase (Hao et al., 1998; Burt, 2004).

El principal problema de la aplicación directa de los CAEs en alimentos radica en que presentan las siguientes limitaciones: fuertes propiedades sensoriales (Nostro & Papalia, 2012; Medina, 2017), degradabilidad (Turek & Stintzing, 2013; Medina, 2017), potencial toxicidad (Smith et al., 2005; Medina, 2017), alta volatilidad (Majeed et al., 2015; Medina, 2017) y baja solubilidad en agua (Burt, 2004; Medina, 2017). Estas dos últimas hacen que se pierda esta actividad antimicrobiana antes de poder ser efectivos (Laird & Phillips, 2011; Janatova et al., 2015). Como solución a estos problemas se propone la encapsulación, ya que diversos estudios muestran resultados prometedores consiguiendo una inhibición similar para los ensayos *in vitro* y los realizados directamente en comida, pudiendo utilizar concentraciones menores en comida a las que se necesitan con el compuesto libre.

La encapsulación es un proceso en el cual se introducen sustancias bioactivas, como son los aceites esenciales, en el interior de materiales, para mejorar su incorporación en alimentos y superar las limitaciones comentadas anteriormente (Ruiz-Rico, Pérez & Fuentes, 2018). Es decir, es un método cuyos principales objetivos son la protección y preservación de la efectividad de sustancias bioactivas (Kailasapathy, 2009; Prado et al., 2011; Park, Barton, & Pendleton, 2012; Janatova et al., 2015). La preservación puede conseguirse mediante distintas técnicas de encapsulación, manteniendo la actividad de las sustancias por aislamiento total o parcial del entorno hasta su liberación en el tiempo y lugar adecuados (Champagne and Fustier, 2007; Borgogna et al., 2010; López et al., 2011).

Existe una amplia oferta de técnicas de encapsulación, lo cual permite la adaptabilidad de los laboratorios e industrias, pudiendo encapsular de forma sencilla y asequible (Tolsà, 2018). Este método también proporciona nuevos ingredientes con propiedades únicas, posibilidad de enmascaramiento o preservación de aromas y sabores, y reducción de problemas de aglomeración y volatilidad de líquidos, mejorando así la dosificación de aditivos y, por lo tanto, la relación costo-efectividad (Gouin, 2004; López et al., 2011). A pesar de la existencia de diferentes técnicas, todas ellas comparten las premisas básicas de la encapsulación, que son: la formación del material barrera envolviendo la sustancia, la seguridad de que no haya fugas que deterioren el producto encapsulado, y la seguridad de que compuestos indeseados no entren al interior de la cápsula y reaccionen o degraden el compuesto (Tolsà, 2018).

Tradicionalmente los sistemas de encapsulación compatibles con los alimentos se han basado en carbohidratos, proteínas o lípidos (Fathi et al., 2012; Wang et al., 2012; Fathi et al., 2014; Pérez-Esteve et al., 2015), pero estos sistemas exhiben una baja estabilidad de la estructura, falta de control en la velocidad de liberación de los aminoácidos, o un bajo efecto en la protección de la sustancia durante su paso a través del tracto gastrointestinal. En contraposición, las partículas mesoporosas de sílice (MPS) son más estables, rígidas y biocompatibles, resistentes a la degradación enzimática, ataques microbianos, y a la desnaturalización por el pH o la temperatura (Arcos & Vallet-Regí, 2013; Pérez-Esteve et al., 2015). Existen diferentes tipos de MSP, las cuales difieren en el tamaño, el cual puede variar desde micro a nano, en la morfología y en el tamaño de poro, aunque lo habitual es que este oscile entre los 2-10 nm. Pese a estas diferencias, todas ellas muestran una superficie específica grande, teniendo una alta capacidad

de carga, porosidad homogénea, alta inercia y facilidad de funcionalización (Bernardos & Kourimská, 2013). Las MSP muestran propiedades fisicoquímicas excelentes para actuar como soportes en la encapsulación y liberación en alimentos, ya que son compatibles con las matrices alimentarias y no influyen en la apariencia, sabor, textura, sensación en la boca o vida útil. Son estructuras de dióxido de silicio, un componente químico generalmente reconocido como seguro, que están organizadas para crear poros, con lo cual pueden albergar un gran número de mesoporos y, por tanto, un gran volumen de poro. Esta organización permite que puedan ser funcionalizadas con moléculas orgánicas que actúan como puertas moleculares para conseguir la liberación controlada de las sustancias mediante la aplicación de un estímulo (Ruiz-Rico, Pérez & Fuentes, 2018). De todas las MSP, las partículas conocidas como MCM-41, que poseen tamaños de poro de entre 2-3 nm (Pérez-Esteve *et al.*, 2015), son unas de las más utilizadas en procesos de encapsulación de moléculas bioactivas en alimentos.

La funcionalización de las MPS resulta un campo de investigación muy prometedor (Coll *et al.*, 2013). Su uso garantizaría la llegada de las sustancias encapsuladas al punto de acción (Aznar *et al.*, 2016). Entre las moléculas encapsuladas se podrían citar agentes citotóxicos, proteínas, fragmentos de ADN y ARN, enzimas, vitaminas, compuestos antioxidantes, antimicrobianos... (Bernardos *et al.*, 2009; Bernardos *et al.*, 2010; Shin, Park, & Lee, 2019). En cuanto al estímulo que se aplica, este funciona provocando una alteración en la composición y estructura de las cápsulas, de manera que liberan su contenido (Seid-Madhi *et al.*, 2008). Diversos estudios han propuesto estímulos que han conseguido esta alteración, como son el pH, condiciones redox del medio, y la luz que desencadena la apertura de los poros (Johansson *et al.*, 2008; Aznar, Martínez-Mañez & Sancenón, 2009; Bernardos *et al.*, 2009; Cotí *et al.*, 2009). También se ha utilizado la ruptura de los enlaces disulfuro en los sistemas de base molecular (Fujiwara *et al.*, 2006; Bernardos *et al.*, 2009) y redes poliméricas (Liu *et al.*, 2008; Liu, Zhang, & Feng, 2009; Bernardos *et al.*, 2009), y estímulos externos alternativos como la temperatura (Fu *et al.*, 2003; Bernardos *et al.*, 2009) o la presencia de ciertos iones (Coll *et al.*, 2007; Bernardos *et al.*, 2009). Otro estudio realizado también sugiere que la degradación enzimática de estos sistemas es un adecuado protocolo (Bernardos *et al.*, 2009).

Desarrollando esta idea anterior junto con la biomimética, que es un campo interdisciplinario en el que se aplican principios químicos y biológicos a la síntesis de materiales o sistemas sintéticos que tratan de imitar procesos biológicos (Bengisu, 2018), se ha pensado en utilizar como modelo las interacciones entre plantas y patógenos para el funcionamiento de las partículas funcionalizadas. En estas interacciones, las enzimas, ya sean provenientes de hongos, bacterias o enzimas vegetales de la familia de los glucósidos hidrolasas como la amilasa o la mirosinasa, provocan que la planta libere compuestos volátiles (Rojo *et al.*, 2005; Van den Brink & De Vries, 2011; Bagheri, Khodarahmi & Mostafaie, 2014). Por tanto, al utilizar sacáridos específicos como puertas moleculares, estos podrían imitar el mecanismo natural de la defensa de la planta. Estos sistemas presentarían un gran potencial para su aplicación en las industrias alimentaria, agrícola, cosmética y farmacéutica al permitir la encapsulación de los CAEs con un suministro controlado con precisión para su uso como antimicrobianos naturales (Bernardos & Kourimská, 2013).

La utilización de la técnica de nanoencapsulación con aceites esenciales ha sido probada con resultados prometedores en diversos estudios como la utilización de nanopartículas MPS recubiertas con lisozima contra la bacteria *Escherichia coli* (Li & Wang, 2013), nanopartículas MPS modificadas con vancomicina contra bacterias grampositivas patógenas (Qi, Li, Yo & Wang, 2013), o funcionalizadas con ácidos grasos con relativa actividad antimicrobiana (Pedziwiatr-Werbicka *et al.*, 2014). También han sido estudiados recientemente anclados a la superficie de tres tipos diferentes de partículas (sílica-fumed, MCM-41 y amorphous silica), contra patógenos alimentarios como *Listeria innocua* y *Escherichia coli*, concluyendo que tenían mayor efecto que libres y que eran un efectivo sistema antimicrobiano (Ruiz-Rico *et al.*, 2017). Y, finalmente, la encapsulación con nanopartículas MCM-41 de los aceites esenciales que vamos a estudiar también ha sido probada contra *Aspergillus niger* en varios estudios. En el primero, las sustancias encapsuladas mostraron una actividad antifúngica mayor que la misma sustancia en estado puro después de 14 días en la mayoría de los casos probados (Janatova *et al.*, 2015). Y en el segundo, los resultados probaron que tras 30 días los CAEs encapsulados seguían inhibiendo el crecimiento del hongo, un tiempo mayor que sin la técnica de encapsulación o encapsulados en β -CD, otro tipo de sistema de encapsulación (Bernardos *et al.*, 2015).

Pese a estos avances, no se han realizado hasta el momento estudios en los que se evalúe el efecto de puertas moleculares bioinspiradas en la mejora de la actividad antimicrobiana de los CAEs encapsulados en partículas mesoporosas de óxido de silicio.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo de este estudio fue diseñar nuevos sistemas de encapsulación biocompatibles y bioinspirados, fáciles de preparar y de bajo coste, de distintos componentes de aceites esenciales -carvacrol (Car) del orégano, el cinamaldehído (Cin) de la canela, el eugenol (Eu) del clavo, la nuez moscada o la canela, y el timol (Th) del tomillo o el orégano- capaces de mejorar la actividad antimicrobiana de los mismos frente a dos tipos de microorganismos: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

La investigación fue dirigida a la determinación de las concentraciones de los CAEs necesarias para la inhibición de bacterias patógenas, y de la variación según el tipo de aceite, bacteria, y forma de aplicación. Las formas en las que se estudiaron los CAEs fueron la forma pura, encapsulada en nanopartículas MCM-41 sin funcionalizar (MCM), y funcionalizada con puertas de maltodextrina (MDX).

Primero, se determinará el método de cuantificación del aceite en el interior de la partícula, que proporcione de la forma más exacta posible las cantidades de aceite que liberan las cápsulas en los test, y permita calcular las cantidades mínimas inhibitorias de cada uno para cada bacteria. Este estudio se llevará a cabo mediante cromatografía de gases, ya que se ha convertido en el método dominante para el análisis de aceites esenciales. Esto es debido a la complejidad de las muestras, que debe ser desenmarañada por algún tipo de separación, antes de que los componentes de la muestra se puedan medir y caracterizar. Por ello, GC proporciona el mayor poder de resolución para la mayoría de estas mezclas volátiles (Baser & Buncheauer, 2010).

Después se probará la eficacia de las sustancias en las tres formas descritas y a diferentes concentraciones contra bacterias relacionadas con el deterioro de alimentos y enfermedades alimentarias: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El test se realizará en placas de microdilución, donde se examinará el crecimiento de colonias y las concentraciones en las que no se produzca, determinando las concentraciones mínimas inhibitorias.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materia prima y reactivos

Esta investigación fue llevada a cabo en dos laboratorios diferentes, siendo la primera parte de síntesis de partículas, cargado de aceites esenciales y adición de puertas llevada a cabo en la Universitat Politècnica de València. Los aceites esenciales utilizados en esta investigación fueron obtenidos mediante la empresa Sigma-Aldrich (Madrid, España), y los reactivos y disolventes fueron: dicloroetano, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y tetraetilortosilicato (TEOS) obtenidos mediante la empresa Sigma-Aldrich (Madrid, España); hidróxido de sodio (NaOH) de Scharlau (Barcelona, España).

La investigación llevada a cabo para elaborar un método de cuantificación del aceite esencial encapsulado en las partículas fue en la Czech University of Life Sciences. Los aceites esenciales utilizados fueron los cuatro mencionados anteriormente de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), y los reactivos y disolventes fueron: n-Hexane de VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Francia); octano de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania); ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) de Lach-Ner (Neratovice, República Checa); Thiazolyl blue de Carl Roth (Karlsruhe, Alemania).

3.2. Síntesis de las partículas

La síntesis de las nanopartículas MCM-41 se realizó según un protocolo utilizado por Lai *et al.*, (2003). Para ello se diluyó 1 gramo de CTAB en 480 mL de agua, agitando a temperatura ambiente, y se añadieron 0,28 gramos de NaOH 2M disueltos en 3,5 mL de agua, ajustando la

temperatura a 80 °C. A continuación, se agregaron 5 mL de TEOS gota a gota y se agitó a esa temperatura durante 2 horas para formar precipitados blancos. Tras este tiempo se centrifugó y lavó varias veces hasta alcanzar un pH de 7. Finalmente, las partículas obtenidas se secaron a 80 °C durante 24 horas y calcinaron a 550 °C en atmósfera oxidante durante 5 horas.

3.3. Caracterización de los sólidos

Para verificar que la síntesis, cargado y funcionalización de los materiales fue la correcta, así como que el cargado y la funcionalización no habían modificado las características estructurales de los materiales, se utilizaron diferentes técnicas de caracterización.

En primer lugar, mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) se caracterizó la morfología y el tamaño de las partículas. Para ello se utilizó un microscopio Zeiss Ultra 55 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania) trabajando en modo de electrones secundarios. Previamente a las observaciones, las muestras se espolvorearon sobre una cinta de carbono colocada previamente sobre los portaobjetos del equipo. Para visualizar la porosidad de los materiales sintetizados se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEM-1010 (JEOL Europe SAS, Croissy-sur-Seine, Francia). La preparación de la muestra se realizó suspendiendo entre 0,1-1,0 mg de nanopartículas en 1 mL de dicloetano puro, aplicando ultrasonidos durante 15 minutos con un baño de ultrasonidos para romper cualquier tipo de agregado. Posteriormente, varias gotas de 5 μ L la suspensión se colocaron directamente sobre una rejilla de níquel recubierta con una película de carbono y se dejó secar durante media hora. La porosidad de la muestra también se caracterizó por difracción Rayos-X mediante un difractómetro Bruker AXS D8 Advance (Bruker, Coventry, Reino Unido), utilizando radiación Cu-K α . El haz de electrones se filtró varias veces utilizando una ventana de divergencia de 0,2 mm a la salida del emisor de rayos X, una ventana de dispersión de 3 mm y ventana del detector de 1 mm. Antes de cada uno de los análisis, aproximadamente 200 mg de los sólidos preparados fueron molturados y colocados cuidadosamente en el soporte para muestras del equipo. El programa de barrido utilizado se configuró de la siguiente manera: $0.73^\circ < 2\theta < 10^\circ$, con un paso de $0,04^\circ/\text{paso}$, 3 segundos/paso, dando lugar a un tiempo de análisis de 11 minutos. Por otro lado, se determinó la estructura porosa de las partículas mediante las isothermas de adsorción y desorción de N₂, las cuales se registraron con un analizador de sorción automático Micromeritics ASAP 2010 (Estados Unidos). Tras insertar cada una de las muestras en el equipo, el primer paso fue desgasificarlas a 120 °C, aplicando vacío durante toda la noche. Posteriormente, se iniciaron los ciclos de adsorción-desorción de nitrógeno, trabajando a presiones relativas entre 0 y 1 (P/P₀). A partir de los datos de sorción en el rango de baja presión se calcularon las áreas de superficie específicas utilizando el modelo de Brunauer–Emmett–Teller (BET), y los tamaños y volúmenes de poro mediante el modelo de Barrett-Joyner-Halenda (BJH). En cuanto a la determinación de distribución del tamaño de partícula y potencial zeta, ambos parámetros se midieron con el instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Previamente a las determinaciones, los nanomateriales se dispersaron en agua destilada ajustada a pH 7 a una concentración de 1 mg/mL y se sonicaron durante 2 minutos para evitar la agregación. Posteriormente, 1 mL de dispersión se colocó en cubetas de 3mL de 4 caras transparentes o en celdas capilares para las determinaciones de distribución de tamaño de partícula o potencial zeta, respectivamente. Los valores de distribución de tamaño de partícula se determinaron a partir de valores de movilidad de partícula aplicando el software del equipo (Zetasizer Nano software v4.10).

3.4. Cargado de los aceites esenciales en las MSP

El cargado de los aceites esenciales se consiguió mediante la técnica de adsorción por vapor, en la cual se mezcla el aceite esencial y las partículas en un vial cerrado en proporción 1:1. Los viales con las diferentes mezclas se introdujeron en el horno a 40 °C durante 24 horas, siendo continuamente agitados mediante un agitador orbital.

3.5. Síntesis de las puertas moleculares

Para la síntesis de los derivados de maltodextrina (MDX) se mezclaron 5,4 gramos de maltodextrina con 250 mL de etanol y 5,85 mL 3-aminopropiltriétoxilano. La mezcla fue agitada 24 horas a temperatura ambiente y, posteriormente, calentada a 60 °C durante 30 minutos. De

esta forma el disolvente se evaporó a presión reducida para dar lugar al derivado de maltodextrina seco.

3.6. Funcionalización de las partículas

Una vez sintetizada la puerta molecular, se suspendieron 200 mg de MCM-41 cargada con aceite esencial (ver sección 3.4) en 25 mL de agua y se añadió la misma cantidad del derivado de maltodextrina (ver sección 3.5). Después, la mezcla se dejó agitando durante 5,5 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los sólidos obtenidos fueron lavados varias veces mediante centrifugación y, finalmente, secados a 40 °C durante 12 horas.

3.7. Determinación del contenido de aceite esencial mediante GC

Para determinar la cantidad de aceite esencial contenido en las partículas, antes y después de la funcionalización con el derivado de maltodextrina, se utilizó el cromatógrafo de gases modelo 7890A de Agilent Technologies (Santa Clara, EUA), integrado por un inyector frontal automático, una columna HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox Agilent 19091S-433 30 m x 250 µm x 0.25 µm, un horno de temperatura controlada, y un detector de ionización de llama. Las condiciones de uso fueron las siguientes: inyección con aguja de 10 µL a un volumen de 1 µL y una velocidad de 6000 µL/min; temperatura del horno desde 100 °C durante 1 minuto y 20 °C/min hasta 200 °C durante 4 minutos; tiempo de retención por muestra de 10 minutos; calentador del detector a 250 °C con flujo de H₂ de 30 mL/min, flujo de aire de 400 mL/min y flujo de gas auxiliar de 25 mL/min. Para la adquisición de datos se utilizó el software GC ChemStation Rev. B.04.02.

A la hora de realizar el análisis de las partículas, estas tuvieron que ser sometidas a una extracción forzada con hexano y una posterior neutralización. Para ello, a 1 mg de muestra se le añadieron 500 µL de hexano y se agitó. Después, fueron añadidos 100 µL de NaOH 10M, que es la cantidad mínima que permitía disolver las partículas, y se agitó. Por último, se neutralizó con HCl 35%, debido a que el pH básico demostró mediante análisis que daba valores mucho menores de aceite esencial y el efecto pudo ser contrarrestado con la neutralización de la base. Después de agitar bien la mezcla, se usaron 100 µL del líquido obtenido en la parte superior del vial para el análisis cromatográfico. Las cantidades de aceite esencial encapsulado se determinaron comparando la señal de cada análisis, con las señales obtenidas en rectas de calibrado de cada uno de los compuestos de aceites esenciales.

3.8. Test microbiológicos

La capacidad antimicrobiana de los CAEs libres, cargados en nanopartículas mesoporosas (MCM-#) o en MSP funcionalizadas con maltodextrina (MDX-#), se determinó por el método de microdilución en placas de multipocillos. Para ello la placa de 96 multipocillos se dividió en columnas, cada una correspondiente a una de las sustancias estudiada, y por filas, cada una correspondiente a una concentración, que se ordenan de modo decreciente: 1024, 512, 256, 128, 64, y 32 µg de aceite puro/mL de medio. El medio utilizado fue Mueller-Hinton Broth de Oxoid (Brno, República Checa). Para conseguir estas concentraciones se utilizaron los resultados obtenidos en la determinación de aceite esencial contenido en las partículas, a partir de los cuales se obtuvo un porcentaje en peso que indica la cantidad de aceite. Dividiendo la concentración deseada entre el porcentaje, se calculó la cantidad de partículas necesarias para conseguir la primera concentración (1,024 mg/mL) para 1 mL de medio. Se homogeneizó esta mezcla y se colocaron 200 µL en el primer pocillo de su columna correspondiente, y 100 µL de medio en el resto de pocillos, es decir, de la segunda fila hacia abajo. La dilución se realizó depositando 100 µL de la mezcla del primer pocillo en el segundo, se homogeneizó y se realizó la misma operación entre en el segundo pocillo y el tercero, y así consecutivamente hasta llegar al último pocillo. Para que la cantidad de solución sea la misma en la última fila que en el resto debemos desechar 100 µL.

Una vez dosificados los aceites esenciales libres o encapsulados a las diferentes concentraciones de estudio en los pocillos correspondientes, se inocularon con las bacterias. El inóculo se preparó mediante el método de microdilución en caldo de EUCAST (2003), en el cual se utiliza una concentración de 0,5 unidades McFarland, que corresponde a 1,5x10⁸ UFC/mL. Esta concentración se inoculó mediante un pin replicador y se obtuvieron unas concentraciones finales de 10⁶ UFC/mL de E. coli o S. aureus en cada uno de los pocillos.

Posteriormente las placas se incubaron 12 horas a 37 °C, tras lo cual se produjo el crecimiento de las colonias bacterianas. Las placas con crecimiento bacteriano fueron sometidas a un examen visual y a un ensayo colorimétrico MTT, añadiendo el reactivo Thiazolyl blue de Carl Roth (Karlsruhe, Alemania). El reactivo se diluyó previamente para conseguir la concentración 600 $\mu\text{L/L}$, y se añadieron 20 μL en cada pocillo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de los sólidos

Los sólidos preparados (MCM, MCM-#, MDX-#) fueron caracterizados mediante técnicas estándar. En primer lugar, se obtuvieron los patrones de difracción de Rayos X de polvo de las nanopartículas tal y como se prepararon (MCM), calcinadas, cargadas con eugenol (MCM-Eu), y funcionalizadas con maltodextrina (MDX-Eu) (FIGURA 1). Los patrones de las MPS tal y como se prepararon (FIGURA 1, curva a) presentan cuatro reflexiones de ángulo bajo, típicas de una matriz ordenada hexagonal que pueden categorizarse como picos de Bragg (100), (110), (200) y (210). La condensación de los grupos de silanoles durante la etapa de calcinación se refleja claramente en el cambio significativo del pico (100) a valores superiores de 2 θ (FIGURA 1, curva b). La existencia del pico de reflexión (100) en el patrón de difracción de la MCM-41 cargada con Eugenol (FIGURA 1, curva c) y MCM-41 cargada con Eugenol y funcionalizada con el derivado de maltodextrina (FIGURA 1, curva d) demuestra que los procesos de carga y funcionalización no alteraron la estructura mesoporosa 3D de los sólidos.

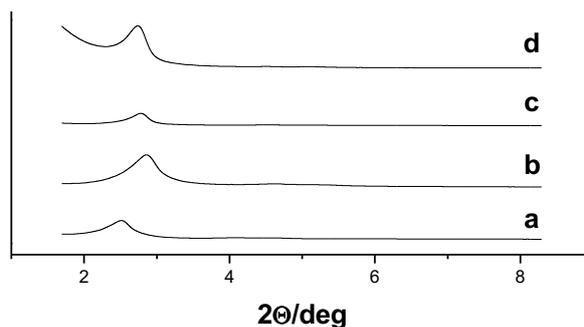


FIGURA 1. Patrones de difracción de Rayos X los sólidos: (a) MCM, (b) MCM calcinados, (c) MCM-Eu, (d) MDX-Eu.

Las isothermas de adsorción-desorción del N_2 del material MCM-41 calcinado (FIGURA 2a) exhiben una curva típica de estos sólidos mesoporosos, que consiste en una etapa de adsorción a un valor intermedio de presión relativa ($P/P_0=0,1-0,3$). Esta curva corresponde a una isoterma de tipo IV, en la cual el paso observado trata con la condensación de nitrógeno dentro de los mesoporosos. La ausencia de un ciclo de histéresis en este intervalo, y la distribución estrecha de los poros BJH sugieren la existencia de mesoporosos cilíndricos uniformes (diámetro de poro de 2,4 nm y volumen de poro de 1,1 cm^3/g calculado mediante el modelo BJH en la rama de adsorción de la isoterma). La aplicación del modelo BET permitió calcular un valor de 825 m^2/g de superficie total específica. Además de este paso de adsorción asociado con los mesoporosos generados por micelas de surfactante, aparece una segunda característica en la isoterma a una presión relativa alta ($P/P_0>0,8$). Esta adsorción corresponde con el llenado de los huecos grandes entre las partículas, y, por tanto, debe considerarse como una porosidad de tipo textural. En este caso, las curvas muestran un ciclo de histéresis H1 característico y una amplia distribución del tamaño de poro.

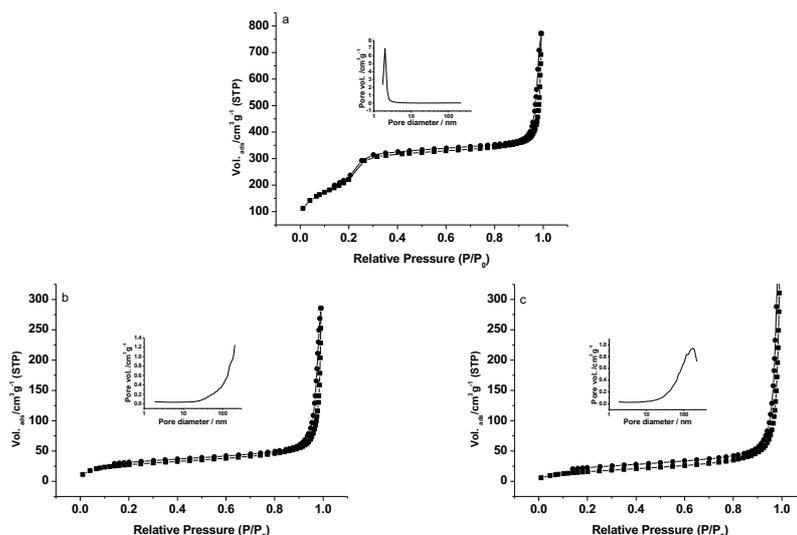


FIGURA 2. Isothermas adsorción-desorción del N₂ de (a) MCM, (b) MCM-Eu y (c) MDX-Eu. Las inserciones de cada gráfico muestran la distribución del tamaño de poro de los sólidos.

Las isothermas de adsorción-desorción del N₂ de MCM-Eu y MDX-Eu son las típicas de los sistemas mesoporosos con los mesoporos prácticamente llenos (FIGURA 2b y 2c). En consecuencia, los valores de volumen adsorbido de N₂ y de área superficial (TABLA 1) son relativamente muy bajos. De hecho, estos sólidos muestran curvas planas cuando se comparan (a la misma escala) con los del material original de MCM-41, indicando un bloqueo significativo de los poros y la posterior ausencia de una mesoporosidad apreciable.

TABLA 1. Caracterización textural de las partículas: valores de superficies específicas BET, volúmenes y tamaños de poro calculados a partir de las isothermas de adsorción-desorción de N₂ para materiales seleccionados. ^a Los volúmenes y tamaños de poro solo se asocian con mesoporos intraparticulares.

^b Tamaños de poro estimados utilizando el modelo BJH aplicado en la rama de adsorción de la isoterma.

| | S _{BET} | Volumen de poro ^a | Tamaño de poro ^{a,b} |
|--------|---------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | (m ² /g) | (cm ³ /g) | (nm) |
| MCM | 825 | 1.1 | 2.4 |
| MCM-Eu | 101.5 | 0.41 | ---- |
| MDX-Eu | 67.7 | 0.59 | ---- |

Los estudios de la dispersión de luz dinámica (DLS) para los sólidos MCM, MCM-Eu y MDX-Eu. Los resultados se presentan en la TABLA 2. También se llevaron a cabo mediciones del potencial Zeta (TABLA 2). El sólido MCM al descubierto exhibió un potencial Zeta negativo que cambió a positivo después de la funcionalización con maltodextrina.

TABLA 2. Diámetro hidrodinámico de los sólidos medido con DLS y potencial Zeta.

| | Diámetro hidrodinámico de la partícula | Potencial Zeta |
|--------|--|----------------|
| | (nm) | (mV) |
| MCM | 105±2 | -39.5±0.9 |
| MCM-Eu | 108±3 | -40.0±0.9 |
| MDX-Eu | 174±8 | 42±2 |

La presencia de la estructura mesoporosa en la estructura final de los sólidos funcionalizados también se confirmó a partir de los análisis microscopía electrónica de transmisión (TEM), en los que los canales típicos de la matriz MCM-41 se visualizan como rayas alternadas en blanco y negro (FIGURA 3). Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) muestran que los materiales preparados a partir de sólidos MCM se obtienen como partículas esféricas con diámetros de aproximadamente 100 nm (FIGURA 3).

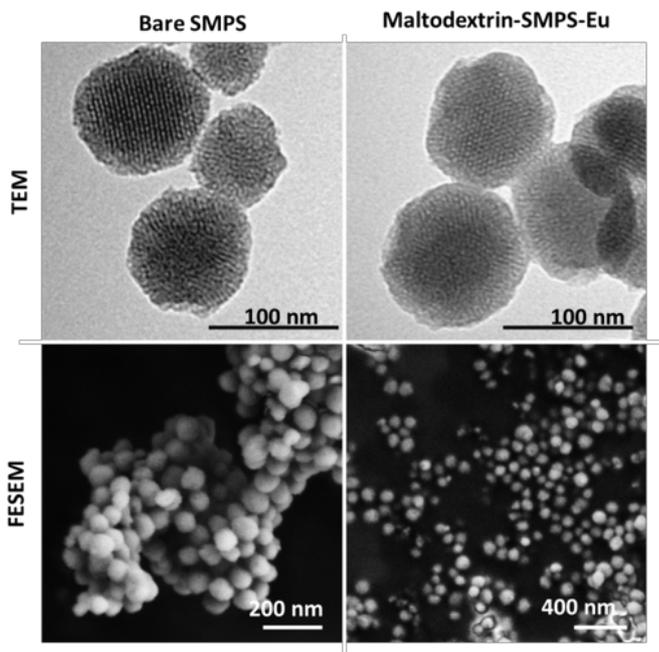


FIGURA 3. Imágenes de los análisis TEM y FESEM de las partículas, (izquierda) MCM al descubierto (derecha) MDX-Eu, mostrando la típica forma y estructura de poros de la matriz de los sólidos MCM-41.

4.2. Cuantificación del aceite liberado mediante análisis cromatográfico

Para conocer las cantidades mínimas inhibitorias de los aceites es necesario conocer la cantidad que se está dosificando. Con el objetivo de determinar la cantidad de aceite esencial liberado, tanto por los materiales MCM-# como los MDX-#, se analizó el aceite esencial contenido en las partículas mediante cromatografía de gases, previa digestión de las partículas con hidróxido sódico. Al conocer la cantidad de aceite esencial contenido en cada una de las partículas, se pudo conocer la cantidad de sólido necesario que añadido al medio dosificara una cantidad de aceite esencial equivalente al del aceite libre.

Para comenzar se realizó un calibrado de los aceites esenciales con el método de análisis y condiciones a utilizar con las partículas. Para ello, se prepararon soluciones de los aceites puros a diferentes concentraciones con hexano a partir de una solución inicial con proporción 1:1 de aceite esencial y hexano. A partir de esta primera solución, se realizaron cuatro diluciones más, dividiendo la concentración por la mitad en cada una de ellas con respecto a la solución anterior, teniendo al final cinco soluciones de cada aceite con concentraciones diferentes para analizar. Una vez analizadas las soluciones de concentración de aceite conocida, se obtuvieron las curvas de calibrado (FIGURA 4). A partir de las curvas el software obtiene la relación concentración-sígnal y crea las rectas patrón. Con estas rectas se extrapolan los valores del área obtenida al analizar una muestra de partículas, y los valores obtenidos corresponden a la cantidad de aceite esencial liberado durante el análisis (FIGURA 5). El software calcula las rectas de calibrado de cada aceite esencial automáticamente, y, a la hora de calcular las cantidades de aceite, según el aceite que contenga la muestra analizada, se elige la recta correspondiente y se genera una tabla con los resultados (FIGURA 6).

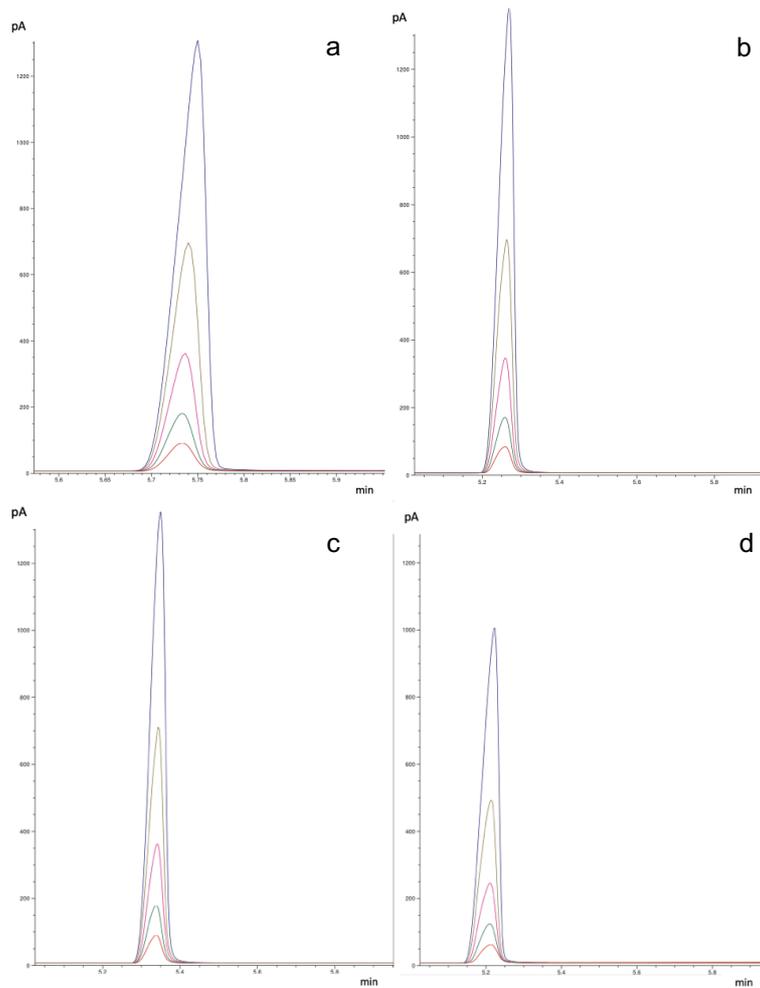


FIGURA 4. Curvas de calibrado de los CAEs (a) Car, (b) Cin, (c) Eu, (d) Th.

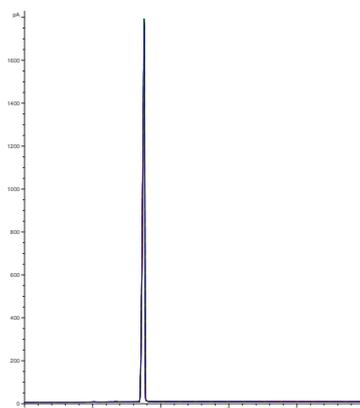


FIGURA 5. Ejemplo de cromatograma obtenido tras la digestión de una partícula MCM-Eu con NaOH, permitiendo observar la presencia del pico del Eugenol.

| Sample # | Location | Inj | SampleType | Run | EU Area | EU RT | EU Amount |
|------------|----------|-----|------------|-----|------------|-------|------------|
| EU_1_1 | Vial 101 | 1 | Sample | 2 | 4144.67627 | 5.759 | 1.46434 |
| EU_1_2 | Vial 102 | 1 | Sample | 3 | 3987.13013 | 5.757 | 1.40867 |
| EU_2_1 | Vial 103 | 1 | Sample | 4 | 4175.03809 | 5.758 | 1.47507 |
| EU_2_2 | Vial 104 | 1 | Sample | 5 | 3248.33496 | 5.753 | 1.14760 |
| EU_3_1 | Vial 105 | 1 | Sample | 6 | 3364.30396 | 5.755 | 1.18858 |
| EU_3_2 | Vial 106 | 1 | Sample | 7 | 3618.97314 | 5.755 | 1.27857 |
| EU_4_1 | Vial 107 | 1 | Sample | 8 | 4174.04443 | 5.757 | 1.47472 |
| EU_4_2 | Vial 108 | 1 | Sample | 9 | 4083.17700 | 5.757 | 1.44261 |
| EU_MDX_2_1 | Vial 109 | 1 | Sample | 10 | 253.69701 | 5.734 | 8.93539e-2 |
| EU_MDX_2_2 | Vial 110 | 1 | Sample | 11 | 248.07910 | 5.734 | 8.73686e-2 |

*** End of Report ***

FIGURA 6. Ejemplo de cuantificación de las cantidades de eugenol liberado por diferentes lotes de partículas analizadas.

Los resultados obtenidos se recalcularon para la cantidad exacta de partículas que se han pesado para el análisis, ya que los proporcionados por el software son para 1 mg de partículas. La media de las cantidades de cada aceite esencial encapsuladas en los distintos tipos de partículas se ha representado en la FIGURA 7, donde podemos observar que las partículas MCM-# reflejan una buena eficiencia del proceso de cargado de los aceites, ya que al ser la proporción utilizada 1:1 para 1 mg de las partículas cargadas la mitad debería ser aceite. Se aprecian variaciones dependiendo del tipo de aceite, siendo el eugenol el que presenta los datos más eficientes y cercanos a los 0,5 mg de aceite que se esperaban.

Por otro lado, en las partículas MDX-# se distingue un descenso del aceite encapsulado. Esto significaría que, además del efecto dilución que se produce al sumar al peso total de la partícula el peso de la puerta molecular, podría haber una pérdida de aceite durante el proceso de funcionalización de las partículas, causada por los lavados realizados con agua.

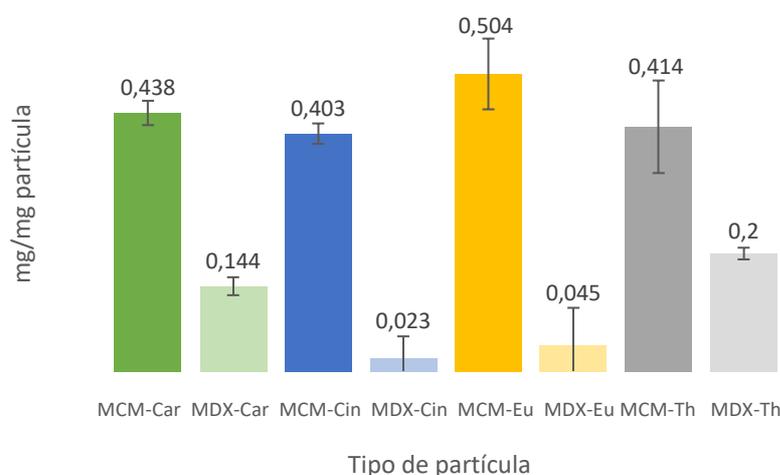


FIGURA 7. Cantidades de CAEs (mg/mg partícula) liberadas por las partículas.

Una vez obtenida la cantidad de aceite encapsulado, se pudo calcular el peso necesario de cada tipo de partícula para lograr las concentraciones deseadas en los test de actividad antimicrobiana.

4.3. Ensayos microbiológicos

Los ensayos microbiológicos mediante la técnica de la microdilución en placas multipocillo fueron realizados para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) de los CAEs, y establecer diferencias entre las sustancias, formas de aplicación y bacterias testadas. Para ello, preparamos las placas de microdilución de la forma explicada en materiales y métodos, añadiendo las muestras en la primera fila de su columna correspondiente y realizando las diluciones en las filas consecutivas. Tras tener las placas preparadas, se inocularon con la

bacteria correspondiente y se dejaron en incubación para obtener las placas con crecimiento de colonias. En estas placas se realizó un examen visual y MTT, anotando en cada uno las CMI de cada una de las muestras testadas.

Se realizaron tres test en tres días diferentes con dos repeticiones por bacteria, en los cuales se testaron las sustancias en su forma libre, encapsulada y encapsulada con puertas moleculares.

4.3.1. *Escherichia coli*

La FIGURA 8 muestra ejemplos de las placas en los ensayos con *E. coli*. Las dos fotografías de arriba corresponden con la prueba del test visual, en ellas se examina el crecimiento de la bacteria mediante la presencia de una turbidez amarilla en el pocillo. A partir de este examen se calcula la CMI como la primera concentración de aceite esencial a la cual deja de haber crecimiento microbiano. De igual manera, se determinó la CMI en las placas tras la tinción con MTT. En este caso, las colonias vivas se tintaban de color morado intenso, facilitando de esta manera la lectura de la CMI necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano.

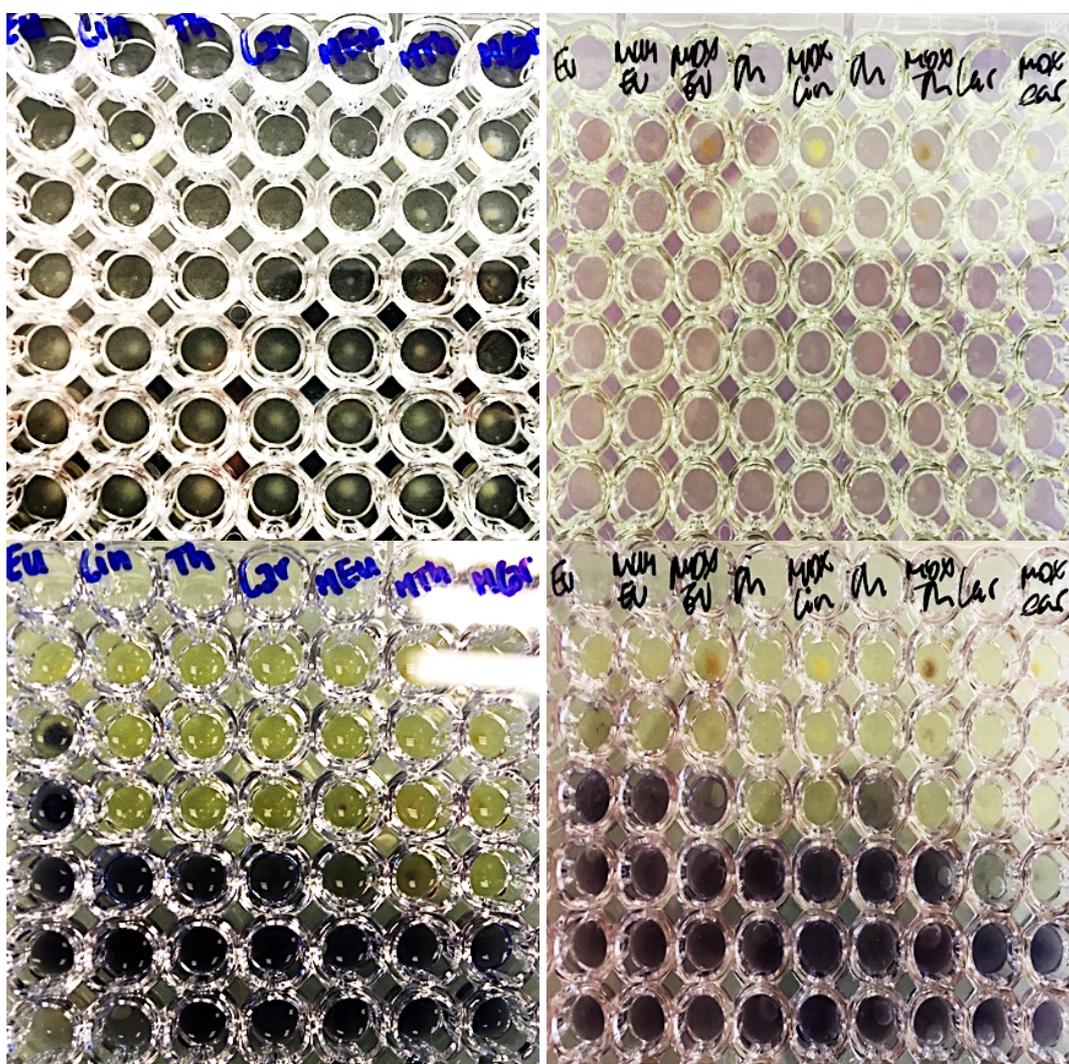


FIGURA 8. Fotografías de las placas de *Escherichia coli*.

A partir de los datos de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de aceite esencial se determinó la CMI de cada uno de los aceites esenciales y forma de aplicación. Cuando hubo discrepancia entre los datos de la CMI obtenida por diferentes métodos o entre diferentes repeticiones y días, se tomó como CMI aquella que se repetía en un mayor número de ensayos. Los resultados se muestran en la TABLA 3.

De la tabla deducimos que los componentes de aceites esenciales más efectivos cuando se aplican libres frente a *E. coli* son el Car y Cin, ya que consiguieron CMI de 256 µg/mL. Por su parte, las CMI de Th y Eu fueron de 512 µg/mL. Estos datos son similares a los reportados por Oussalah *et al.*, (2007), en el cual carvacrol, cinamaldehído y timol presentaron CMI similares, mientras que las concentraciones del eugenol fueron el doble. Por tanto, el timol sería el único que no coincidiría en principio con este estudio.

Respecto al efecto de la encapsulación, como se muestra en la TABLA 3, se puede concluir que en el caso de Car, Cin y Eu, esta no produce ningún cambio en la CMI. Sin embargo, en el caso de Th, la encapsulación sí que permitió reducir la CMI desde 512 µg/mL a 256 µg/mL. Observando otros estudios, como el de Janatova *et al.*, (2015) y Bernardos *et al.*, (2015), en los cuales se estudiaron nuestros CAEs objetivo encapsulados, justificamos que la diferencia con la forma libre radica en el tiempo de efectividad, siendo mayor en la forma encapsulada por la menor velocidad de evaporación de las sustancias. Así pues, aunque no existan diferencias en las CMI, la forma encapsulada sigue presentando ventajas frente a la forma pura en cuanto al tiempo de efectividad de la actividad antimicrobiana de los CAEs. También presenta ventajas en su aplicación en alimentos, pues consigue el enmascaramiento de las fuertes propiedades sensoriales del aceite esencial, como concluyeron en su estudio Cacciatore *et al.*, (2020) tras obtener mejores resultados con la forma libre del carvacrol que con el encapsulado, y mejora su solubilidad como demostraron Shah *et al.*, (2013), que obtuvieron mejores resultados con el eugenol libre en la muestra de TSB pero no en la leche, donde la forma encapsulada mostró ser más eficaz contra *Escherichia coli*. Por tanto, es frecuente encontrar que la forma libre da mejores resultados que la encapsulada, en este caso la mayoría han presentado las mismas CMI que las formas encapsuladas, pero la encapsulación presenta otra serie de ventajas frente a la forma libre en su aplicación.

Las formas encapsuladas MDX no muestran diferencias frente a las MCM en la TABLA 3, aunque no se reflejan debido al método utilizado para seleccionar este valor (basado en la concentración que se repite un mayor número de veces), la realidad es que cuando se aplicó el recubrimiento por MDX aumentó la proporción de CMI de valores inferiores y disminuyó la de valores superiores con respecto a las formas de administración libre y encapsulada en MCM-41 sin recubrir.

TABLA 3. Tabla de CMI de *Escherichia coli* (EC). DIF indica si existe diferencia entre las formas de aplicación de una misma sustancia o no.

| | EC | | |
|------------|-------|-------------|-----|
| | FORMA | CMI (µg/mL) | DIF |
| Car | LIBRE | 256 | |
| | MCM | 256 | |
| | MDX | 256 | NO |
| Cin | LIBRE | 256 | |
| | MCM | 256 | |
| | MDX | 256 | NO |
| Eu | LIBRE | 512 | |
| | MCM | 512 | |
| | MDX | 512 | NO |
| Th | LIBRE | 512 | |
| | MCM | 256 | |
| | MDX | 256 | SÍ |

4.3.2. *Staphylococcus aureus*

Las placas en los ensayos con *S. aureus* se muestran en la FIGURA 9. En ellas se realizaron los mismos exámenes que en *E. coli*, siendo las dos fotografías de arriba las de prueba del test visual, en el cual se examina el crecimiento de una colonia bacteriana en forma de punto blanco. Las dos fotografías situadas debajo corresponden a las placas tras la tinción con MTT, donde las colonias aparecen tintadas de un color oscuro.

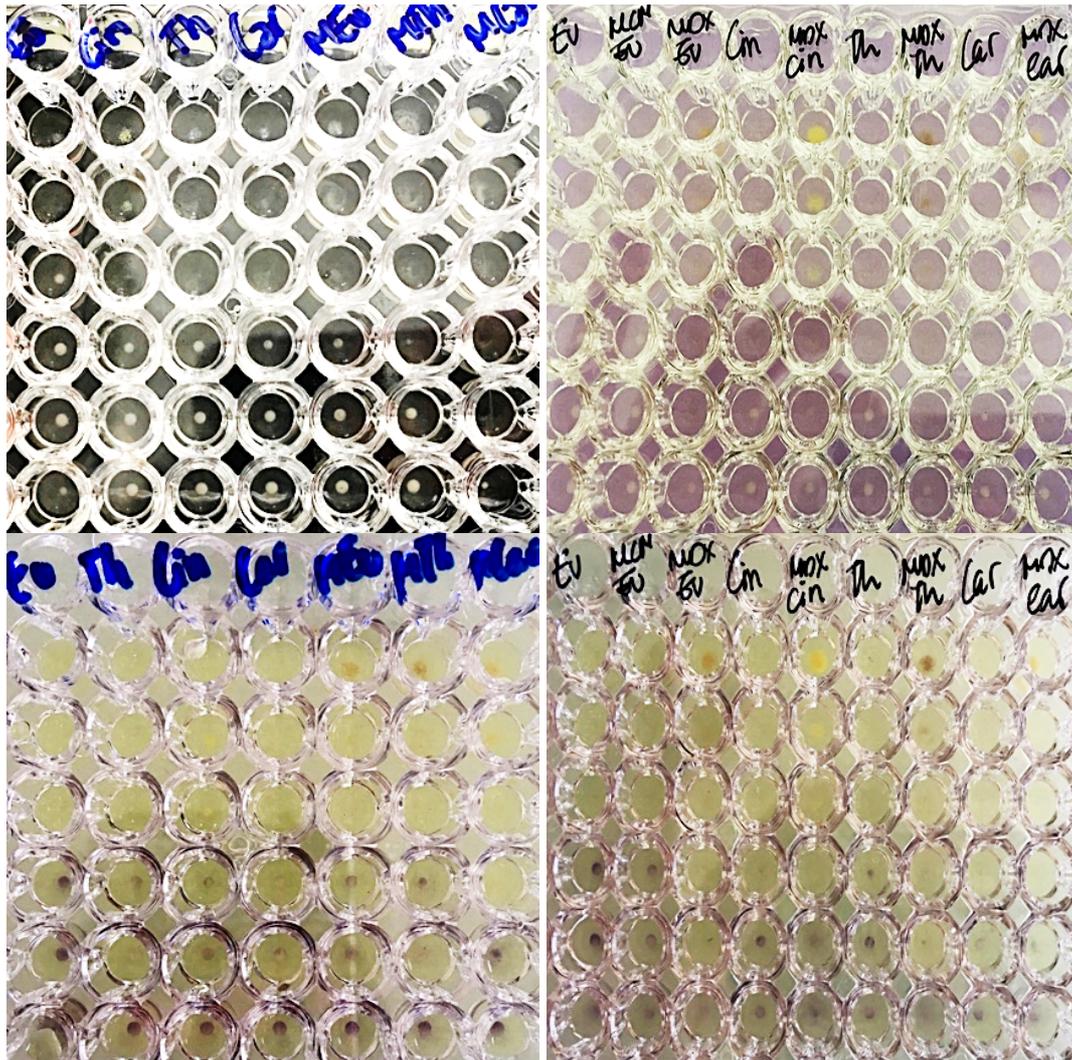


FIGURA 9. Fotografías de las placas de *Staphylococcus aureus*.

A partir de los exámenes realizados se obtuvieron las CMI de los distintos CAEs en las tres formas de aplicación estudiadas, y fueron recogidas en la TABLA 4. En la tabla observamos que los componentes de aceites esenciales más efectivos en su forma libre frente a *S. aureus* son el Car, Cin y Th, ya que consiguieron CMI de 256 $\mu\text{g/mL}$. En cambio, la CMI del Eu fue de 1024 $\mu\text{g/mL}$. Por su parte, esta vez los resultados de todos los CAEs coincidirían con los resultados proporcionados por Oussalah *et al.*, (2007), confirmando que el eugenol presenta una actividad antimicrobiana inferior que el resto de CAEs al necesitar de una concentración mayor para conseguir la inhibición. Este hecho es corroborado también por Gallucci *et al.*, (2009), donde tanto *E. coli* como *S. aureus* fueron expuestas al carvacrol, timol y eugenol, concluyendo que los dos primeros eran los más efectivos y que el eugenol, aunque también mostró actividad antimicrobiana, esta fue inferior. En este estudio también mostraron la diferencia entre las CMI obtenidas según la bacteria, siendo las de *Escherichia coli* siempre superiores.

Las CMI obtenidas en el presente estudio presentaron diferencias entre las dos bacterias estudiadas, pues con respecto a *Escherichia coli* en la forma libre variaron el timol, que disminuyó su CMI de 512 $\mu\text{g/mL}$, y el eugenol, que aumentó su CMI de 512 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, todos los CAEs disminuyeron su CMI en la forma MDX. En general, podemos deducir que la bacteria *Staphylococcus aureus* es más sensible. La razón es que los aceites esenciales tienen una mayor actividad antimicrobiana en las bacterias Gram-positivas, como es *Staphylococcus aureus*, que en las Gram-negativas, es decir, *Escherichia coli*, como reportan Hernández *et al.*, 2014 con varios estudios. Esto es debido a que los extremos lipófilos de los ácidos lipoteicoicos en la membrana celular de las bacterias Gram-positivas pueden facilitar la penetración de compuestos hidrófobos de aceites esenciales, mientras que en las bacterias Gram-negativas se

limita la velocidad de difusión de los compuestos hidrófobos debido a las proteínas protectoras de la membrana o los lipopolisacáridos de la pared celular. En cuanto a los CAEs que no han mostrado diferencias, Zhang *et al.*, (2016) estudiaron el cinamaldehído puro con nuestras bacterias patógenas y obtuvieron también CMI similares, y Cacciatore *et al.*, (2020) utilizaron también nuestras dos bacterias objetivo y obtuvieron la misma CMI con la forma libre del carvacrol, pero diferente con la forma encapsulada. Por tanto, estos estudios coincidirían en parte con el nuestro, puesto que el carvacrol y cinamaldehído no han variado su actividad según la bacteria, excepto al utilizar la forma encapsulada funcionalizada.

La funcionalización sí ha presentado esta vez de forma clara una diferencia respecto a las otras formas disminuyendo la CMI de los CAEs, lo cual indicaría que la liberación controlada de los CAEs mejoraría su eficacia disminuyendo su CMI.

TABLA 4. Tabla de CMIs de *Staphylococcus aureus* (SA). DIF indica si existe diferencia entre las formas de aplicación de una misma sustancia o no.

| | | SA | | |
|------------|-------|------------|-------------|-----|
| | | FORMA | CMI (µg/mL) | DIF |
| Car | LIBRE | 256 | | |
| | MCM | 256 | | |
| | MDX | 128 | SÍ | |
| Cin | LIBRE | 256 | | |
| | MCM | 256 | | |
| | MDX | 128 | SÍ | |
| Eu | LIBRE | 1024 | | |
| | MCM | 512 | | |
| | MDX | 256 | SÍ | |
| Th | LIBRE | 256 | | |
| | MCM | 256 | | |
| | MDX | 128 | SÍ | |

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha propuesto un procedimiento para el método de cuantificación del aceite esencial encapsulado, realizada mediante cromatografía de gases. Con esta propuesta se ha podido mejorar la precisión de los cálculos de las CMIs de los CAEs estudiados. Utilizando este método se pretende ayudar a las futuras investigaciones a realizar sobre los CAEs, y a la hora de proporcionar datos más aproximados a los reales sobre sus CMIs. En nuestro caso, con este método hemos comprobado que los resultados de aceite liberado obtenidos coincidían con la cantidad de aceite cargada en las partículas mesoporosas de sílice MCM-#, pero no con las MDX-#, debido al proceso de funcionalización.

Por otro lado, mediante la evaluación de la actividad antimicrobiana de los CAEs, hemos reafirmado el poder inhibitorio de estas sustancias y establecido diferencias en él. Esto significaría que a la hora de presentar CMIs han de realizarse estudios específicos según el aceite esencial utilizado, su forma de aplicación y bacteria objetivo. En estas variaciones hemos observado a *S. aureus* como bacteria más sensible a estas sustancias, de las cuales el eugenol ha resultado ser la menos eficaz frente a las dos bacterias.

Por último, hemos concluido que la encapsulación no presenta diferencias importantes en las CMIs frente a la forma libre, si no ventajas relacionadas con la aplicación y preservación de los CAEs. En cambio, la encapsulación junto con el proceso de funcionalización, además de aportar estas ventajas ha permitido reducir las CMIs en una de las bacterias. Por ello, se propone una ampliación en la investigación de las ventajas que suponen las partículas funcionalizadas en el campo de la encapsulación para conseguir la reducción de las concentraciones necesarias para la inhibición.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Antunes, M. D. C., & Cavaco, A. M. (2010). The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and fragrance journal*, 25(5), 351-366.
- Arcos D, Vallet-Regí M. 2013. Bioceramics for drug delivery. *Acta Materialia* 61(3): 890–911.
- Aznar, E., Martínez-Máñez, R., & Sancenón, F. (2009). Controlled release using mesoporous materials containing gate-like scaffoldings. *Expert opinion on drug delivery*, 6(6), 643-655.
- Aznar, E., Oroval, M., Pascual, L., Murguía, J. R., Martínez-Manez, R., & Sancenon, F. (2016). Gated materials for on-command release of guest molecules. *Chemical reviews*, 116(2), 561-718.
- Bagheri, A., Khodarahmi, R., & Mostafaie, A. (2014). Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. *Food chemistry*, 161, 270-278.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Barboza-Corona, J. E., Vázquez-Acosta, H., Hernández, R. S., & Bautista-Justo, M. (2004). Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta universitaria*, 14(3), 32-38.
- Baser, K.H.C., Buchbauer G., (2010). Handbook of essential oils: Science, technology, and applications. (1st Ed.) CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA.
- Bengisu, M. (2018). Biomimetic materials and design. *Cuadernos del Centro de Estudios en Diseño y Comunicación N°70*, 19, 97-103.
- Bernardos Bau, A. Kourimská, L. (2013). Applications of Mesoporous Silica Materials in Food: a Review. *Czech Journal of Food Sciences*. 31(2):99-107. doi:10.17221/240/2012-CJFS
- Bernardos, A., Aznar, E., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Sancenón, F., Soto, J., ... & Amorós, P. (2009). Enzyme-responsive controlled release using mesoporous silica supports capped with lactose. *Angewandte Chemie*, 121(32), 5998-6001.
- Bernardos, A., Marina, T., Žáček, P., Pérez-Esteve, É., Martínez-Mañez, R., Lhotka, M., ... & Klouček, P. (2015). Antifungal effect of essential oil components against *Aspergillus niger* when loaded into silica mesoporous supports. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2824-2831.
- Bernardos, A., Mondragon, L., Aznar, E., Marcos, M. D., Martínez-Manez, R., Sancenon, F., ... & Amoros, P. (2010). Enzyme-responsive intracellular controlled release using nanometric silica mesoporous supports capped with “saccharides”. *ACS nano*, 4(11), 6353-6368.
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., & Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416-423.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Cacciatore, F. A., Dalmás, M., Maders, C., Isaia, H. A., Brandelli, A., & da Silva Malheiros, P. (2020). Carvacrol encapsulation into nanostructures: Characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens adhered to stainless steel. *Food Research International*, 109143.
- Carocho, M. S. (2016). *Desarrollo de nuevos productos alimenticios: incorporación de extractos de plantas como ingredientes funcionales y conservantes naturales* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).

- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G. J., & Haroutounian, S. A. (2004). Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8261–8267.
- Coll, C., Bernardos, A., Martínez-Mañez, R., & Sancenón, F. (2013). Gated silica mesoporous supports for controlled release and signaling applications. *Accounts of chemical research*, 46(2), 339-349.
- Coll, C., Casasús, R., Aznar, E., Marcos, M. D., Martínez-Mañez, R., Sancenón, F., ... & Amorós, P. (2007). Nanoscopic hybrid systems with a polarity-controlled gate-like scaffolding for the colorimetric signalling of long-chain carboxylates. *Chemical Communications*, (19), 1957-1959.
- Cotí, K. K., Belowich, M. E., Liong, M., Ambrogio, M. W., Lau, Y. A., Khatib, H. A., ... & Stoddart, J. F. (2009). Mechanised nanoparticles for drug delivery. *Nanoscale*, 1(1), 16-39.
- EFSA. (2019). Antimicrobial resistance shows no signs of slowing down. Recuperado 29 febrero 2019, de <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/190226>.
- EUCAST. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, ix–xv.
- FAO. (2018). Food loss and waste and the right to adequate food: making the connection. Rome. CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 48.
- Fathi M, Martín A, McClements DJ. 2014. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends Food Sci Tech* 39:18–39.
- Fathi M, Mozafari MR, Mohebbi M. 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci Tech* 23:13–27.
- Fisher, K., & Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1232–1240.
- Fu, Q. I. A. N. G., Rao, G. R., Ista, L. K., Wu, Y. A. N. G., Andrzejewski, B. P., Sklar, L. A., ... & López, G. P. (2003). Control of molecular transport through stimuli-responsive ordered mesoporous materials. *Advanced Materials*, 15(15), 1262-1266.
- Fujiwara, M., Terashima, S., Endo, Y., Shiokawa, K., & Ohue, H. (2006). Switching catalytic reaction conducted in pore void of mesoporous material by redox gate control. *Chemical Communications*, (44), 4635-4637.
- Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., & Demo, M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and fragrance journal*, 24(6), 348-354.
- Gill, A. O., P. Delaquis, P. Russo, and R. A. Holley. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73:83-92.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R. & Nerín, C. (2009) Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem* 116, 982–989.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*, 15(7-8), 330-347.

- Hao, Y. Y., R. E. Brackett, and M. P. Doyle. 1998. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiology* 15:367-378.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., ... & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595.
- Hernández-Ochoa, L., Aguirre-Prieto, Y. B., Nevárez-Moorillón, G. V., Gutierrez-Mendez, N., & Salas-Muñoz, E. (2014). Use of essential oils and extracts from spices in meat protection. *Journal of food science and technology*, 51(5), 957-963.
- Ibáñez, F., Torre, P., & Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios. *Área de Nutrición y Bromatología, Universidad Pública de Navarra*, 3-5.
- Janatova, A., Bernardos, A., Smid, J., Frankova, A., Lhotka, M., Kourimská, L., ... & Kloucek, P. (2015). Long-term antifungal activity of volatile essential oil components released from mesoporous silica materials. *Industrial Crops and Products*, 67, 216-220.
- Johansson, E., Choi, E., Angelos, S., Liang, M., & Zink, J. I. (2008). Light-activated functional mesostructured silica. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 46(3), 313-322.
- Juven, B. J., J. Kanner, F. Schved, and H. Weisslowicz. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76:626-631.
- Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources*, 4(033), 1-19.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., & Yildirim, A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculoides* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculoides*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9452-9458.
- Lai, C. Y., Trewyn, B. G., Jeftinija, D. M., Jeftinija, K., Xu, S., Jeftinija, S., & Lin, V. S. Y. (2003). A mesoporous silica nanosphere-based carrier system with chemically removable CdS nanoparticle caps for stimuli-responsive controlled release of neurotransmitters and drug molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 125(15), 4451-4459.
- Laird, K., & Phillips, C. (2011). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials. *Letters in applied microbiology*, 54(3), 169-174.
- Li, L. L., & Wang, H. (2013). Enzyme-coated mesoporous silica nanoparticles as efficient antibacterial agents in vivo. *Advanced healthcare materials*, 2(10), 1351-1360.
- Liu, R., Zhang, Y., & Feng, P. (2009). Multiresponsive supramolecular nanogated ensembles. *Journal of the American Chemical Society*, 131(42), 15128-15129.
- Liu, R., Zhao, X., Wu, T., & Feng, P. (2008). Tunable redox-responsive hybrid nanogated ensembles. *Journal of the American Chemical Society*, 130(44), 14418-14419.
- López, A. F., Deladino, L., Alba, S. N., & Miriam, N. M. (2011). Encapsulación de compuestos bioactivos con alginatos para la industria de alimentos. *@ limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 10(1).
- Lueck, E. (1980). *Antimicrobial Food Additives*, Springer-Verlag, New York, USA.

- Majeed, H., Bian, Y. Y., Ali, B., Jamil, A., Majeed, U., Khan, Q. F., ... & Fang, Z. (2015). Essential oil encapsulations: uses, procedures, and trends. *RSC Advances*, 5(72), 58449-58463.
- Medina Ventura, C. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de componentes bioactivos de aceites esenciales inmovilizados sobre micropartículas de sílice.
- Muñoz, B., Ramila, A., Perez-Pariente, J., Diaz, I., & Vallet-Regi, M. (2003). MCM-41 organic modification as drug delivery rate regulator. *Chemistry of Materials*, 15(2), 500-503.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food control*, 20(2), 157-160.
- Nostro, A., & Papalia, T. (2012). Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 7(1), 28-35.
- OMS. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization.
- OMS. (2018). Aditivos alimentarios. Recuperado 26 diciembre, 2019, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-additives>
- OMS. (2019). Inocuidad de los alimentos. Recuperado 26 diciembre, 2019, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. *Food control*, 18(5), 414-420.
- Palaniappan, K., & Holley, R. A. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International journal of food microbiology*, 140(2-3), 164-168.
- Park, S. Y., Barton, M., & Pendleton, P. (2012). Controlled release of allyl isothiocyanate for bacteria growth management. *Food control*, 23(2), 478-484.
- Pędziwiatr-Werbicka, E., Miłowska, K., Podlas, M., Marcinkowska, M., Ferenc, M., Brahmi, Y., ... & Lisowska, K. (2014). Oleochemical-Tethered SBA-15-Type Silicates with Tunable Nanoscopic Order, Carboxylic Surface, and Hydrophobic Framework: Cellular Toxicity, Hemolysis, and Antibacterial Activity. *Chemistry—A European Journal*, 20(31), 9596-9606.
- Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P., & Xu, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against E. coli with an improved method. *Journal of food science*, 74(7), M379-M383.
- Peredo-Luna, H. A., Palou-García, E., & López-Malo, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. Recuperado 9 marzo, 2020, de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf).
- Pérez-Esteve, É., Ruiz-Rico, M., Martínez-Mañez, R., & Barat, J. M. (2015). Mesoporous silica-based supports for the controlled and targeted release of bioactive molecules in the gastrointestinal tract. *Journal of food science*, 80(11), E2504-E2516.
- Pezo, D., Salafranca, J., & Nerin, C. (2006). Design of a method for generation of gas-phase hydroxyl radicals, and use of HPLC with fluorescence detection to assess the antioxidant capacity of natural essential oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(7), 1241-1246.
- Pitarch, C. (2000). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. *Estudio in vitro del aromatoograma de*, 85.

Prado, A. G., Moura, A. O., & Nunes, A. R. (2011). Nanosized silica modified with carboxylic acid as support for controlled release of herbicides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(16), 8847-8852.

Qi, G., Li, L., Yu, F., & Wang, H. (2013). Vancomycin-modified mesoporous silica nanoparticles for selective recognition and killing of pathogenic gram-positive bacteria over macrophage-like cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(21), 10874–10881.

Rojo, R., Mendoza, G. D., González, S. S., Landois, L., Bárcena, R., & Crosby, M. M. (2005). Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 655-665.

Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., & Fuentes López, A. (2018). Sistemas de encapsulación y liberación controlada basados en el uso de puertas moleculares. *Nutrición Hospitalaria*, 35(4), 150-154.

Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Bernardos, A., Sancenón, F., Martínez-Máñez, R., Marcos, M. D., & Barat, J. M. (2017). Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food chemistry*, 233, 228-236.

Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 7(1), 153-170.

Seid Mahdi Jafari, Yinghe He & Bhesh Bhandari (2007) Encapsulation of Nanoparticles of d-Limonene by Spray Drying: Role of Emulsifiers and Emulsifying Techniques, *Drying Technology*, 25(6), 1069-1079.

Shah, B., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2013). Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk. *International journal of food microbiology*, 161(1), 53-59.

Shelef, L. A. 1983. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 6:29-44.

Shin, M., Park, E., & Lee, H. (2019). Plant-Inspired Pyrogallol-Containing Functional Materials. *Advanced Functional Materials*, 29(43), 1903022.

Smid, E. J., & Gorris, L. G. (1999). Natural antimicrobials for food preservation. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 285-308.

Smith, R. L., Cohen, S. M., Doull, J., Feron, V. J., Goodman, J. I., Marnett, L. J., ... & Higley, N. A. (2005). A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food and chemical toxicology*, 43(3), 345-363.

Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(3), 304-318.

Tassou, C., E. H. Drosinos, and G.-J. E. Nychas. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4°C and 10°C. *Journal of Applied Bacteriology* 78:593-600.

TOLSÁ LLORENS, P. A. S. C. U. A. L. (2018). *Diseño de un sistema de doble encapsulación para la liberación selectiva de compuestos activos* (Doctoral dissertation).

Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40-53.

UN. (2019). Inocuidad alimentaria. Recuperado 11 febrero, 2019, de <https://www.un.org/es/observances/food-safety-day>.

Van den Brink, J., & De Vries, R. P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(6), 1477.

Wang Y, Bamdad F, Song Y, Chen L. 2012. Hydrogel particles and other novel protein-based methods for food ingredient and nutraceutical delivery systems. In: Garti N, McClements DJ, editors. *Encapsulation and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*. Cambridge: Woodhead Publishing. p 412–50.

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., & Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 59, 282-289.