



Universidad de Oviedo

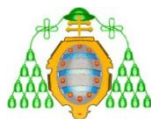
MÁTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**Preparación de nanopartículas de ácido poliláctico
para la encapsulación de timol como agente bioactivo.
Caracterización y optimización**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR
SHIHAN WENG**

JULIO, 2017





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

Dr. D. Ismael Marcet Manrique (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **Shihan Weng** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11^a promoción curso 2016-2017.

Oviedo , 14 de Julio de 2017

D. Manuel Rendueles de la Vega

D. Ismael Marcet Manrique

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

He estado casi un año en la Facultad de Química, y he tenido una experiencia maravillosa. Durante el año, han habido desafíos, pero también he podido aprender, tanto en el plano académico como en el personal. Este año he tenido una buena convivencia con mis compañeros de clase y hemos llegado a tener una relación muy estrecha. Doy las gracias a mis compañeros de clase por su apoyo cuando intentaba expresarme en castellano. Además, le doy mi más sincero agradecimiento a mis profesores, por su cercanía con los alumnos extranjeros y por su amabilidad.

También, quiero agradecer a mis tutores, Manuel e Ismael. Con esta experiencia en España sé que cuento con un grupo de personas cualificadas para realizar un proyecto. Durante todo este tiempo hemos pasado buenos momentos, aunque a veces tocaba trabajar hasta muy tarde para terminar los experimentos.

Especialmente, me gustaría agradecer a Prof. Ismael por su entusiasmo y amabilidad. Durante todo el diseño experimental y la realización del proyecto ha estado presente y me ha apoyado en todo momento. Aunque en ocasiones el idioma era un obstáculo, él pacientemente respondía a todas mis dudas y me guiaba.

Además, doy las gracias a mis compañeros de laboratorio. Por los meses que trabajamos juntos, por los buenos momentos que tuvimos y porque crearon un fantástico ambiente de trabajo. Muchas veces me dieron sugerencias o ideas para mejorar mi investigación.

Por último, doy gracias a la universidad de Oviedo y la Universidad de Shandong (Weihai), quienes han tenido un gran impacto en mi vida, a través del intercambio cultural pude evaluar las diferencias y características positivas entre un país y otro, lo cual me ha permitido ampliar mis horizontes y poder empezar un nuevo capítulo en mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	VI
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	5
2.1. Aceites esenciales: aplicación y composición.....	5
2.2. El timol.....	9
2.2.1. Actividad antibacteriana y antifúngica del timol.....	11
2.2.2. Actividad antioxidante del timol.....	14
2.3. Formación de micro y nanopartículas para la encapsulación de moléculas de interés.....	14
2.3.1. Nanopartículas de timol.....	15
2.3.2. Micro y nanopartículas de ácido poliláctico (APL).....	19
2.3.3. Técnicas de preparación de micro y nanopartículas de APL.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1. Materiales.....	27
3.2. Preparación de nanopartículas.....	27
3.3. Cálculo de tamaño y contenido en timol.....	29
3.4. Diseño experimental.....	29
3.5. Caracterización de la forma de las nanopartículas.....	30
3.6. Análisis de termogravimetría (TG).....	30
3.7. Ensayos de estabilidad con el tiempo.....	31
3.8. Ensayos de estabilidad a diferentes pHs.....	31
3.9. Ensayos de liberación de timol.....	31
3.10. Propiedades antioxidantes, DPPH y ABTS ⁺	32
3.11. Propiedades antimicrobianas.....	33
3.11.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	33
3.11.2. Detección de la actividad inhibitoria del timol libre y encapsulado en nanopartículas.....	33
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Preparación de nanopartículas.....	36

4.2. Modelización de la influencia de la cantidad de APL y timol sobre el tamaño y la eficacia de encapsulación.....	37
4.3. Caracterización de la forma de las nanopartículas.....	44
4.4. Análisis de termogravimetría (TG).....	45
4.5. Ensayos de estabilidad con el tiempo.....	47
4.6. Ensayos de estabilidad a diferentes pHs.....	49
4.7. Ensayos de liberación de timol.....	49
4.8. Propiedades antioxidantes, DPPH y ABTS ⁺	55
4.9. Propiedades antimicrobianas.....	55
5. CONCLUSIONES.....	58
6. BIBLIOGRAFÍA.....	60

RESUMEN

El mantenimiento de las cualidades organolépticas y la conservación de los alimentos es un problema clave en su producción. Los alimentos en general, y los alimentos procesados en particular, se estructuran de una manera diversa y en muchos casos heterogénea, pudiendo presentar diferentes texturas y composiciones. Si bien para su conservación se suele recurrir a los antioxidantes y conservantes de uso habitual en la industria, como por ejemplo el benzoato de sodio, el butilhidroxitoluol o el sulfito sódico, existe una demanda creciente en cuanto a consumir alimentos que no tengan este tipo de aditivos, siendo necesaria la exploración de nuevas sustancias de origen natural que puedan desempeñar funciones similares.

Los aceites esenciales se extraen de las partes aéreas de una gran variedad de plantas y suelen tener en su composición agentes activos con propiedades antioxidantes y conservantes. En concreto el timol aparece en los aceites esenciales del tomillo o el orégano y se encuentra ampliamente reconocido como un potente antibacteriano. Sin embargo, su solubilidad en el medio acuoso es baja, es sensible a la luz y altamente volátil a temperatura ambiente. Todos estos inconvenientes limitan su utilización como aditivo alimentario.

En este trabajo se ha caracterizado la producción de nanopartículas de ácido poliláctico que contienen timol en su interior. De tal manera que la nanopartícula resolvería algunas de las limitaciones del timol, ya que permitiría su dispersión homogénea en la matriz alimentaria, dificultaría su pérdida por evaporación y facilitaría su liberación gradual en el tiempo, haciéndolo en definitiva más efectivo.

Con este propósito se ha evaluado la influencia de la concentración de ácido poliláctico y del timol en el tamaño de las nanopartículas y en la eficacia de encapsulación del agente activo. En este caso, se encontró que las nanopartículas obtenidas variaban relativamente poco en su tamaño, pero que la eficacia de encapsulación disminuía de manera acentuada a partir de una concentración determinada de ácido poliláctico. Además, las nanopartículas resultantes presentaron una morfología completamente esférica, tal y como cabría esperar en este caso. Por otro lado, las nanopartículas resultaron estables durante 40 días de conservación a 5 °C, no observándose variaciones en el tamaño, y sólo una ligera disminución en el contenido en timol. En este sentido, su estabilidad a diferentes pHs también fue ensayada durante 20 días, no apreciándose síntomas de degradación a pHs ácidos o básicos, manteniéndose inalterado el tamaño de las nanopartículas y, como en el caso anterior,

produciéndose solo una ligera disminución en la cantidad de timol encapsulado. Como parte de su caracterización, también se estudió la liberación del agente activo con el tiempo y a diferentes temperaturas, constatándose que el timol se liberaba siguiendo una cinética de primer orden. El timol liberado presentó propiedades antioxidantes contra el radical DPPH y ABTS⁺, además, sus propiedades antibacterianas fueron similares a la del timol libre, pero con la diferencia de poder adicionar al medio una cantidad de timol superior en forma de nanopartículas.

ABSTRACT

The maintenance of the organoleptic and physical properties of food is a key production issue. Processed food, even normal food, have a heterogeneous structure, being able to show different textures and compositions. Although in the food industry antioxidants and preservatives such as sodium benzoate, butylhydroxytoluol or sodium sulphite, are commonly used, there is a growing demand for green products which don't have this type of additives in their composition.

Essential oils are extracted from the aerial parts of a wide variety of plants and usually contain active ingredients with antioxidant and preservative properties. Thymol appears in the essential oils of thyme or oregano and is widely recognized as a strong antibacterial. However, its solubility in the aqueous medium is low, it is light-sensitive and highly volatile at room temperature. All these disadvantages limit its use as a food additive.

In this work, the production of polylactic acid nanoparticles containing thymol has been characterized. Thus, the nanoparticles would solve some of the limitations of thymol, as they would allow its homogeneous dispersion in the food matrix, would make it harder to be evaporated and easier to promote its gradual release over time.

For this purpose, the influence of the polylactic acid and thymol concentration on the size of the nanoparticles and on the thymol encapsulation efficiency have been evaluated. In this case, it was found that the nanoparticles varied relatively little in their size, but the thymol encapsulation efficiency decreased markedly from a determined concentration of polylactic acid. In addition, the resulting nanoparticles showed spherical morphology, as it was expected in this case. On the other hand, the nanoparticles were stable for 40 days of preservation at 5 ° C, with no variation in their size and only a slight decrease in their thymol content. Also, their stability at different pHs was tested for 20 days, and the nanoparticles don't showed any degradation symptoms at acidic or basic pH. Furthermore, their size was maintained unchanged during this time, and only a slight decrease in the amount of the encapsulated thymol was detected. As part of their characterization, the release of the active agent was also studied over time and at different temperatures. The thymol release followed a first order kinetic and it showed antioxidant properties against the radical DPPH and ABTS⁺. Furthermore, its antibacterial properties were similar to those found in the free thymol, but with the added advantage that the encapsulated thymol can be added to the medium in higher amounts than the free thymol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A. Partes aéreas del romero secadas y trituradas. B. Aceite esencial obtenido a partir de las partes aéreas del romero mediante la técnica de destilación.....	6
Figura 2. Ejemplo de los dos grandes grupos de moléculas que forman parte de los aceites esenciales. Adaptado de Bakkali et al. (2008).....	8
Figura 3. A. Cristales de timol con una pureza >98.0% (Sigma Aldrich, T0501). B. Fórmula desarrollada del timol.....	10
Figura 4. Micrografía de una levadura tratada con timol (Bennis, Chami, Chami, Bouchikhi, & Remmal, 2004).....	13
Figura 5. Micrografías de las nanopartículas preparadas según las investigaciones de los siguientes autores: A. Li et al. (2012), microscopía de fuerza atómica (MFA). B. Zhang et al. (2014), microscopía electrónica de transmisión (MET). C. Chen et al. (2015), microscopía electrónica de barrido (MEB). D. Xue et al. (2014), MET. E. da Rosa et al. (2015), MET.....	18
Figura 6. Emulsión de aceite en agua en la cual la fase dispersa es una solución de APL en diclorometano.....	21
Figura 8. Detalle de las cantidades de APL y timol con las que se realizó el diseño experimental.....	30
Figura 9. Tamaños (barras) e índices de polidispersión (línea) de las nanopartículas obtenidas con diferentes cantidades de APL y timol. Las barras punteadas representan las preparaciones con 100 mg de APL, las rayadas con 150 mg de APL y las sólidas con 200 mg de APL.....	37
Figura 10. Timol recuperado (barras) y eficacia de encapsulación de timol (línea) para cada una de las preparaciones ensayadas. Las barras punteadas representan las preparaciones con 100 mg de APL, las rayadas con 150 mg de APL y las sólidas con 200 mg de APL.....	37
Figura 11. Superficies de respuesta de los modelos propuestos. A. Tamaño de las nanopartículas en función del contenido en APL y timol. B. Eficacia de encapsulación en función del contenido en APL y timol.....	44
Figura 12. Micrografías realizadas mediante MET (A, B y C) y mediante MEB (D, E y F). A y D. Preparación de 150 mg APL y 100 mg de timol (66%). B y E. Preparación de 150 mg APL y 150 mg de timol (100%). C y F. Preparación de 150 mg APL y 200 mg de timol (133%).....	45
Figura 13. A. Curva de TG de las nanopartículas preparadas con 150 mg de APL y 150 mg de timol (línea sólida), el APL usado durante la encapsulación (línea a rayas), y cristales de timol (línea de puntos). B. Derivada de las curvas de TG (DTG) anteriores.....	47
Figura 14. Ensayo de la estabilidad en el tiempo de las nanopartículas preparadas con 150 mg de APL. A. Variación del tamaño de las nanopartículas en el tiempo. Dentro de cada día, la barra más	

clara (izquierda) representa las preparaciones con 100 mg de timol, la barra del medio representa las preparaciones con 150 mg de timol y las sólidas con 200 mg de timol. B. Variación en el tiempo del contenido en timol de las nanopartículas preparadas con 150 mg de timol.....	48
Figura 15. Liberación de timol a 35 °C (círculos negros), 22 °C (triángulos naranjas), 15 °C (rombos azules) y 5 °C (cuadrados verdes) por parte de las nanopartículas preparadas con 150 mg de APL y 150 mg de timol.....	53
Figura 16. Ajuste de los diferentes modelos matemáticos aplicados a la liberación del timol a 35 °C (círculos negros), 22 °C (triángulos naranjas), 15 °C (rombos azules) y 5 °C (cuadrados verdes) por parte de las nanopartículas preparadas con 150 mg de APL y 150 mg de timol. A. Modelo cinético de primer orden. B. Modelo de Korsmeyer-Peppas.....	54
Figura 17. Capacidad de eliminar el radical ABTS ⁺ (cuadrados) y DPPH (círculos) del sobrenadante obtenido a diferentes tiempos durante el experimento de liberación de timol a 37 °C.....	55
Figura 18: histogramas que representan los halos de inhibición de las cepas E. coli CET 101 y P. taetrolens LMG 2336 en milímetros cuando se ensayó con (A) soluciones de timol libre y (B) timol encapsulado en nanopartículas.....	56
Figura 19: histogramas que representan los halos de inhibición de la cepa S. aureus CECT 240 en milímetros cuando se ensayó con (A) soluciones de timol libre y (B) timol encapsulado en nanopartículas.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividades antimicrobianas del timol. Adaptado de Marchese et al. (2016).....	12
Tabla 2. Fórmulas basadas en partículas de APL/APLG y un compuesto activo que se comercializan en la actualidad (Lee, Yun, & Park, 2016).....	19
Tabla 3. Matriz del diseño experimental (DCC) con los valores codificados y reales de las dos variables independientes y las dos respuestas evaluadas.....	39
Tabla 4. Analisis de la varianza de los modelos de regresión para el tamaño de las nanopartículas y la eficacia de encapsulación.....	43
Tabla 5. Valores de termogravimetría obtenidos a partir de la Figura 13.....	47
Tabla 6. Variación de tamaño y contenido en timol de las nanopartículas almacenadas en soluciones tamponadoras a diferentes pHs.....	49
Tabla 7. Parámetros de interés obtenidos a partir de la Figura 16.....	54

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

MFA: Microscopía de fuerza atómica.

MET: Microscopía electrónica de transmisión

MEB: Microscopía electrónica de barrido.

APL: Ácido poliláctico.

APV: Alcohol de polivinilo.

DCM: Diclorometano.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

ABTS⁺: sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

ST: Soja-triptona.

NB: *Nutrient Broth*.

DLD: Dispersión de luz dinámica.

IPD: Índice de polidispersión.

DCC: Diseño central compuesto.

TG: Termogravimetría.

DTG: Derivada de las curvas de termogravimetría.

AAO%: Porcentaje de actividad antioxidante.

DER: Desviación estándar relativa.

1 - INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las matrices alimentarias son sistemas complejos, con una gran variedad de composiciones y que se estructuran de muy variadas formas. Durante la producción, embalaje, almacenamiento, transporte y venta del producto alimentario, este es vulnerable a los agentes externos, que pueden provocar un deterioro físico del alimento y en última instancia disminuir su calidad, su valor nutritivo e incluso provocar enfermedad. Debido a esto, los fabricantes se esfuerzan constantemente para mejorar los procesos productivos, diseñando embalajes adecuados según la composición del alimento a conservar, y añadiendo antioxidantes y conservantes que estabilizan las propiedades del producto e impiden el crecimiento de microorganismos perjudiciales. Mientras que los antioxidantes y conservantes tienen una naturaleza muy diversa, por parte del consumidor existe una demanda creciente de aditivos naturales, que no sólo son capaces de producir el efecto deseado, sino que además pueden potenciar las propiedades organolépticas del producto a conservar. Un ejemplo de producto natural que se ajusta a estas características son los aceites esenciales. Estos aceites se suelen extraer mediante destilación de las partes aéreas de algunas plantas, y suelen presentar una composición muy compleja. Algunas de sus moléculas constituyentes tienen una potente actividad antimicrobiana, además, los vegetales de los que se extraen, como el tomillo, el clavo o el orégano, han estado incluidos en la dieta humana desde tiempos ancestrales, por lo que estas plantas son reconocidas por dar buen sabor y olor a los alimentos en las recetas en las que se incluyen.

La adición de estos aceites esenciales o de sus compuestos activos para conseguir los efectos antibacterianos deseados a veces es difícil, ya que muchos de estos compuestos tienen una solubilidad baja en medios acuosos, una alta sensibilidad a la luz y una gran volatilidad a temperatura ambiente.

Debido a que estos problemas pueden ser abordados dentro del campo de la tecnología alimentaria, en este trabajo se estudia la producción de nanopartículas de ácido poliláctico (APL) que contienen timol, una molécula que se encuentra en los aceites esenciales de varias plantas y con fuertes propiedades antimicrobianas. Teniendo en cuenta esto, y con el propósito de caracterizar estas nanopartículas, se determinaron los siguientes objetivos:

1. Estudio de la variación del tamaño de las nanopartículas y de la eficacia de encapsulación del timol utilizando diferentes concentraciones de APL y timol.
2. Caracterización morfológica de las nanopartículas producidas.

3. Determinación de la estabilidad de las nanopartículas en el tiempo y a diferentes pHs.
4. Estudio sobre la liberación de timol en un medio acuoso a diferentes temperaturas.
5. Determinación de las propiedades antioxidantes del timol encapsulado.
6. Determinación de las propiedades antimicrobianas del timol encapsulado.

2 - CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Aceites esenciales: aplicación y composición

A pesar de todos los avances y regulaciones que se han promovido a lo largo de los años en materia de higiene y técnicas de producción, aún hoy día se estima que al menos el 30% de la población en los países industrializados sufrirá de alguna enfermedad relacionada con la ingestión de alimentos en mal estado cada año (Burt, 2004). Por lo tanto, todavía se hace necesario el desarrollo de nuevos métodos o ingredientes que eliminen, o al menos reduzcan, el número y tipo de patógenos que pueden aparecer en los alimentos. De acuerdo con la definición dada por el *codex alimentarius* (FAO-OMS), un aditivo alimentario es “cualquier sustancia que por sí misma no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al alimento en sus fases de producción, fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte (o pueda esperarse que razonablemente resulte) directa o indirectamente por sí o sus subproductos, un componente del alimento o bien afecte a sus características”. En este sentido, actualmente se encuentran regulados una amplia gama de sustancias químicas que pueden ser añadidas durante la producción de un alimento y que tienen la facultad de conservarlo, impidiendo la proliferación de microorganismos. La Unión Europea regula el empleo de estos aditivos alimentarios para su armonización en todos los países miembros según el Reglamento (CE) No 1333/2008, y como ejemplo de conservantes autorizados se puede citar el benzoato sódico (E211), el dióxido de azufre (E220) o el ácido bórico (E284). Sin embargo, todas estas sustancias suelen ser apreciadas por el consumidor como poco saludables, observándose una tendencia en el aumento de demanda de productos con una imagen más natural o “verde” (Young, Hwang, McDonald, & Oates, 2010). Los aceites esenciales son líquidos aromáticos obtenidos a partir de plantas y que muy habitualmente son producidos mediante destilación (Van de Braak & Leijten, 1999). En la Figura 1 se muestran las partes aéreas del romero (*Rosmarinus officinalis*) secadas y trituradas y el aceite esencial obtenido a partir del mismo por destilación.

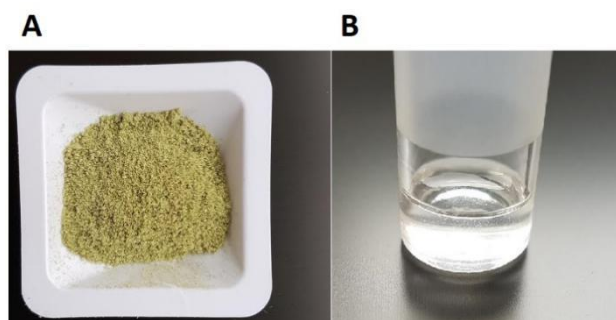


Figura 1. A. Partes aéreas del romero secadas y trituradas. B. Aceite esencial obtenido a partir de las partes aéreas del romero mediante la técnica de destilación.

Estos aceites esenciales se usan en alimentos dentro de la Unión Europea principalmente debido a sus propiedades saborizantes, pero sus propiedades antimicrobianas también se encuentran ampliamente reconocidas. En este sentido, Ye et al. (2013) estudiaron las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los aceites esenciales extraídos de la cebolla, demostrando su efectividad contra *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *R. glutinis*, *S. cerevisiae*, *C. tropicales*, *A. niger*, *M. purpureus* y *A. terreus*. Por otro lado, Wu et al. (2015) prepararon nanoliposomas con aceite esencial de canela, incorporando este agente activo en films de gelatina de pescado y apreciando su actividad antibacteriana sobre *E. coli* y *S. aureus*. Además, Ma et al. (2015) demostraron la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido a partir de zumo de zanahoria, en concreto detectaron daños físicos y alteraciones morfológicas sobre *A. niger* y *S. cerevisiae*. Otros ejemplos pueden encontrarse en la bibliografía sobre la actividad antibacteriana de multitud de aceites esenciales, como el aceite esencial de tomillo (Juven, Kanner, Schved, & Weisslowicz, 1994b), una variedad de rosa (Basim & Basim, 2003), la artemisia (Kordali, Kotan, Mavi, Cakir, Ala, & Yildirim, 2005) o el comino (Iacobellis, Lo Cantore, Capasso, & Senatore, 2005).

En cuanto a la composición de los aceites esenciales, cabe resaltar que son una mezcla compleja de diferentes moléculas. En los aceites esenciales pueden aparecer entre 20 y 60 componentes a muy diferentes concentraciones. Sin embargo, en casi todos los casos pueden encontrarse dos o tres compuestos principales que pueden llegar a suponer entre el 20 y 70% (p/p) de la cantidad total de aceite esencial. Por ejemplo, de acuerdo con Bakkali et al. (2008) el carvacrol (30%) y el timol (27%) son

los componentes principales del orégano (*Origanum compactum*), el linalol (68%) del cilantro (*Coriandrum sativum*), el alfa y beta-tujona (57%) y el alcanfor (24%) de la *Artemisia herba-alba*, el 1,8-cineole (50%) del alcanforero (*Cinnamomum camphora*), y la carvona (58%) y el limoneno (31%) de la semilla del eneldo (*Anethum graveolens*). Estos componentes principales determinarán las propiedades biológicas de los aceites esenciales. Los aceites esenciales están formados por dos grandes grupos de moléculas que tienen diferentes orígenes biosintéticos. El principal grupo es el de los terpenos y terpenoides, mientras que el otro grupo se corresponde con las moléculas aromáticas y alifáticas. En general todas se caracterizan por tener un bajo peso molecular (Figura 2).

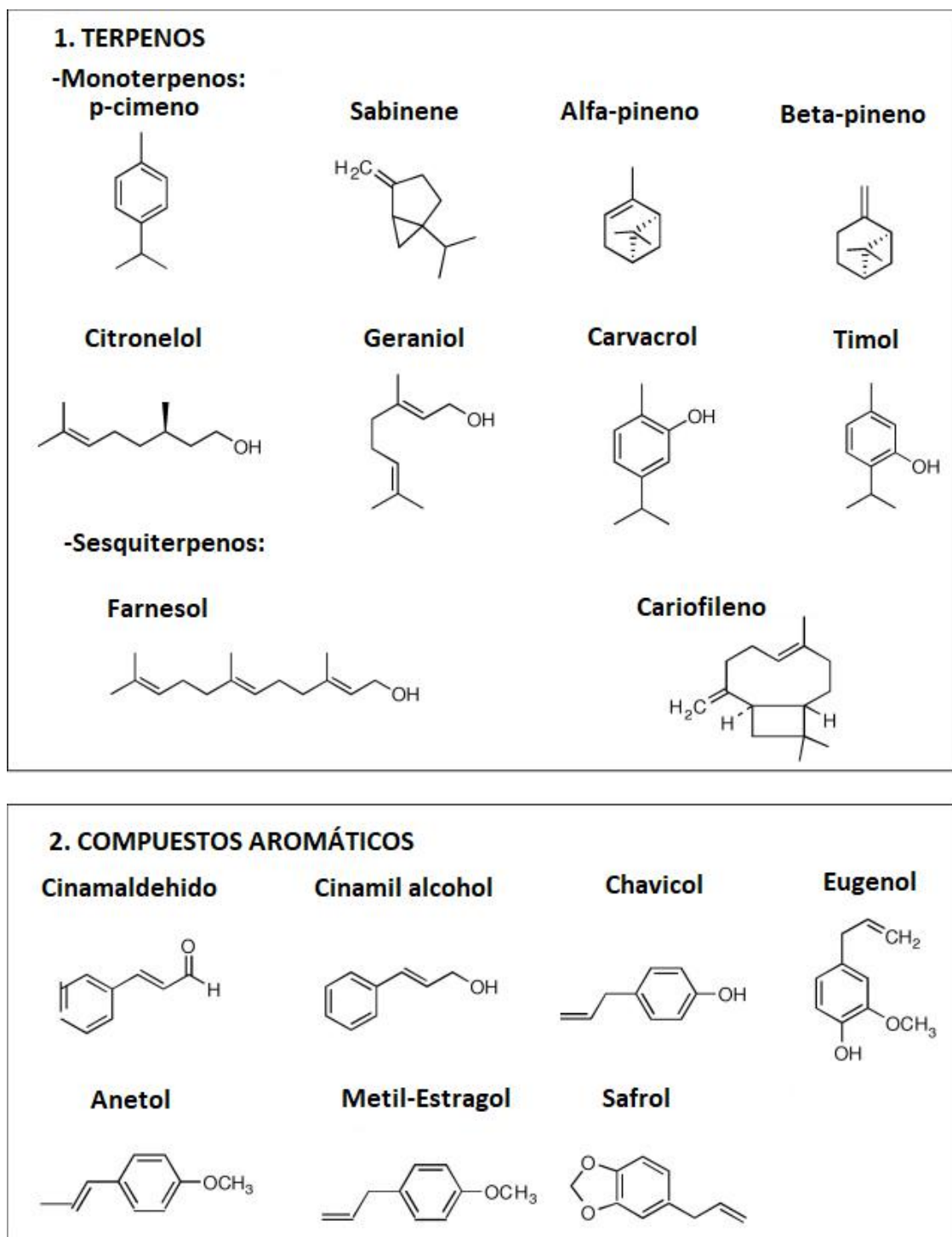


Figura 2. Ejemplo de los dos grandes grupos de moléculas que forman parte de los aceites esenciales. Adaptado de Bakkali et al. (2008)

2.2. El timol

Las propiedades aromáticas y medicinales de las diferentes especies del género *Thymus* se encuentran ampliamente reconocidas. Estas plantas son habitualmente utilizadas para hacer té, como agentes saborizantes (condimentos y especias) y con propósitos medicinales (Stahl-Biskup & Sáez, 2003). Los resultados publicados revelan que el mayor constituyente volátil obtenido de las partes aéreas de la planta son el geraniol, el linalool, el gamma-terpineol, el carvacrol y el timol (Piccaglia, Marotti, Giovanelli, Deans, & Eaglesham, 1993). Además de en los miembros de este género, el timol se encuentra en otras plantas como la *Euphrasia rostkoviana* (Novy, Davidova, Serrano-Rojero, Rondevaldova, Pulkrabek, & Kokoska, 2015), *Monarda fistulosa* (Zamureenko, Klyuev, Bocharov, Kabanov, & Zakharov, 1989), *Origanum compactum* (Bouchra, Achouri, Hassani, & Hmamouchi, 2003), *Origanum dictamnus* (Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis, & Chinou, 2009), *Origanum onites* y *Origanum vulgare* (Lagouri, Blekas, Tsimidou, Kokkini, & Boskou, 1993), además de varios especímenes del género *Ocimum*, *Satureja* y *Thymbra* (Licata, Tuttolomondo, Dugo, Ruberto, Leto, Napoli, et al., 2015; Ravid & Putievsky, 1985).

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un compuesto volátil que es un derivado fenólico de un terpeno, también es conocido como 3-hidroxi-p-cimeno. El timol que se adquiere con una pureza elevada se suele presentar en forma de cristales, en la Figura 3 se muestra el aspecto de estos cristales, así como la fórmula desarrollada del timol. Su producción en las plantas suele ser parte de su estrategia de defensa contra microorganismos fitopatógenos (Vazquez, Fente, Franco, Vazquez, & Cepeda, 2001), por lo que ha suscitado la atención de la industria alimentaria, utilizándose como aditivo para prevenir el crecimiento de hongos en alimentos como el queso (Vazquez, Fente, Franco, Vazquez, & Cepeda, 2001). Sin embargo, su uso es limitado, principalmente debido a la facilidad con la que sublima, a su sensibilidad a la luz y a su baja solubilidad en agua (Mastelić, Jerković, Vinković, Džolić, & Vikić-Topić, 2004).

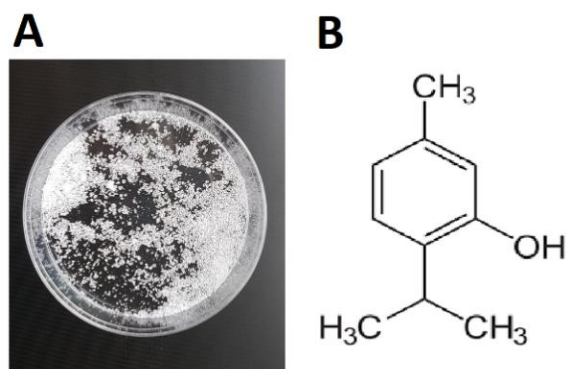


Figura 3. A. Cristales de timol con una pureza >98.0% (Sigma Aldrich, T0501).

B. Fórmula desarrollada del timol.

En cuanto a su digestibilidad, diversos estudios han revelado que la mayoría del timol es rápidamente absorbido o degradado dentro del estómago y el intestino delgado (R. Anderson, Krueger, Byrd, Harvey, Callaway, Edrington, et al., 2009). Una única dosis de timol (0.5 g/kg) puede ser absorbida rápidamente después de ser administrada por vía oral, pero es lentamente eliminada durante las 24 horas siguientes. La máxima concentración en sangre se obtiene después de 30 minutos. Las concentraciones de timol recuperadas en algunos órganos y tejidos como el hígado, pulmones, riñones y músculos han demostrado ser bastante bajas. Sin embargo, se detectó timol en los intestinos, indicando que no es totalmente absorbido (Nieddu, Rassu, Boatto, Bosi, Trevisi, Giunchedi, et al., 2014).

El timol tiene muchos usos, entre los que cabe destacar su aplicación en cremas cosméticas, como aromatizante en perfumes, y en comidas como conservante y como saborizante. De hecho, ha sido autorizado por la Comisión Europea para su uso en alimentación debido a que no afecta a la salud del consumidor. Además, la agencia estadounidense de Administración de Drogas y Comidas (FDA) ha clasificado al timol, y en general a este tipo de sustancias que provienen de aceites esenciales, de “generalmente reconocido como seguro” (GRAS), aprobándose de este modo su uso como aditivo.

En otros ámbitos el timol también se usa como repelente de mosquitos. En particular, el timol fue capaz de repeler a la especie *Culex pipiens pallens* (Park, Choi,

Kim, Kim, & Lee, 2005) y tener un efecto tóxico sobre sus larvas (Zahran & Abdelgaleil, 2011).

2.2.1. Actividad antibacteriana y antifúngica del timol

Numerosos estudios demuestran las capacidades antibacterianas y antifúngicas del timol en particular. Dzàmic et al. (2015) comprobó la eficacia del timol contra bacterias Gram-negativas como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* y *Proteus mirabilis*; contra bacterias Gram-positivas como *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Micrococcus flavus* y *S. aureus*, y también contra hongos como *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Trichoderma viride* y *Candida albicans*. En todos estos casos el timol demostró tener capacidad antibacteriana o antifúngica. Palaniappan et al. (2010) examinaron la efectividad del timol y otros agentes activos encontrados en los aceites esenciales para eliminar bacterias resistentes a antibióticos. En este caso se utilizaron dos especies Gram-negativas, *S. typhimurium* y *E. coli*, además de una bacteria Gram-positiva resistente a eritromicina y penicilina (*S. aureus*). En este estudio se demostró que el timol es una alternativa efectiva para eliminar a estos microorganismos, lo cual, según los autores, podría ser interesante en un ambiente clínico real. En la bibliografía aparecen multitud de autores que han ensayado la actividad antimicrobiana del timol contra diferentes especies de bacterias y hongos. A modo de resumen, en la Tabla 1 se muestran algunos de estos trabajos y sus principales conclusiones.

Tabla 1. Actividades antimicrobianas del timol. Adaptado de Marchese et al. (2016).

Tipo de muestra	Bacteria y hongo	Resultados principales	Referencias
Timol y carvacrol	<i>M. luteus</i>	El timol presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1250 µg/mL	(Hernández-Hernández, Regalado-González, Vázquez-Landaverde, Guerrero-Legarreta, & García-Almendárez, 2014)
Timol	<i>S. typhimurium</i>	CMI: 750 mg/mL	(Chauhan & Kang, 2014)
Aceite esencial de tomillo	<i>H. pylori</i>	CMI: entre 15,4 y 58,0 µg/mL	(Eftekhari, Nariman, Yousefzadi, Hadiand, & Ebrahimi, 2009)
Timol	<i>Pythium insidiosum</i>	CMI: entre 160-320 µg/mL	(Jesus, Ferreiro, Bizzi, Loreto, Pilotto, Ludwig, et al., 2015)
Timol	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i>	CMI: 39 µg/mL para <i>C. albicans</i> y <i>C. krusei</i> ; 78 µg/mL para <i>C. tropicalis</i>	(de Castro, de Souza, Bezerra, Ferreira, de Brito Costa, & Cavalcanti, 2015)
Timol	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	CMI: 0,75 µg/mL para <i>M. tuberculosis</i> y 2,02 µg/mL para <i>M. bovis</i>	(Andrade-Ochoa, Nevárez-Moorillón, Sánchez-Torres, Villanueva-García, Sánchez-Ramírez, Rodríguez-Valdez, et al., 2015)
Timol	<i>S. mitis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. mutans</i>	A una concentración del 0,064% se reduce la adherencia de las bacterias ensayadas	(Rahim, Shaikh, Ismail, Harun, & Razak, 2014)

En cuanto a su mecanismo de actuación, se encuentra relacionado con su capacidad para desestabilizar la bicapa lipídica que constituye la membrana celular de los microorganismos, provocando su desestructuración y la liberación del material intracelular. Este efecto resultó ser dependiente de la composición lipídica de las membranas y de su carga superficial (Trombetta, Castelli, Sarpietro, Venuti, Cristani, Daniele, et al., 2005). Esta afirmación se ha visto confirmada con posterioridad en otros trabajos: Xu et al. (2008) estudiaron los efectos del timol sobre *E. coli* empleando sondas fluorescentes y citometría de flujo para analizar la acción de los monoterpenos sobre la permeabilidad de la membrana y el potencial de membrana. En este estudio los autores concluyeron que estos agentes activos inducen la permeabilización y despolarización de la membrana citoplasmática. Helander et al. (1998) estudiaron y caracterizaron el mecanismo de acción del timol sobre bacterias Gram-negativas, encontrando que el timol fue capaz de desintegrar la membrana exterior de *P. leiognathi* y de disminuir la cantidad de ATP intracelular de *E. coli*, indicando este hecho una desestructuración de la membrana citoplasmática también en este caso. Bennis et al. (2004) detectaron la liberación de componentes celulares en el caso de levaduras (*S. cerevisiae*) tratadas con timol, además de observar por microscopía electrónica las alteraciones causadas en la membrana plasmática por este agente activo (Figura 4). Chauhan et al. (Chauhan & Kang, 2014) observaron también alteraciones en la estructura de la membrana plasmática de las células (*S. typhimurium*) después de ser incubadas en presencia de timol.

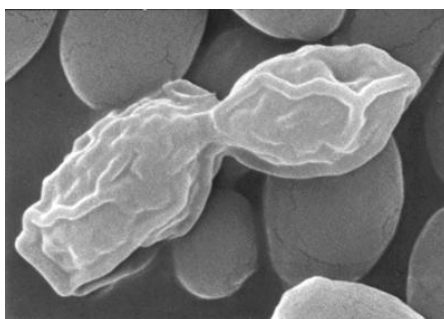


Figura 4. Micrografía de una levadura tratada con timol (Bennis, Chami, Chami, Bouchikhi, & Remmal, 2004).

2.2.2. Actividad antioxidante del timol

Vardar-Ünlü et al. (2003) estudiaron las propiedades antioxidantes del aceite esencial obtenido de *Thymus pectinatus* Fisch. Et Mey. var. *pectinatus*. Uno de los componentes principales de este aceite es el timol, demostrando capacidades antioxidantes superiores a las del butilhidroxitolueno, la curcumina y el ácido ascórbico. Además, el aceite esencial presentó una capacidad superior a la del butilhidroxitolueno y la curcumina para inhibir la peroxidación de los lípidos. De hecho, el timol es capaz de inhibir la oxidación espontánea de los triglicéridos de grasa de cerdo y del aceite de girasol a concentraciones inferiores al 0,20% en solución (Yanishlieva, Marinova, Gordon, & Raneva, 1999). En este sentido, el timol se ha estudiado como suplemento en el pienso para pollos con el objetivo de retrasar el deterioro de las grasas del propio animal una vez producido su sacrificio. En este caso, la suplementación con timol produjo una disminución en la cantidad de malondialdehidos detectados por gramo de tejido húmedo con respecto a los pollos alimentados sin suplementación (Luna, Labaque, Zygadlo, & Marin, 2010).

2.3. Formación de micro y nanopartículas para la encapsulación de moléculas de interés

Se puede producir el empaquetamiento de sustancias de interés en forma de partículas con un tamaño del orden del micrómetro, generándose micropartículas, o del nanómetro, en el caso de las nanopartículas, con el objetivo tanto de proteger el compuesto bioactivo como de controlar su liberación al medio. Estas cápsulas pueden estar fabricadas con multitud de polímeros diferentes, por ejemplo: Donsì et al. (2011) mezclaron varios emulsionantes con diferentes terpenos para formar nanoemulsiones mediante homogeneización a altas presiones. Estas nanoemulsiones fueron ensayadas en zumos a los que previamente se les había inoculado *L. delbrueckii*. En este caso, el uso de las nanopartículas se justifica no sólo por aumentar la eficiencia de los terpenos como agente microbiano, debido a la liberación progresiva del agente activo en el tiempo, sino también para reducir el impacto de estos microbicidas sobre el sabor y el aspecto del zumo. Además de en forma de una emulsión, otra manera de

generar cápsulas es mediante el uso de polisacáridos. En concreto el almidón es biodegradable, biocompatible y digerible por lo que ha sido usado para este propósito por varios autores: Lesmes et al. (2009) encapsularon con almidón ácidos grasos insaturados para favorecer su liberación controlada, e Itthisoponkul et al. (2007) formaron nanopartículas con este hidrato de carbono para contener diferentes saborizantes. Además, las proteínas también se han estudiado como agentes encapsulantes: Yi et al. (2015) crearon nanopartículas a partir de proteína de suero, caseinato sódico y proteína de soja para contener beta-caroteno, observándose un aumento en las propiedades antioxidantes del agente activo y favoreciendo su liberación continuada en el tiempo.

2.3.1. Nanopartículas de timol

Una de las principales limitaciones tecnológicas del timol se refiere a su baja solubilidad en agua. Los valores de solubilidad que aparecen en la bibliografía varían según la fuente consultada, pudiendo ser de 0,846 mg/mL (Griffin, Wyllie, Markham, & Leach, 1999), 1 mg/mL a 20 °C (Shah, Davidson, & Zhong, 2012), o incluso 1,05 mg/mL (Chen, Davidson, & Zhong, 2014). En cualquier caso, estas bajas concentraciones limitan la incorporación de este agente activo en las matrices alimentarias (Griffin, Wyllie, Markham, & Leach, 1999). El empaquetamiento del timol en forma de nanopartículas podría conllevar una serie de ventajas: en una dispersión acuosa, el movimiento Browniano es el mecanismo que domina la dinámica de las nanopartículas, lo cual previene su sedimentación por efecto de la gravedad o su acumulación en las capas superiores del fluido (Huang, 2012). Además, la solubilidad de los compuestos aumenta cuando se empaqueta en forma de nanopartículas (Hiemenz, 1986), lo que, junto al incremento en el área superficial favorece el contacto con los microorganismos y su distribución en las matrices alimentarias (Weiss, Gaysinsky, Davidson, & McClements).

En el estudio llevado a cabo por Shah et al. (2012) se crearon nanopartículas de timol, de un tamaño de entre 58 y 100 nm, por el método de secado en espray. Para ello, solubilizaron el timol en hexano y formaron una emulsión añadiendo agua, para

a continuación someter a la mezcla al proceso de secado. Estos autores ensayaron las capacidades antimicrobianas de las nanopartículas de timol en sidra y leche inoculadas con *E. coli* y *L. monocytogenes*. Las concentraciones de timol ensayadas variaron entre 0,3 y 1,0 mg/mL de timol, además, los ensayos se hicieron a diferentes temperaturas. A concentraciones superiores a 0,5 mg/mL de timol tanto las nanodispersiones como el timol libre presentaron un comportamiento similar (bactericida). Aunque en este trabajo no se hicieron pruebas organolépticas, los autores afirman que sus nanopartículas son capaces de contener una gran cantidad de timol sin afectar ni al sabor ni a la apariencia visual de los alimentos ensayados.

Por otro lado, Pan et al. (2014) produjeron nanopartículas de caseinato de sodio de 110 nm que contenían timol. En su elaboración los autores aprovecharon la capacidad del timol de unirse a proteínas, mezclando por agitación el caseinato y el terpeno y esperando a que se formaran las nanopartículas de manera espontánea. La dispersión resultante fue estable durante los 30 días ensayados a temperatura ambiente. En este caso se mostró una ligera disminución en el tamaño de las nanopartículas, lo cual descarta cualquier proceso de recristalización por parte del timol (maduración de Ostwald) durante el almacenamiento. El timol encapsulado mostró capacidades antimicrobianas aumentadas con respecto a una dispersión similar de cristales de timol en leche inoculada con *L. monocytogenes*.

Li et al. (2012) prepararon nanopartículas utilizando a la zeína como agente encapsulante. Esto se debe a que la zeína es la prolamina del maíz, siendo las prolaminas un conjunto de proteínas que aparecen en los cereales y que se denominan así debido a su alto contenido en prolina y glutamina. Precisamente esta particular composición permite que estas proteínas sólo sean solubles en soluciones fuertemente alcohólicas y, por tanto, insolubles en medios acuosos. Esta característica es aprovechada para preparar soluciones de esta proteína con altas concentraciones de timol, ya que el timol también presenta una gran solubilidad en etanol (744 mg/mL a 30,9 °C) (Villanueva Bermejo, Angelov, Vicente, Stateva, Rodríguez García-Risco, Reglero, et al., 2015). En estas condiciones la adición de agua al medio provocará una disminución en la concentración de etanol y por tanto la precipitación en forma de

micro o nanopartículas de la zeína junto con el timol. Este procedimiento es denominado precipitación por la adición de un antisolvente (*antisolvent precipitation*). Con estas nanopartículas, estos autores prepararon directamente films utilizando glicerol como plastificante. Aunque las nanopartículas tenían originalmente un diámetro de 200 nm, durante el secado de los films las nanocápsulas formaron agregados de mayor tamaño (Figura 5.A), lo cual se relacionó con su carga en timol. Debido a la formación de estos agregados las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua de los films resultó perjudicada. Estos films mostraron capacidades antimicrobianas contra *E. coli* y *Salmonella* así como propiedades antioxidantes.

De una manera muy similar, Zhang et al. (2014) utilizaron la técnica de precipitación con un antisolvente descrita anteriormente para cargar nanopartículas de zeína con timol, estas nanopartículas fueron estabilizadas con caseinato de sodio y quitosano. Las nanopartículas obtenidas aumentaron de tamaño al añadir el quitosano, pero adquirieron una conformación esférica bien definida (Figura 5.B), sin embargo, el quitosano produjo algunas irregularidades en su superficie. Las nanopartículas con quitosano mostraron ser liofilizables y fácilmente dispersables. En este caso, el timol encapsulado mostró propiedades antimicrobianas contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans* superiores a las mostradas utilizando timol libre.

Chen et al. (2015) también encapsularon timol y eugenol en nanopartículas de zeína/caseína para a continuación secarlas en spray. Estas nanopartículas tenían un tamaño de 200 nm y una forma esférica (Figura 5.C). Resultaron ser estables durante 15 días de almacenamiento bajo refrigeración, además, mostraron una liberación controlada de timol durante 24 horas. Las nanopartículas presentaron actividad bactericida sobre *E. coli* y *L. monocytogenes*, bacterias que fueron previamente inoculadas en leche.

Xue et al. (2014) prepararon nanodispersiones de timol en forma de complejos junto con gelatina y lecitina, consiguiendo dispersiones translúcidas y estables a pHs entre 5,0 y 8,0. El tamaño de estas nanocápsulas variaba entre los 47 y 85 nm según sea la combinación de ingredientes ensayada, además presentaban una forma esférica

pero con irregularidades (Figura 5.D). Se determinó que las interacciones electroestáticas entre la gelatina, la lecitina y el timol son las fuerzas que favorecen la formación de estas nanopartículas. Debido a su carga superficial, y especialmente gracias a la contribución de la lecitina, se evitaron fenómenos de agregación y de recristalización.

da Rosa et al. (2015) cargaron nanopartículas de zeína con timol, evaluando su estabilidad durante el almacenamiento a 4 °C y 20 °C durante 90 días, su capacidad antioxidante, la liberación controlada de timol y su actividad antimicrobiana. Estas nanopartículas fueron estables bajo las condiciones de almacenamiento analizadas, mostrando actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella enterica* y *S. aureus* y liberando el 50% de su contenido en timol en 72 horas. Estos autores encontraron una fuerte interacción del timol con las paredes de las nanopartículas, no siendo posible liberar al medio más del 50% de su contenido. Las nanopartículas tenían una forma esférica (Figura 5.E) y un tamaño de 109,2 nm.

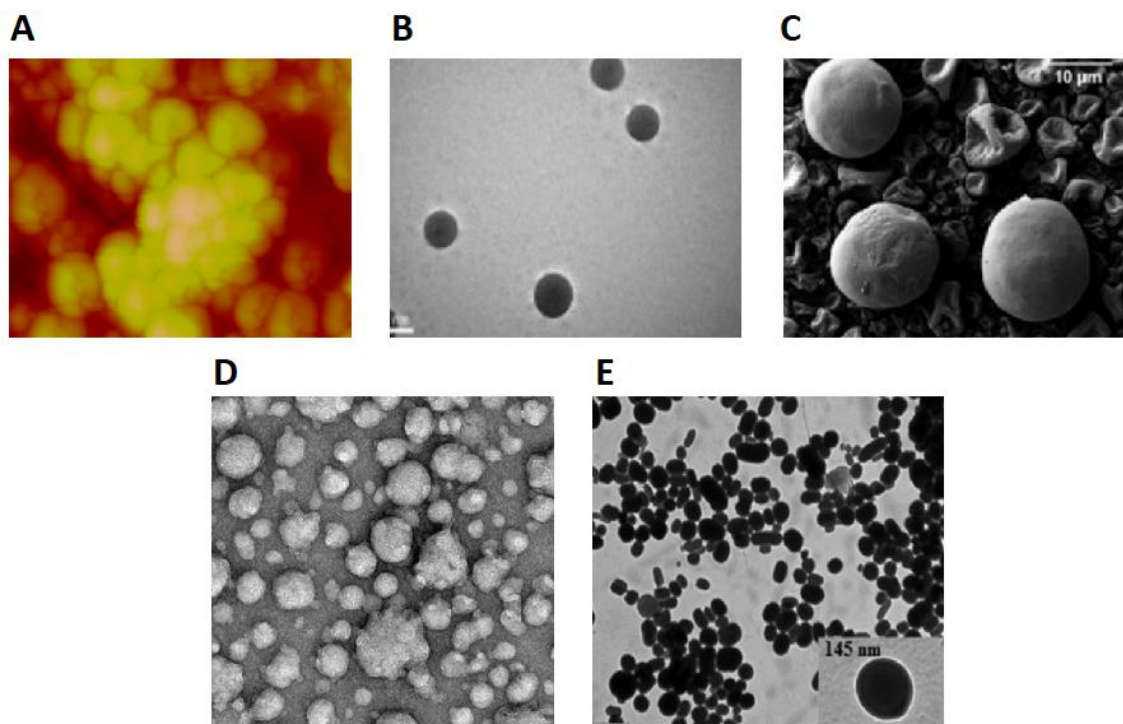


Figura 5. Micrografías de las nanopartículas preparadas según las investigaciones de los siguientes autores: A. Li et al. (2012), microscopía de fuerza atómica (MFA). B. Zhang et al. (2014), microscopía electrónica de transmisión (MET). C. Chen et al. (2015), microscopía electrónica de barrido (MEB). D. Xue et al. (2014), MET. E. da Rosa et al. (2015), MET.

2.3.2. Micro y nanopartículas de ácido poliláctico (APL)

El APL se ha usado ampliamente con diferentes propósitos, especialmente dentro de la biomedicina debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y a su carencia de toxicidad. Dentro de sus aplicaciones biomédicas clásicas destaca la de fabricación de hilo para sutura, placas para los huesos, y para favorecer la liberación controlada de drogas (Freiberg & Zhu, 2004). En la Tabla 2 se describen algunos ejemplos de productos que se comercializan actualmente y cuya composición se basa en partículas de APL o APLG (ácido poliláctico co-glicólico) con el objetivo de liberar un compuesto activo con propiedades terapéuticas.

Tabla 2. Fórmulas basadas en partículas de APL/APLG y un compuesto activo que se comercializan en la actualidad (Lee, Yun, & Park, 2016).

Nombre	Ingrediente activo	Compañía	Aplicación
Lupaneta pack	Acetato de leuprolide y acetato de Noretindrona	AbbVie endocrine	Cáncer de próstata
Pamorelin LA®	Pamoato de triptorelin	Galenica	Cáncer de prostata
Somatuline LA®	Acetato de lanreotida	Ipsen	Acromegalia
Arestin®	Minociclina	Orapharma	Enfermedad periodontal
Risperidal®	Risperidona	Johnson & Johnson	Antisicótico

Una de las ventajas de usar APL para fabricar micro y nanopartículas es su flexibilidad. Algunas de las propiedades físicas de las partículas que se forman, como el tamaño o la forma, pueden ser fácilmente controladas para adaptarse a las necesidades de la preparación. Típicamente, estas partículas pueden presentarse como

esféricas, cápsulas, o cubos (Pagels & Prud'homme, 2015; Zhao, 2013). Además, durante su preparación el ingrediente activo se dispersa homogéneamente dentro de la matriz de APL (Kamaly, Xiao, Valencia, Radovic-Moreno, & Farokhzad, 2012). En cuanto a su metabolización, las nanopartículas se encuentran disponibles para ser endocitadas directamente por fagocitosis dentro de los leucocitos, monocitos, macrófagos y otras células del sistema endotelial reticular (hígado, bazo, etc...). Precisamente, la aplicación intravenosa de estas nanopartículas, aunque ofrece la oportunidad de alcanzar una gran variedad de órganos, tiene la desventaja de poder ser eliminadas del medio por el sistema reticuloendotelial. Otra vía de administración puede ser mediante inyección directa dentro de los tejidos sólidos u órganos, dentro de las cavidades corporales, incluyendo el espacio intraperitoneal o el espacio pleural (J. M. Anderson & Shive, 2012). Finalmente, las micro y nanopartículas de APL mejoran la biodisponibilidad por vía oral de fármacos que no son solubles en agua (Takeuchi, Yamamoto, & Kawashima, 2001). El intestino tiene mecanismos especiales para absorber partículas de ciertos tamaños. Las partículas de 100 nm muestran una mayor absorción por esta vía que las partículas de mayor tamaño (Hsu, Cui, Mumper, & Jay, 2003).

2.3.3. Técnicas de preparación de micro y nanopartículas de APL

De acuerdo a Lee et al. (2016) existen diferentes técnicas para preparar este tipo de partículas a partir de APL. Todas estas técnicas se podrían clasificar en cuatro categorías. La primera categoría comprende a aquellas técnicas que se basan en la formación de emulsiones, ya sean simples, dobles o múltiples. La segunda categoría se basa en métodos de precipitación, los cuales incluyen nanoprecipitación, *salting out*, y diálisis. La categoría 3 comprende la formación directa de estas partículas por métodos como el secado en spray o la utilización de fluidos supercríticos. La categoría 4 incluye nuevas aproximaciones como microfluídica o métodos basados en la formación de moldes. A continuación se detallarán algunas de estas técnicas.

2.3.3.1. Emulsiones simples

Uno de los métodos más empleados es el de la emulsión simple. Muchos agentes activos hidrofóbicos se disuelven junto con el PLA en algún disolvente orgánico inmisible en agua, para a continuación ser emulsionados en un medio acuoso que contiene un estabilizador. Para producir esta emulsión la mezcla se expone a una fuente de alta energía, como los ultrasonidos o un homogeneizador mecánico. En la Figura 6 se aprecia una solución de diclorometano con APL emulsionada en agua mediante el uso de ultrasonidos. El disolvente orgánico debe de ser posteriormente evaporado y las partículas recuperadas por centrifugación o filtración. Finalmente se lavan con agua destilada o alguna solución tamponadora de pH para eliminar el estabilizante residual y el agente activo que no se haya encapsulado (Wischke & Schwendeman, 2008). Mediante esta técnica se pueden producir partículas con un tamaño que se puede ajustar entre los nanómetros y los micrómetros controlando la tasa de agitación y otros parámetros experimentales.



Figura 6. Emulsión de aceite en agua en la cual la fase dispersa es una solución de APL en diclorometano.

Usando esta metodología, Freitas et al. (2005) encapsularon nimesulida, un antiinflamatorio no esteroideo, en microesferas de APL. En este caso el tamaño de partícula obtenido fue de 2,1 μm con una eficiencia de encapsulación del 70%. En este caso, parte del fármaco que queda encapsulado se libera rápidamente durante los primeros instantes de exposición al medio, para a continuación tener una liberación controlada durante 108 horas. Esta liberación abrupta inicial es indeseada para ciertos fármacos, ya que podría causar problemas de toxicidad.

De una manera muy similar, Dalmolin et al. (2016) encapsularon vanillina con

APL, obteniéndose partículas de 240 nm. La vanillina es uno de los principales constituyentes de la semilla de la vainilla (*Vanilla planifolia*), y un aromatizante ampliamente utilizado en aplicaciones alimentarias y cosméticas. Además, tiene propiedades antioxidantes y antitumorales. En este caso se consiguió una eficacia de encapsulación del 41%.

Roussaki et al. (2014) encapsularon aureusidina, que es un antioxidante natural fotosensible y con una muy baja solubilidad en agua, lo cual limita sus posibles aplicaciones. Mediante la encapsulación en nanopartículas de APL estos inconvenientes pueden verse superados. Estos autores consiguieron tasas de encapsulación de hasta el 97,99% en las mejores preparaciones ensayadas. Además, las nanopartículas preparadas demostraron ser estables en el tiempo, aguantando casi sin sufrir alteraciones durante los 134 días que duró el experimento.

Kumari et al. (2011) trabajaron con quercitrina y APL. La quercitrina es otro antioxidante natural que se ha aislado en algunas plantas medicinales. Además de propiedades antioxidantes, también demuestra tener actividad contra la malaria y antiinflamatoria. Como en el caso de la aureusidina, esta partícula presenta una pobre solubilidad. En este caso se consiguieron producir nanopartículas de APL de 250 nm

2.3.3.2. Emulsiones dobles

Mediante emulsión simple se pueden encapsular de manera efectiva agentes activos que sean insolubles en agua, sin embargo, aquellas moléculas hidrofílicas presentarán una pobre tasa de encapsulación, ya que a la hora de formar la emulsión tenderán a ir hacia la fase continua. Así, para intentar corregir este inconveniente se suele recurrir a la formación de emulsiones dobles. En este caso el agente activo solubilizado en agua se dispersa mediante algún tipo de agitación en una fase orgánica. Esta emulsión de agua en aceite se añade dentro de una segunda fase acuosa que contiene algún tipo de estabilizante, resultando en la formación de una emulsión de agua/aceite/agua. La fase orgánica se elimina a bajas presiones para finalmente producirse las partículas poliméricas. En este caso hay diferentes parámetros que

tienen que ser ajustados para optimizar las características de las partículas preparadas por el método de doble emulsión, como por ejemplo la cantidad de agente activo a añadir, la concentración del polímero, el tipo de solvente, la concentración de estabilizador, el volumen de la segunda fase acuosa, la tasa de agitación y otras variables (Martín-Sabroso, Fraguas-Sánchez, Aparicio-Blanco, Cano-Abad, & Torres-Suárez, 2015; Tan & Danquah, 2012).

Zambaux et al. (1999) utilizando esta metodología encapsularon la proteína C, una proteína del plasma sanguíneo que regula la respuesta anticoagulante, en nanopartículas de APL. La deficiencia de esta proteína puede contrarrestarse hasta cierto punto mediante una inyección intravenosa de la misma. Sin embargo, su estabilidad en plasma es muy corta, menos de 6 horas, por lo que su encapsulación podría proteger su integridad física y por tanto prolongar su efecto *in vivo*, como así demostraron estos autores.

2.3.3.3. Salting out

Mediante este método se persigue la precipitación de los polímeros disueltos tal y como habitualmente se utiliza esta técnica para la separación de proteínas. En este caso se persigue la precipitación del APL desde una fase orgánica de un disolvente soluble en agua mientras se emulsifica en una solución salina que contiene algún estabilizante como el alcohol de polivinilo (APV). Mientras se añade cada vez más agua al sistema, la fase orgánica se va extrayendo lentamente, mientras que el polímero va formando preferiblemente micropartículas.

De esta manera, Leroux et al. (1996) prepararon nanopartículas de APL modificadas con polietilenglicol 6000 y 20000 para evitar su captación por el sistema mononuclear fagocítico, y así poder preparar fármacos inyectables por vía intravenosa.

2.3.3.4. Diálisis

La diálisis es un método simple y efectivo para producir nanopartículas. En este caso el polímero es disuelto en un disolvente orgánico y situado en un tubo de diálisis.

La diálisis se lleva a cabo en un medio no soluble para el polímero pero soluble por el disolvente orgánico. El disolvente orgánico es desplazado hacia fuera del tubo a lo largo del tiempo, resultando en una pérdida de solubilidad por parte del polímero, y en consecuencia, se produce la formación de los agregados.

Siguiendo esta metodología, Xiong et al. (2007) diseñaron nanopartículas en base a APL cargadas de insulina para ser suministradas por vía oral, obteniéndose resultados positivos tanto *in vitro* como *in vivo*.

2.3.3.5. Secado en espray

Con este método se pueden producir partículas de manera continua. El agente activo es disuelto o disperso en la fase orgánica junto con el polímero. A continuación, se forma un espray con esta solución, produciéndose la evaporación de la fase orgánica de manera instantánea. Aunque esta técnica se puede desarrollar de manera sencilla, es difícil controlar la distribución del agente activo dentro de las partículas. Esta técnica es especialmente útil para la producción de partículas que contengan un agente activo hidrofóbico (Mu, Teo, Ning, Tan, & Feng, 2005).

Guerrero et al. (2008) produjeron microesferas de APL cargadas de ketotifeno, un antihistamínico, mediante la técnica de secado en espray. En este caso se obtuvo una eficacia de encapsulación del 74% cuando se utilizó APL, y una liberación controlada del 57% del ketotifeno encapsulado en 350 horas.

2.3.3.6. Método de fusión

Mediante esta técnica se evita el uso de disolventes orgánicos, pero el agente activo debe de ser dispersarse junto con el polímero fundido. Esta mezcla se solidifica cuando se pone en contacto con agua fría o cuando se deposita directamente en una cámara ambiental que provea aire frío y seco. A continuación, el producto sólido obtenido puede ser molido para formar las partículas. Si se desea conseguir partículas esféricas o disminuir su tamaño, se puede generar una emulsión sobre el molido añadiendo una solución caliente que contenga un emulsificador (Wichert & Rohdewald, 1990). Sin embargo esta técnica tiene dos limitaciones que deben de

tenerse en cuenta: en primer lugar, el agente activo debe de poder aguantar las altas temperaturas a las que se operan; en segundo lugar, este es un método con multitud de pasos hasta que se llegan a obtener las micropartículas con una forma regular (Wischke & Schwendeman, 2008).

Smith et al. (1986) encapsularon mediante esta metodología la prednisolona en micropartículas de APL, un fármaco para paliar los síntomas producidos por presentar niveles bajos de corticosteroides.

2.3.3.7. Microfluídica

Con esta técnica se pueden desarrollar partículas de APL uniformes con relativa facilidad. Esta ventaja permite que mediante esta técnica las partículas formadas puedan liberar el agente activo de manera controlada y uniforme, ya que precisamente el tamaño y la forma de las partículas es un primer determinante en la cinética de liberación de sus compuestos (Freiberg & Zhu, 2004). En este caso, las partículas son producidas mediante la técnica de emulsión de aceite en agua en microrreactores de flujo continuo. Los polímeros son disueltos en un disolvente orgánico junto con el agente activo, a continuación, se carga en el reactor, para ser finalmente eyectada junto con una gran cantidad de solución estabilizadora. El disolvente orgánico difunde desde las gotas que se están formando hacia la fase acuosa, y luego las gotas se solidifican en forma de microesferas debido a la diferencia de solubilidad del disolvente en el agua.

3 - MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

El APL (180 kDa) ha sido producido por NatureWorks bajo la marca Ingeo™ (4032D). Este APL ha sido utilizado con anterioridad para producir andamios 3D para el cultivo de células, por lo que su biocompatibilidad ya ha sido ensayada (Borowiec, Hampl, Gebinoga, Elsarnagawy, Elnakady, Fouad, et al., 2015). Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Aldrich (St Louis, USA): timol (ref. T0501), diclorometano (DCM, ref. 270997), alcohol de polivinilo (APV, ref. P8136), solución tamponadora Trizma® (ref. T1819), el 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, ref. D9132), sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS⁺, ref. A1888), y medio *Nutrient Broth* (NB, ref. 70149NB). El agar se adquirió en VWR (Pensilvania, USA) y el medio de soja-triptona (ST) fue suministrado por Biokar Diagnostics (Grupo Solabia, Francia). Los tubos de diálisis fueron de la marca SnakeSkin™, con un MWCO de 10 kDa (ref. 68100, ThermoFisher, Waltham, USA).

3.2. Preparación de nanopartículas

Se preparó una solución con una concentración de APV del 1% que fue saturada con timol. Para prepararla, en primer lugar, se calentó el APV en agua destilada en un baño a 90 °C hasta su completa solubilización. Una vez esta solución se enfrió hasta alcanzar la temperatura ambiente, se añadió timol a una concentración de 2 mg/mL. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante toda la noche para a continuación ser filtrada dos veces consecutivas y así retirar el exceso de timol. Para la primera filtración se utilizó papel Whatman de grado 1, y para la segunda se usó un filtro de PVDF de 0,45 µm.

El APL fue disuelto en 5 mL de DCM a una concentración variable entre el 2 y el 4% (p/p). De igual manera, entre 66 y 266 mg de timol fueron disueltos en 2,5 mL de DCM. Estas dos soluciones se mezclaron y los 7,5 mL de diclorometano con APL y timol se vertieron sobre la solución de APV saturada en timol descrita anteriormente. Esta mezcla se sometió a ultrasonificación durante 2,5 minutos usando el sistema Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Alemania), equipado con una sonda MS 73, a una

frecuencia de 20 kHz y aplicando una amplitud de sonicación del 90% (100% de amplitud equivalen a 212 μm). Durante el proceso de ultrasonificación la muestra se mantuvo en hielo para evitar el aumento de temperatura. Para eliminar el diclorometano contenido en la preparación, la solución emulsionada resultante se trató con bajas presiones a 40 °C y durante 50 mins en un rotavapor (Büchi R-205, Büchi Labortechnik, Essen, Alemania). A continuación, se centrifugó la muestra a 13000 rpm durante 20 minutos para provocar la precipitación de todas las nanopartículas, el sobrenadante se desechó para así retirar el exceso de APV y de timol, y se añadió el mismo volumen de agua destilada. Las nanopartículas se resuspendieron y se sometieron nuevamente a centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos, el sedimento se descartó. El proceso para preparar las nanopartículas aparece esquematizado en la Figura 7.

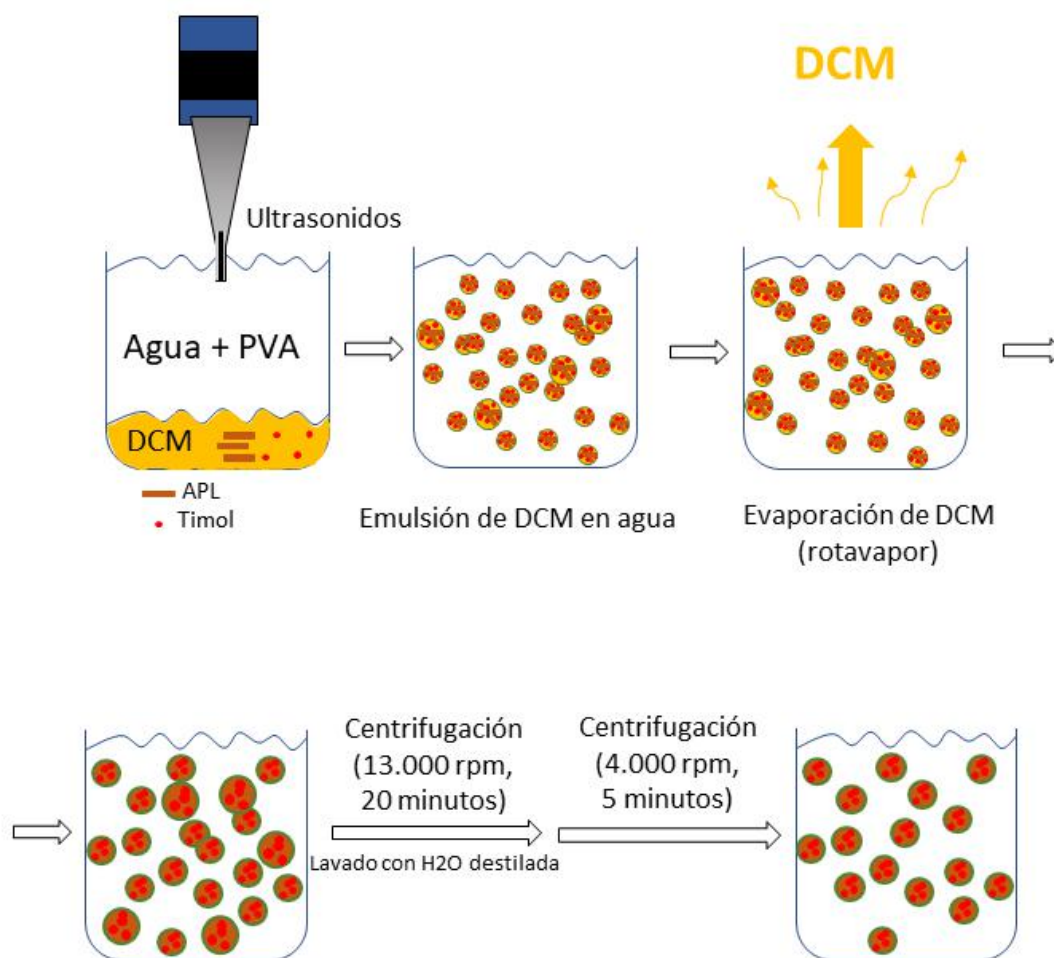


Figura 7. Esquema sobre la producción de nanopartículas de APL cargadas de timol.

3.3. Cálculo de tamaño y contenido en timol

El tamaño medio de las nanopartículas fue medido mediante un dispositivo de dispersión de luz dinámica (DLD) (nanosizer zs, Malvern, UK). Además, también se calculó el índice de polidispersión (IPD) en cada caso.

En cuanto a la cuantificación del contenido en timol encapsulado se realizó una extracción con etanol: la muestra líquida que contiene las nanopartículas se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante fue retirado y substituido por el mismo volumen en etanol (96°). El sedimento, en donde se encuentran las nanopartículas, se dispersó en el etanol con ayuda de un sonicador, para a continuación, volverse a centrifugar la mezcla a 13000 rpm durante 20 minutos. Debido a la gran solubilidad del timol en etanol, durante este proceso se consigue extraer el agente activo contenido en las nanopartículas, quedando en el sobrenadante. Finalmente, a 9,9 mL de etanol se le añadieron 0,1 mL de este sobrenadante y la absorbancia se midió a 275 nm con ayuda de un espectrofotómetro (Spekol 1500, Analytik Jena AG, Jena, Alemania). Previamente, cantidades conocidas de timol fueron disueltas en etanol, realizándose una recta de calibrado a esa misma longitud de onda.

3.4. Diseño experimental

Un diseño experimental de superficie de respuesta fue utilizado para describir el efecto de la concentración de APL y timol sobre el tamaño de las nanopartículas y la eficacia de encapsulación. Los parámetros utilizados y sus rangos de valores fueron identificados como variables clave en base a estudios previos desarrollados en el laboratorio. De acuerdo a esto, un diseño central compuesto (DCC) con dos variables independientes y tres niveles diferentes fue desarrollado. Según lo expuesto anteriormente, en 5 mL de DCM se disolvieron tres cantidades diferentes de APL, y con respecto a cada una de esas cantidades de APL se ensayaron tres porcentajes en peso de timol (Figura 8). Cada variable independiente fue codificada (-1, 0, +1) y los valores codificados y los reales aparecen en la Tabla 3. Los resultados obtenidos se

modelizaron dando como resultado una ecuación de segundo orden (Ecuación 1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Ecuación 1})$$

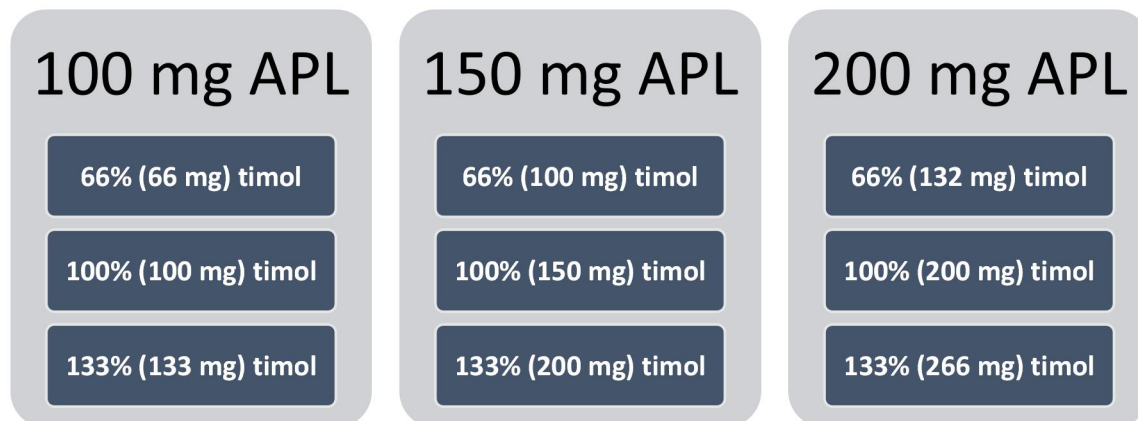


Figura 8. Detalle de las cantidades de APL y timol con las que se realizó el diseño experimental.

3.5. Caracterización de la forma de las nanopartículas

Una gota de la solución de nanopartículas fue dejada secar sobre una cuadrícula de cobre con una capa de carbón y observada usando un microscopio de transmisión electrónica (MET JEOL-2000 EX-II, Tokio, Japón) operando a 200 kV. De las micrografías tomadas se reportan aquellas que se consideraron representativas de la muestra analizada. Además, también se realizaron micrografías de las nanopartículas mediante MEB (JSM-6610LV, JEOL, USA). En este caso, una gota de cada una de las muestras se dejó secar sobre un portaobjetos de cristal, para a continuación impregnar el conjunto en oro y proceder a la observación. El microscopio electrónico de barrido se operó a 20 kV.

3.6. Análisis de termogravimetría (TG)

Para obtener las curvas de termogravimetría se utilizó un TGA analyser SDTA851e (Mettler-Toledo, Suiza) desde los 30 °C hasta los 700 °C bajo atmósfera de nitrógeno. La tasa de calentamiento fue de 10 °C /min. En este caso se analizaron las nanopartículas cargadas con timol, el propio APL y los cristales de timol.

3.7. Ensayos de estabilidad con el tiempo

Las nanopartículas desarrolladas fueron almacenadas a 5 °C y periódicamente se analizó su tamaño y su IPD mediante DLD. Además, también se evaluó su contenido en timol.

3.8. Ensayos de estabilidad a diferentes pHs

Se prepararon soluciones tamponadoras a diferentes pHs y a una concentración 0,01 M. A pH 4,0 se preparó una solución tamponadora de fosfato disódico-citrato y a pH 9,0 una solución de carbonato sódico-bicarbonato de sodio. A pH 7,0 se dispuso de una solución tamponadora Trizma®. Para medir cómo el pH puede afectar al tamaño, al IPD o al contenido en timol de las nanopartículas, una preparación fresca de nanopartículas fue centrifugada a 13000 rpm durante 20 minutos y el sedimento dispersado en cada una de las soluciones tamponadoras. Estas nanopartículas se almacenaron a 5 °C y sus propiedades fueron evaluadas a diferentes días.

3.9. Ensayos de liberación de timol

Para evaluar la liberación de timol desde el interior de las nanopartículas, 10 mL de una preparación elaborada el mismo día del ensayo fueron depositados en un tubo de diálisis con un MWCO de 10 kDa. Este tubo de diálisis fue dispuesto en un baño termostatzado con refrigeración y con corriente de agua (ref. 3001373, J. P. Selecta, Barcelona, España). Se ensayaron diferentes temperaturas de inmersión, y cada cierto tiempo, una alícuota de 0,5 mL era recuperada del interior del tubo de diálisis y el contenido en timol calculado. Para caracterizar la liberación de timol los datos obtenidos se ajustaron a diferentes modelos matemáticos. Las ecuaciones utilizadas incluyen una de primer orden (ecuación 2) y la ecuación de Korsmeyer-Peppas (ecuación 3) (J. Siepmann & Peppas, 2001).

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 1 - e^{-kt} \quad (\text{ecuación 2})$$

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = k \times t^n \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde $\frac{Mt}{M_{\infty}}$ es el porcentaje acumulado de timol liberado a cada tiempo (t), k es la constante de la tasa de liberación de timol y n es el exponente de difusión que caracteriza el mecanismo de liberación del agente activo.

3.10. Propiedades antioxidantes, DPPH y ABTS⁺

Se repitió el ensayo de liberación de timol pero cambiando el diseño del experimento. En esta ocasión, la solución con las nanopartículas se dispuso en alícuotas de 1 mL que se incubaron a 37 °C durante 7 horas. A cada hora, cada alícuota fue centrifugada a 13000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue completamente retirado y el sedimento, donde aparecen las nanopartículas, nuevamente resuspendido en agua destilada. Se evaluaron las propiedades antioxidantes de cada sobrenadante de acuerdo a su capacidad para retirar del medio a los radicales ABTS⁺ y DPPH.

En cuanto al ensayo con ABTS⁺, el procedimiento empleado fue similar al descrito por Watchararujj et al. (2008). De acuerdo con estos autores, se realizó una preparación 7,0 mM del radical ABTS⁺ y 2,45 mM de persulfato potásico en agua destilada. Esta solución stock se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas antes de ser utilizada. A continuación, a partir del stock se preparó una solución diluida con agua destilada con una absorbancia de $0,70 \pm 0,06$ a 734 nm en una cubeta con 1 cm de paso óptico. Alícuotas de 0,166 mL del sobrenadante de las nanopartículas fueron mezcladas con 4,8 mL de esta solución de ABTS⁺ diluida, y la mezcla se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, la absorbancia de la mezcla fue medida a 734 nm. Se realizó un control negativo en el cual el sobrenadante fue substituido completamente por agua destilada. Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante (AAO%) a cada tiempo según la siguiente ecuación:

$$AAO\% = [1 - (A_t/A_r)] \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde A_t es la absorbancia de la muestra y A_r es la absorbancia del control negativo.

La capacidad de retirar del medio el radical DPPH se determinó de acuerdo con Tanzadehpanah et al. (2012) con algunas modificaciones. Se preparó una mezcla que contenía 0,6 mL de DPPH 1,0 mM, 4,0 mL de etanol y 0,025 mL de cada sobrenadante ensayado. Esta mezcla se agitó de manera vigorosa y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se midió su

absorbancia a 517 nm ($A_{muestra}$). La solución control contenía 4,0 mL de etanol, 0,6 mL de DPPH y 0,025 mL de agua destilada, su absorbancia fue medida en las mismas condiciones ($A_{control}$). Además, se tuvo en cuenta la absorbancia de la muestra a esa longitud de onda ($A_{intrínseca}$), para ello se preparó con cada sobrenadante una solución con 0,025 mL de muestra y 4,6 mL de etanol. Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\left(A_{control} - (A_{muestra} - A_{intrínseca}) \right) / A_{control} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

3.11. Propiedades antimicrobianas

3.11.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo

Los ensayos antimicrobianos se llevaron a cabo empleando tres cepas indicadoras diferentes, dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* CECT 101 y *Pseudomonas taetrolens* LMG 2336) y una bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus* CECT 240).

E. coli y *P. taetrolens* crecieron empleando medio NB, suplementado con un 2% de agar. Para el crecimiento de *S. aureus* se empleó medio ST, suplementado con un 2% de agar. Las tres cepas se incubaron a 30 °C durante 48 horas.

3.11.2. Detección de la actividad inhibitoria del timol libre y encapsulado en nanopartículas

El efecto inhibitorio del timol, tanto en su forma libre como encapsulado en nanopartículas, se comprobó mediante ensayos de difusión en placa empleando las cepas antes indicadas. Para ello, las cepas *E. coli* y *P. taetrolens* se inocularon en medio NB líquido y se incubaron a 30 °C con una agitación de 250 rpm durante 12 horas. La cepa *S. aureus* se inoculó en medio TS líquido y se incubó a 30 °C con una agitación de 250 rpm durante 12 horas.

Para el ensayo de difusión empleando como cepas indicadoras *E. coli* y *P. taetrolens*, se prepararon placas de NB con un 2% de agar. Sobre ellas, se añadió una capa de medio NB con un 0,7% de agar, previamente inoculado al 1% con cada una de las dos cepas. Para el ensayo de difusión de la cepa *S. aureus*, se prepararon placas de TS con un 2% de agar. Sobre ellas, se añadió una capa de medio TS con un 0,7%

de agar, previamente inoculado al 1% con la cepa indicadora. En las placas se realizaron pocillos y se añadió en cada uno de ellos 100 µl de las diferentes muestras a analizar. El timol libre se ensayó a una concentración de 0,9, 0,5, 0,25, y 0,125 mg/mL; mientras que el timol encapsulado se ensayó a esas mismas concentraciones de agente activo y además a una concentración de 3,1 mg/mL.

Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 horas, midiéndose tras este tiempo los halos de inhibición resultantes.

4 - RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Preparación de nanopartículas

Existen diferentes parámetros que pueden tenerse en cuenta durante la preparación de estas nanopartículas y que pueden llegar a modificar su tamaño y la eficacia con la que encapsulan timol. En este sentido, se puede variar la cantidad de DCM y agua, el modo de dispersión de la fase orgánica en la fase acuosa (agitación mecánica o con ultrasonidos), el tiempo de dispersión, la cantidad de energía aplicada durante el proceso, el tensioactivo utilizado para estabilizar la emulsión, así como su concentración, la cantidad de APL y la cantidad de timol. De entre todos estos parámetros, en ensayos previos se consideró que variaciones en la cantidad de APL y de timol podían provocar cambios en las propiedades de las nanopartículas de una manera significativa y sencilla, por lo que se reconocieron como variables clave del proceso.

En la Figura 9 se muestra el tamaño medio de las nanopartículas y el IPD de las diferentes preparaciones desarrolladas. De acuerdo con esta Figura, las preparaciones realizadas con 100 mg de APL (barras punteadas) a cualquier concentración de timol produjeron las nanopartículas de menor tamaño. Sin embargo, de acuerdo con la Figura 10, estas nanopartículas también resultaron ser aquellas con una menor eficacia de encapsulación y que también mostraron una menor cantidad de timol encapsulado. Por el contrario, las preparaciones con 200 mg de APL resultaron ser las nanopartículas de mayor tamaño en casi todos los casos, y también presentaron las mayores cantidades de timol encapsulado, pero las eficacias de encapsulación fueron siempre inferiores a las preparaciones que contenían 150 mg de APL. Para caracterizar la influencia de estos parámetros sobre el tamaño y la eficacia de encapsulación de las nanopartículas obtenidas, y de este modo encontrar un óptimo, se recurrió a la modelización de los resultados mediante un diseño central compuesto.

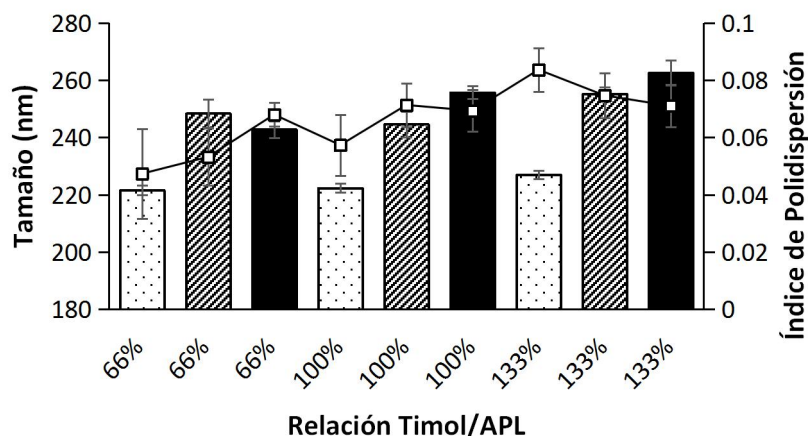


Figura 9. Tamaños (barras) e índices de polidispersión (línea) de las nanopartículas obtenidas con diferentes cantidades de APL y timol. Las barras punteadas representan las preparaciones con 100 mg de APL, las rayadas con 150 mg de APL y las sólidas con 200 mg de APL.

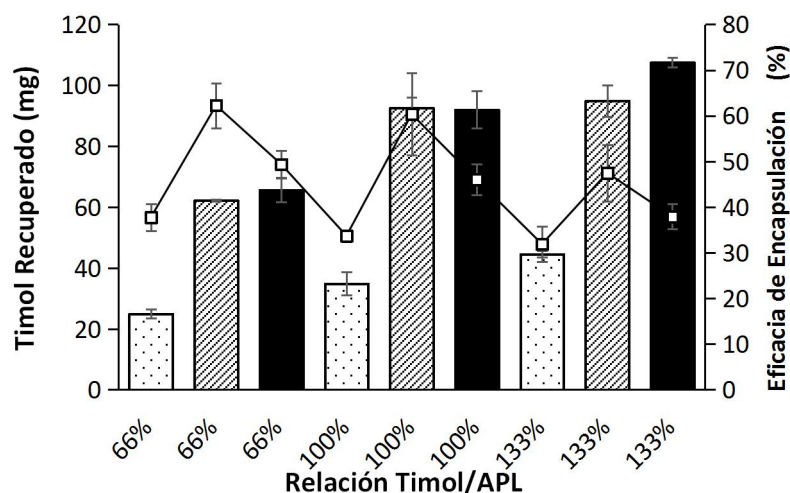


Figura 10. Timol recuperado (barras) y eficacia de encapsulación de timol (línea) para cada una de las preparaciones ensayadas. Las barras punteadas representan las preparaciones con 100 mg de APL, las rayadas con 150 mg de APL y las sólidas con 200 mg de APL.

4.2. Modelización de la influencia de la cantidad de APL y timol sobre el tamaño y la eficacia de encapsulación

Los diferentes ensayos que se llevaron a cabo, así como los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Tabla 3. De acuerdo con esta Tabla, el tamaño de las nanopartículas resultó influenciado por los parámetros estudiados. De hecho, el menor valor encontrado fue de 219,6 nm, que se correspondió con valores en las variables independientes codificados como “-1” (ensayo 14), mientras que el valor más grande,

267,0 nm (ensayo 17), se correspondió con los valores codificados como “1”. Este hecho sugiere una relación lineal entre el tamaño de las nanopartículas y la cantidad de APL y timol que se incluyó en cada ensayo, de tal manera que cuanto mayor fue la cantidad de polímero y de agente activo, mayor resultó el tamaño de las partículas obtenidas.

	Variables independientes			Variables dependientes				
	APL (mg)	Timol (%) ^a	Tamaño (nm)		Eficacia de encapsulación (%)			
			Observado	Modelo	DER ^b (%)	Observado	Modelo	DER ^b (%)
1	100 (-1)	66 (-1)	222,3	207,2	4,9	35,6	43,1	13,3
2	200 (1)	66 (-1)	239,6	216,0	7,3	49,4	53,4	5,5
3	100 (-1)	133 (1)	228,6	198,4	9,9	36,0	32,2	7,8
4	200 (1)	133 (1)	258,4	207,2	15,5	39,8	42,5	4,6
5	100(-1)	100 (0)	220,6	202,8	5,9	35,1	37,6	4,8
6	200 (1)	100 (0)	252,8	211,6	12,5	48,3	48,0	0,5
7	150 (0)	66 (-1)	249,0	220,6	8,5	58,7	66,9	9,1
8	150 (0)	133 (1)	253,0	211,8	12,5	50,2	56,0	7,6
9	150 (0)	100 (0)	242,0	216,2	7,9	58,0	61,4	4,1
10	150 (0)	100 (0)	245,0	216,2	8,8	62,0	61,4	0,5
11	150 (0)	100 (0)	251,0	216,2	10,5	60,0	61,4	1,7
12	150 (0)	100 (0)	238,0	216,2	6,7	56,0	61,4	6,6
13	150 (0)	100 (0)	248,0	216,2	9,6	63,0	61,4	1,7
14	100 (-1)	66 (-1)	219,6	207,2	4,0	39,8	43,1	5,6
15	200 (1)	66 (-1)	244,6	216,0	8,7	51,3	53,4	2,8
16	100 (-1)	133 (1)	226,4	198,4	9,3	27,5	32,2	11,0
17	200 (1)	133 (1)	267,0	207,2	17,8	35,9	42,5	11,8
18	100 (-1)	100 (0)	223,6	202,8	6,8	32,4	37,6	10,6
19	200 (1)	100 (0)	257,0	211,6	13,6	43,6	48,0	6,7
20	150 (0)	66 (-1)	243,0	220,6	6,8	65,7	66,9	1,2
21	150 (0)	133 (1)	257,7	211,8	13,7	44,6	56,0	15,9
22	150 (0)	100 (0)	248,0	216,2	9,6	61,0	61,4	0,5
23	150 (0)	100 (0)	243,0	216,2	8,2	59,0	61,4	2,9
24	150 (0)	100 (0)	250,0	216,2	10,2	66,0	61,4	5,0
25	150 (0)	100 (0)	251,0	216,2	10,5	59,0	61,4	4,1
26	150 (0)	100 (0)	245,0	216,2	8,8	53,0	61,4	10,4

Tabla 3. Matriz del diseño experimental (DCC) con los valores codificados y reales de las dos variables independientes y las dos respuestas evaluadas.

^a: Porcentaje referido al peso de APL en cada experimento.

^b: Desviación estándar relativa.

En el caso de la eficacia de encapsulación el valor más pequeño observado aparece en el ensayo 16, lo cual indica que sólo se encapsuló un 27,5% de todo el timol añadido en el diclorometano durante la preparación de las nanopartículas. Esta eficacia de encapsulación se obtuvo con la mínima cantidad de APL (-1) y con la cantidad de timol intermedia ensayada (0). Sin embargo, la mayor eficacia de encapsulación, un 66% según el ensayo 20, se produjo en los valores codificados

intermedios (0). En este caso no parece que cuanto más APL y timol se añadan al medio mayor sea la eficacia de encapsulación. A este respecto, incluso los valores más extremos ensayados y que están codificados con un “1”, el ensayo 17 con un 35,9% de timol encapsulado y el 4 con un 39,8%, obtuvieron eficacias de encapsulación que pueden ser consideradas bajas en comparación con los otros resultados obtenidos.

El análisis de la varianza (ANOVA) obtenido después de ajustar los datos experimentales a la ecuación de segundo orden anteriormente presentada (ecuación 1) se muestra en la Tabla 4. A la hora de realizar el modelo sólo se tuvieron en cuenta aquellos parámetros que resultaron ser estadísticamente significativos (p-valor < 0,05). Además, la estimación del valor de los coeficientes fue utilizada para evaluar el impacto de las variables independientes sobre las respuestas, ya que al codificar las unidades se pueden comparar en la misma escala.

En el caso del tamaño de las nanopartículas, la relación entre la cantidad de APL y de timol presente en el medio (X_{12}) resultó ser estadísticamente significativa, indicando que, a cada concentración relativa de timol ensayada, aumentos en la concentración de APL produjeron incrementos en el tamaño de las nanopartículas. También resultó estadísticamente significativo el cuadrado de la concentración de APL (X_1^2), denotando este hecho la presencia de curvatura en la superficie de la respuesta. Entre los parámetros lineales y de acuerdo con los coeficientes obtenidos (Tabla 5), la cantidad de APL en el medio (X_1) resultó ser el parámetro independiente que más impacto tiene sobre el tamaño de las nanopartículas. La siguiente ecuación representa el modelo para la respuesta del tamaño de las nanopartículas.

$$\text{Tamaño NP} = 134,8 + 1,172 X_1 - 0,133 X_2 - 0,003613 X_1^2 + 0,002097 X_{12} \quad \text{Ecuación (6)}$$

Donde NP es nanopartículas; X_1 es la cantidad de APL; X_2 es la cantidad de timol; X_1^2 es el cuadrado de la cantidad de APL y X_{12} es la interacción entre la cantidad de APL y de timol. Los coeficientes están expresados sin codificar.

De acuerdo con la Tabla 4, el parámetro *lack of fit* presentado muestra un F-valor que es muy inferior al F-valor para el modelo propuesto, mientras que el p-valor del

parámetro *lack of fit* es > 0.05 . Estos parámetros indican la significancia estadística del modelo propuesto. Además, el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}) fueron 0,91 y 0,89 respectivamente, confirmando que el modelo puede explicar la mayoría de la variabilidad observada en la respuesta. En la Tabla 3, además del valor observado se detallan los valores predichos por el modelo y la desviación estándar relativa (DER) que existe entre ellos. Esta DER resulta inferior al 10% en la mayoría de los casos.

En cuanto a la eficacia de encapsulación se refiere, no se apreció ninguna interrelación estadísticamente significativa entre las variables independientes, sin embargo, el cuadrado de la cantidad de APL (X_1^2) sí resultó significativo, apareciendo curvatura en la respuesta. Por otro lado, y a diferencia de en el caso anterior, los parámetros lineales que representan a la cantidad de APL (X_1) y la cantidad de timol (X_2) muestran valores similares, pero de signo opuesto (Tabla 4). Esto se puede interpretar como que aumentos en la concentración de timol siempre van a producir una disminución en la eficacia de encapsulación (coeficiente con signo negativo), mientras que aumentos en la cantidad de APL se asocian con aumentos en la respuesta. Sin embargo, hay que tener en cuenta la cuadratura del término APL, de tal manera que dependiendo de su forma aumentos en la cantidad de APL también se pueden asociar a disminuciones en la respuesta.

El modelo que representa el comportamiento de la eficacia de encapsulación con respecto a la cantidad de APL y timol se muestra a continuación:

$$EE (\%) = -108,7 + 2,342 X_1 - 0,1653 X_2 - 0,007462 X_1^2 \quad \text{Ecuación (7)}$$

Donde EE (%) es eficacia de encapsulación expresada en porcentaje; X_1 es la cantidad de APL; X_2 es la cantidad de timol y X_1^2 es el cuadrado de la cantidad de APL.

En este caso el F-valor y p-valor del parámetro *lack of fit* adquirieron valores de 1,64 y 0,203 respectivamente, lo cual verifica la significancia estadística del modelo presentado. Además, el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}) fueron 0,89 y 0,88 respectivamente, muy similares a los

coeficientes obtenidos para el modelo del tamaño de las nanopartículas.

En la Figura 11 se presenta la superficie de respuesta de los modelos propuestos. Tal y como se comentó con anterioridad, en la Figura 11.A se puede apreciar de manera visual como a cada nivel, un aumento en la cantidad de APL o de timol produce un aumento en el tamaño de las nanopartículas obtenidas. La curvatura que aparece en este caso adquiere la forma de meseta hacia la derecha de la superficie cuando los valores más altos de APL fueron ensayados. Por otro lado, en la Figura 11.B se muestra la superficie de respuesta del modelo de la eficacia de encapsulación, observándose una curvatura en cuanto a la cantidad de APL se refiere. En este caso, el máximo en la respuesta se sitúa en los valores intermedios de APL, a partir de este punto, incrementos en la cantidad de APL producen una disminución progresiva en la eficacia de encapsulación a cualquier nivel de timol ensayado. Esto puede deberse a que sobrepasado cierto punto, el aumento en la concentración de APL produce nanopartículas más densas y grandes, precipitando en una mayor cantidad durante la segunda centrifugación del proceso. Esta segunda centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos es clave a la hora de homogeneizar el tamaño de las nanopartículas, produciéndose la pérdida de las nanopartículas más pesadas y grandes. De esta manera, una mayor pérdida de nanopartículas durante esta centrifugación podría asociarse con una disminución en el rendimiento y por tanto con una reducción en la eficacia de encapsulación.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, y aunque la variación de tamaño de las nanopartículas es significativa en función de la cantidad de APL y timol, este tamaño se mantiene siempre por debajo de los 270 nm, por lo que resulta más adecuado maximizar la cantidad de timol encapsulado. A este respecto, atendiendo a la Figura 10 y a la superficie de respuesta (Figura 11.B), se tendrán como óptimas las preparaciones con 150 mg de APL en general, y la preparación de 150 mg de APL y 150 mg de timol en particular, por lo que estas nanopartículas serán caracterizadas en los siguientes ensayos.

Tabla 4. Analisis de la varianza de los modelos de regresión para el tamaño de las nanopartículas y la eficacia de encapsulación.

Source	Tamaño de las nanopartículas					
	F	p-valor	Coefficientes	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados
Model	55,97	0,000		3719,16	4	929,79
Intercept			247,41			
X_1	159,47	0,000	14,86	2649,24	1	2649,24
X_2	26,73	0,000	6,08	444,08	1	444,08
X_1^2	31,73	0,000	-9,03	527,13	1	527,13
X_{12}	5,94	0,024	3,51	98,7	1	98,7
Lack of fit	1,39	0,279		86,06	4	21,51
R^2		0,91				
R_{adj}^2		0,89				
Eficacia de encapsulación						
Model	62,82	0,000		2937,4	3	979,12
Intercept			58,25			
X_1	20,57	0,000	5,17	320,70	1	320,67
X_2	23,61	0,000	-5,54	368,05	1	368,05
X_1^2	144,27	0,000	-18,65	2248,6	1	2248,64
Lack of fit	1,64	0,203		111,5	7	22,30
R^2		0,89				
R_{adj}^2		0,88				

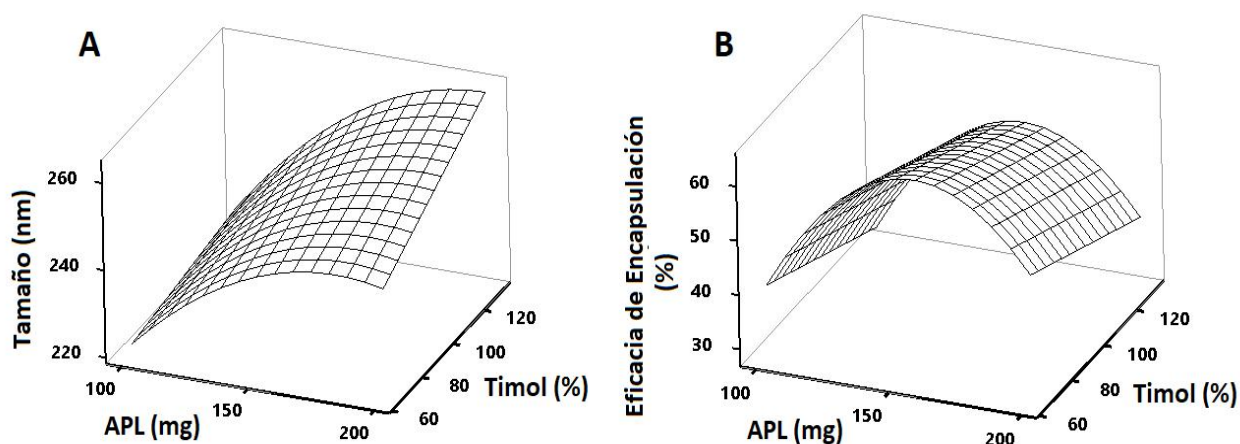


Figura 11. Superficies de respuesta de los modelos propuestos. A. Tamaño de las nanopartículas en función del contenido en APL y timol. B. Eficacia de encapsulación en función del contenido en APL y timol.

4.3. Caracterización de la forma de las nanopartículas

En la Figura 12 se muestran las micrografías obtenidas tanto mediante MET (Figura 12.A-C) como mediante MEB (Figura 12.D-F) de las nanopartículas producidas con 150 mg de APL y diferentes cantidades de timol. En todos los casos se observaron esferas con una superficie uniforme y de un tamaño que variaba entre los 200 y 300 nm, de acuerdo con los resultados de DLD expuestos anteriormente. Nanocápsulas con una morfología similar han sido desarrolladas por otros autores usando APL como polímero encapsulante (Freitas & Marchetti, 2005; Kumari, et al., 2011)

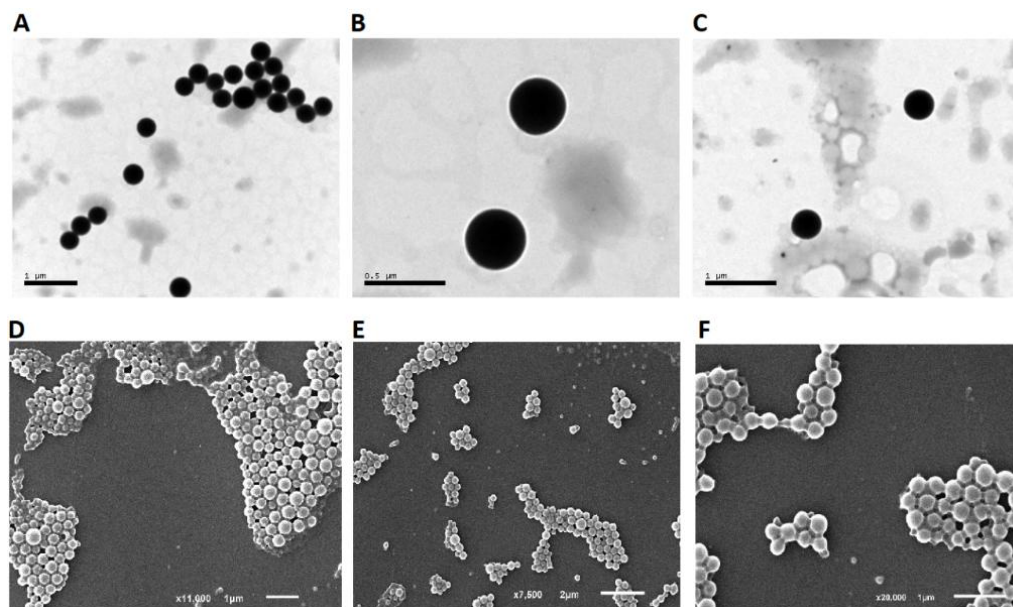


Figura 12. Micrografías realizadas mediante MET (A, B y C) y mediante MEB (D, E y F). A y D. Preparación de 150 mg APL y 100 mg de timol (66%). B y E. Preparación de 150 mg APL y 150 mg de timol (100%). C y F. Preparación de 150 mg APL y 200 mg de timol (133%).

4.4. Análisis de termogravimetría (TG)

En la Figura 13.A se muestra el análisis de TG de las nanopartículas cargadas con timol, el timol libre y el APL con el que se produjeron las nanopartículas. En la Figura 13.B se representa la derivada de las curvas de termogravimetría (DTG) que aparecen en la Figura 13.A. Además, los diferentes parámetros de interés que surgen del análisis de las curvas de TG y DTG se muestran en la Tabla 5. Según la Figura 13.A, en el caso del timol, su descomposición se produce en forma de una curva monofásica, entre los 65 y 190 °C. Esto se confirma en la Figura 13.B, en la cual se observa un único pico que presenta un máximo en los 158 °C. Esta es la temperatura a la que el timol se descompone más rápidamente. La curva de TG del APL (Figura 13.A) presenta una forma similar a la del timol, pero en un rango de temperatura superior, entre los 280 y 370 °C. El pico que se puede observar en la Figura 13.B presenta un máximo a los 347 °C. A diferencia de en los otros dos casos, la descomposición térmica de las nanopartículas aparece dividida en tres fases que se corresponden con la degradación de sus tres componentes. Aparece un primer

descenso en el porcentaje en peso en el rango de entre los 120 y 250 °C, otro descenso mucho más acentuado entre los 280 y los 370 °C, y una tercera fase entre los 390 y 470 °C. La primera fase de descomposición se podría atribuir a la pérdida del timol encapsulado, que al estar protegido en la matriz de APL presentaría una mayor resistencia a la temperatura que el timol libre. Este aumento en la resistencia térmica puede observarse en la Tabla 5, en la cual se muestra que el timol encapsulado presenta un máximo de descomposición situado en los 182 °C por los 158 °C del agente activo sin encapsular. El segundo rango de temperatura, el que produce un mayor descenso en el peso de las nanopartículas, se puede atribuir a la descomposición del APL, sin embargo y de acuerdo con la Figura 13.B, el pico en la DTG aparece desplazado hacia la izquierda con respecto a la curva del APL libre. A este respecto, en la Tabla 5 se aprecia como la máxima tasa de degradación para esta segunda fase en la curva de descomposición térmica de las nanopartículas también es inferior a la que presenta el APL. Esto podría deberse a que parte del timol es capaz de permanecer en las nanopartículas, produciéndose su descomposición a temperaturas ligeramente inferiores a las del APL. En estas condiciones, el pico de descomposición del APL podría verse influenciado por el timol y verse desplazado hacia la izquierda, de acuerdo a lo que se muestra en la Figura 13.B. El tercer rango de temperatura podría atribuirse a la descomposición del APV, el cual además sería el responsable del porcentaje en peso residual que queda a las máximas temperaturas ensayadas de acuerdo a lo observado en la Figura 13.A (Yu, Lin, Yeh, & Lin, 2003).

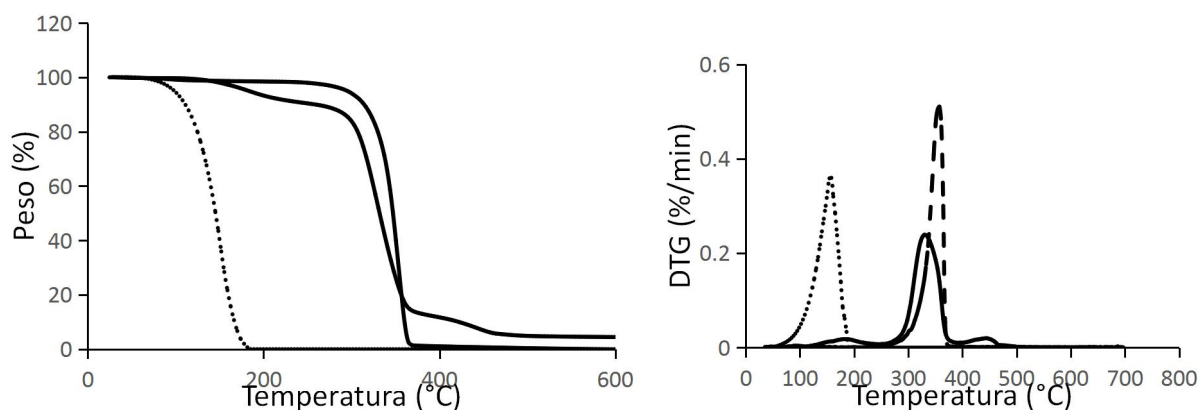


Figura 13. A. Curva de TG de las nanopartículas preparadas con 150 mg de APL y 150 mg de timol (línea sólida), el APL usado durante la encapsulación (línea a rayas), y cristales de timol (línea de puntos). B. Derivada de las curvas de TG (DTG) anteriores.

Tabla 5. Valores de termogravimetría obtenidos a partir de la Figura 13.

Muestra	Fases de descomposición	Rango de temperatura (°C)	Picos de DTG	Perdida de peso (%)	T ₅₀ ^a (°C)
Timol	1	65-190	158	100	145
APL	1	280-370	357	100	347
Nanopartículas	1	120-250	182	10	329
	2	280-370	329	75	
	3	390-470	445	7	

^a: Temperatura a la cual se ha perdido el 50% del peso de la muestra.

4.5. Ensayos de estabilidad con el tiempo

Las nanopartículas preparadas con 150 mg de APL y diferentes cantidades de timol fueron almacenadas por hasta 40 días a 5 °C. Durante este tiempo se tomaron alícuotas y se midió el tamaño medio para detectar variaciones que pudieran indicar fenómenos de degradación o agregación (Figura 14.A). De esta manera, en 40 días las nanopartículas con 100 mg de timol comenzaron midiendo $247,5 \pm 3,5$ nm y al final del experimento medían $246,5 \pm 2,12$ nm. En el caso de las nanopartículas con 150 mg de timol, el primer día las nanopartículas medían $256,5 \pm 2,12$ nm, mientras que el

último día pasaron a medir $261,5 \pm 2,2$ nm. Finalmente, las nanopartículas preparadas con 200 mg de timol presentaron un tamaño inicial de $260,9 \pm 1,5$ nm y un tamaño final de $264,3 \pm 1,00$ nm. De acuerdo con estos resultados, la variación de tamaño observada en el caso de las nanopartículas con 150 y 200 mg de timol puede considerarse mínima al ser inferior al 2%, y atendiendo a las desviaciones estándar, la variación de tamaño durante el almacenamiento de las nanopartículas con 100 mg de timol puede considerarse inexistente.

Cuando se investigó el contenido en timol dentro de las nanopartículas con 150 mg de timol durante el almacenamiento se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 14.B. De acuerdo con esta Figura, después de 40 días el $93,0 \pm 3,1\%$ del timol encapsulado el primer día permanecía en el interior de las nanopartículas. Teniendo en cuenta todos estos resultados, se puede concluir que las nanopartículas son estables bajo las condiciones de almacenamiento ensayadas.

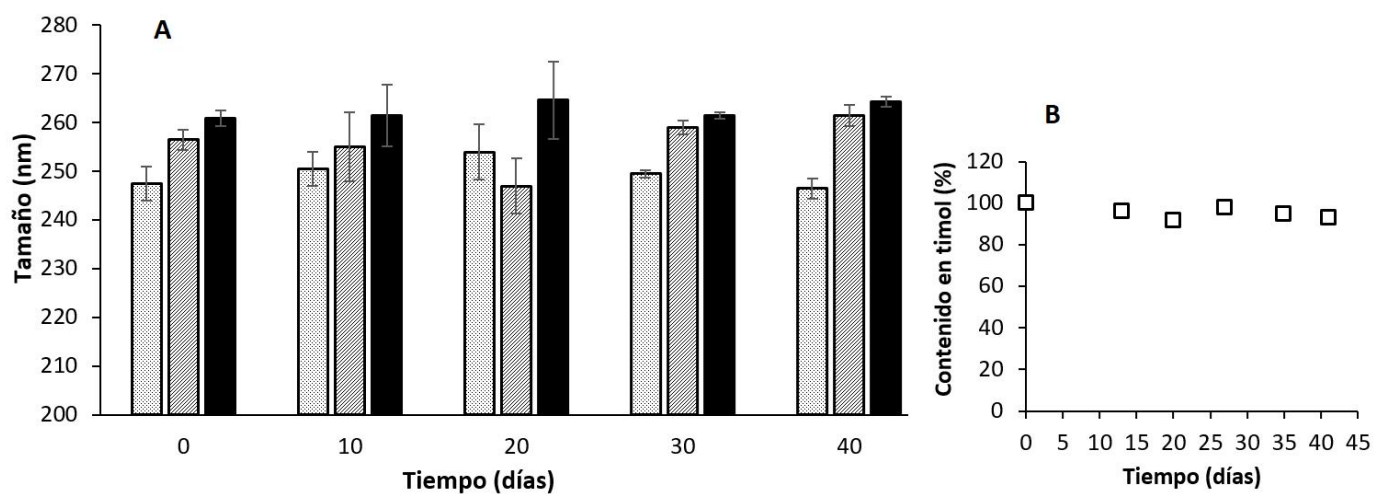


Figura 14. Ensayo de la estabilidad en el tiempo de las nanopartículas preparadas con 150 mg de APL. A. Variación del tamaño de las nanopartículas en el tiempo. Dentro de cada día, la barra más clara (izquierda) representa las preparaciones con 100 mg de timol, la barra del medio representa las preparaciones con 150 mg de timol y las sólidas con 200 mg de timol. B. Variación en el tiempo del contenido en timol de las nanopartículas preparadas con 150 mg de timol.

4.6. Ensayos de estabilidad a diferentes pHs

Se ensayó la estabilidad en el tiempo de las nanopartículas preparadas con 150 mg de APL y 150 mg de timol a diferentes pHs. Como en el apartado anterior, también se evaluó la variación en el contenido en timol durante el tiempo que duró el experimento. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6. De acuerdo con estos resultados, durante 20 días no se detectaron cambios en el tamaño de las nanopartículas a ningún pH. En cuanto a la cantidad de timol encapsulado, a pH ácido y básico se produjo una ligera disminución en comparación con las nanopartículas conservadas en tampón a pH neutro. Esto podría deberse a que a pH neutro la matriz de APL de las nanopartículas presenta una mayor estabilidad, o a que a pH neutro la solubilidad del timol pudiera ser ligeramente inferior que a pH ácido o básico. En cualquier caso, la diferencia detectada podría considerarse pequeña, por lo que estas nanopartículas podrían mantenerse estables en matrices alimentarias con un pH ácido o básico, al menos dentro del rango de pH y tiempo ensayado.

Tabla 6. Variación de tamaño y contenido en timol de las nanopartículas almacenadas en soluciones tamponadoras a diferentes pHs.

	Tamaño			Timol encapsulado (%)		
	Día 1	Día 10	Día 20	Día 1	Día 10	Día 20
pH 4,0	241,3±1,3	242,7±2,7	240,15±0,2	100	95,8±0,6	96,4±0,6
pH 7,0	238,7±1,3	241,0±2,5	238,9±1,8	100	98,2±0,7	98,9±0,8
pH 9,0	238,6±0,1	240,8±1,5	238,8±1,8	100	96,7±0,8	95,5±1,3

4.7. Ensayos de liberación de timol

El perfil de liberación de timol a diferentes temperaturas por parte de las nanopartículas de APL preparadas con 150 mg de APL y 150 mg de timol se presenta en la Figura 15. De acuerdo con esta Figura, el timol difunde rápidamente del interior

de las nanopartículas a 35 °C, liberándose el 93% del agente activo en 6 horas. En este tiempo, en el caso de disminuir la temperatura a 22 °C, se libera el 80% del contenido en timol. Sin embargo, a 15 y 5 °C y en 6 horas sólo se consigue la liberación del 60% del timol. Teniendo en cuenta estos resultados y tal y como cabría esperar, la tasa de liberación de timol es dependiente de la temperatura. A 35 y 22 °C se produce una liberación rápida de timol durante las dos primeras horas de ensayo, para a continuación producirse una ligera disminución en la tasa de liberación del agente activo. Esta primera liberación abrupta podría ser debido al desalojo del timol adherido a la superficie de las nanopartículas y al timol que se encuentra dentro de las nanopartículas pero en las capas más externas (Yadav & Sawant, 2010). La propia geometría de las nanopartículas y su gran ratio superficie/volumen podrían ser los responsables de esta rápida liberación inicial. A partir de este punto, se produce el desalojo del timol que está alojado en capas cada vez más internas de la nanopartícula.

Por otro lado, durante la primera hora a 15 y 5 °C existe un ligero retraso en la liberación de timol. Este retraso podría atribuirse a la difusión del exceso de agente activo que se encuentra libre en la solución que contiene las nanopartículas, y que es desalojado rápidamente a temperaturas superiores. Una vez desaparece este exceso de timol libre, se produce una liberación rápida del agente activo entre la primera y la cuarta hora, en el caso del ensayo a 15 °C, y entre la primera y tercera hora cuando se baja la temperatura hasta los 5 °C. A continuación, se produce también la liberación del timol que se aloja en las capas más internas de las nanopartículas a una menor velocidad. En cualquier caso, a todas las temperaturas ensayadas se produce una liberación rápida inicial que podría ser deseable, ya que facilitaría que se alcanzasen concentraciones iniciales lo suficientemente altas de timol en el medio como para que lleve a cabo su función antimicrobiana u antioxidante.

Cuando se realiza una modelización de este tipo de procesos, ya sea para caracterizarlos o para intentar averiguar cuáles son los mecanismos que producen la liberación del agente activo, hay que tener en cuenta una gran multitud de factores. A la hora de realizar estos ajustes se asume que la concentración de agente activo en el

interior de las nanopartículas excede a su solubilidad en el medio acuoso en el cual se ha realizado el experimento de liberación. Por tanto, a medida que las moléculas de timol son liberadas, los agregados de agente activo dentro de las nanopartículas se van solubilizando y reemplazando a las moléculas solubilizadas. Por otro lado, habría que tener en cuenta el posible efecto de hinchamiento de las nanopartículas al ir liberándose el timol e ir penetrando el agua hacia el centro de la estructura. Si esto ocurre, el camino a través del cual deben de pasar las moléculas de agente activo hasta llegar al medio acuoso se va incrementando, lo cual produce una disminución en el gradiente de concentración, que al fin y al cabo es la fuerza que impulsa el movimiento del timol durante su difusión. Además, este hinchamiento se asocia con un aumento en el movimiento de las macromoléculas de APL que forman parte de la matriz, ya que al verse hidratadas se produce un incremento en su movilidad, favoreciéndose la liberación del timol.

También hay que tener en cuenta que en estos sistemas aparece un frente de hinchamiento, el cual delimita el núcleo, que todavía no está en contacto con el agua y que contiene el agente activo agregado ya sea en forma cristalina o amorfa, y la matriz hinchada, que presenta una mezcla del agente activo disuelto y agregado. En la cinética de liberación del timol desde el interior de las nanopartículas también habría que tener en cuenta los diferentes fenómenos de erosión que se pueden estar produciendo debido a su hinchamiento. Si el material constituyente de las nanopartículas no tiene mucha resistencia al agua, se producirá una primera erosión superficial que va degradando la partícula desde el exterior hasta el interior conforme avanza el frente de hinchamiento. Sin embargo, el APL no presenta muchos grupos reactivos que puedan degradarse rápidamente al estar en contacto con el medio acuoso, por lo que se espera que el proceso de degradación sea más lento, produciéndose la erosión a lo largo de toda la nanopartícula, mucho después de que esta esté completamente hidratada. Además de estas consideraciones, por citar algunas más, habría que tener en cuenta la posible creación u oclusión de poros durante el hinchamiento, el posible efecto de la presión hidrostática en el interior de la cápsula, la creación de microambientes con diferentes pHs durante la liberación del agente

activo, posibles interacciones entre el agente activo y la matriz (fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas...), cambios en la geometría de las nanocápsulas durante su vaciado (J Siepmann & Siepmann, 2008), etc. Sin embargo, existen modelos empíricos que, aunque mucho más limitados y menos potentes, son fáciles de aplicar y se encuentran ampliamente extendidos en la bibliografía. En este caso se ha utilizado el modelo empírico de Korsmeyer-Peppas, al cual se ajustan adecuadamente los datos experimentales obtenidos tal y como se muestra en la Tabla 8. Para aplicarlo sólo se tuvo en cuenta la curva de liberación de timol hasta que se alcanza el 60% de liberación del agente activo (J Siepmann & Peppas, 2012). Además, en este caso tampoco se tuvieron en cuenta ni la primera hora, en los ensayos a 35 y 22 °C, ni las dos primeras horas, en los ensayos a 15 y 5 °C. Esta omisión se debe a la distorsión que produce en las curvas obtenidas el rápido desalojo de timol a las dos temperaturas más altas ensayadas, y el retraso que se detecta en la liberación del agente activo a las temperaturas más bajas. En el caso de este modelo, el valor del exponente “n” (Tabla 8) puede interpretarse para intentar comprender, hasta cierto punto, cómo está siendo el transporte del timol hacia el exterior de la nanopartícula. De este modo, si “n” es igual a 0,43 la difusión del agente activo sigue de manera pura la ley de Fick. Por otro lado, si el valor de “n” varía entre 0,43 y 0,85, entonces el mecanismo de transporte se cataloga de anómalo, siendo en la práctica una mezcla del fenómeno de difusión descrito por Fick y del fenómeno de hinchamiento de la nanopartícula. Si alternativamente el valor de “n” es igual a 0,85, el mecanismo de transporte sería mediado principalmente debido al fenómeno de hinchamiento (Ritger & Peppas, 1987). Teniendo esto en cuenta y de acuerdo con la Tabla 8, en todos los casos se da un transporte anómalo, excepto en el ensayo a 5 °C, donde debido al descenso de la temperatura el mecanismo de difusión se ve entorpecido, adquiriendo una mayor relevancia el fenómeno de hinchamiento.

En la Tabla 8 aparecen los parámetros de ajuste de los datos experimentales a la ecuación cinética de primer orden (ecuación 2). De acuerdo con los resultados obtenidos, la liberación del timol se ajusta con un elevado coeficiente de determinación ($R^2 > 0,95$) a este tipo de cinéticas de liberación, lo cual indica que es

dependiente de su propia concentración. Esto implica que a medida que pasa el tiempo la concentración de timol dentro de la nanopartícula es cada vez menor, reduciéndose su gradiente de concentración y por lo tanto su tasa de difusión.

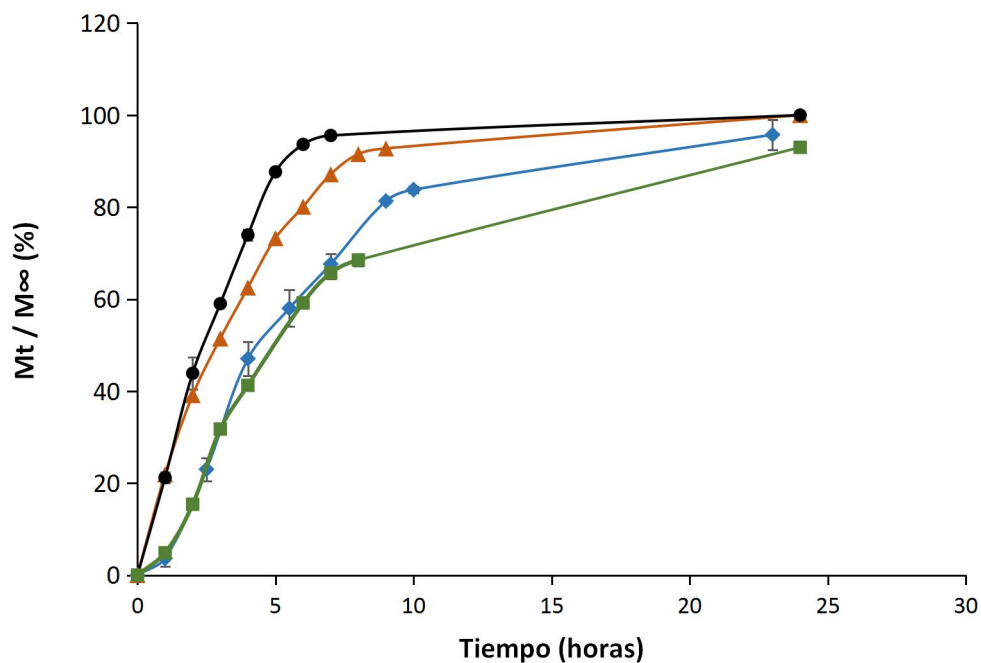


Figura 15. Liberación de timol a 35 °C (círculos negros), 22 °C (triángulos naranjas), 15 °C (rombos azules) y 5 °C (cuadrados verdes) por parte de las nanopartículas preparadas con 150 mg de APL y 150 mg de timol.

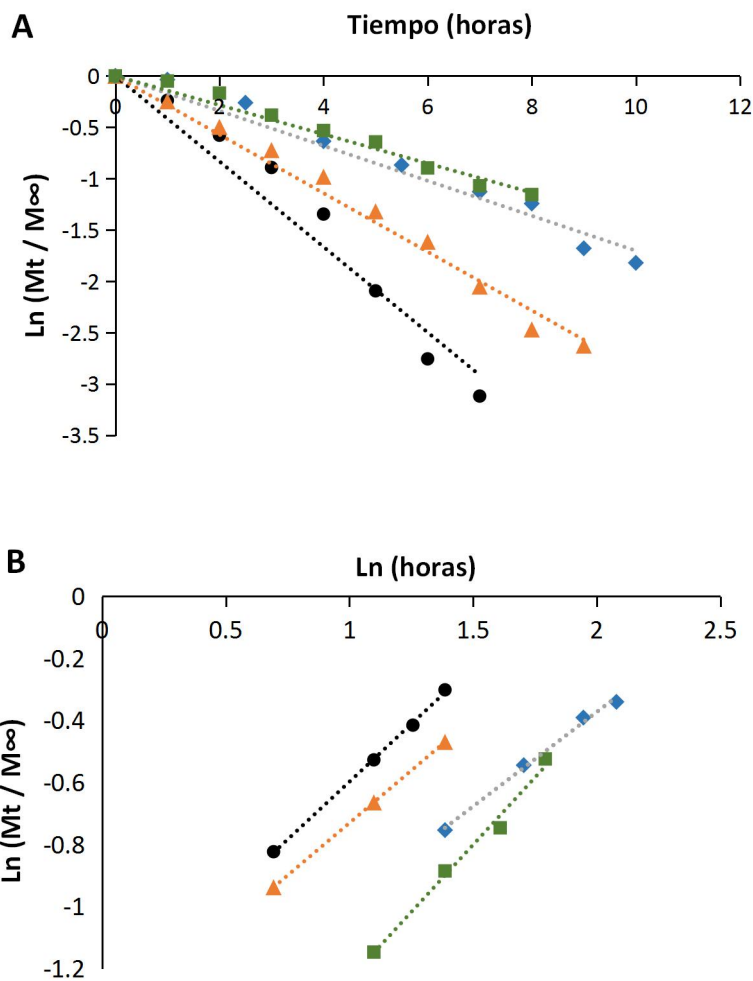


Figura 16. Ajuste de los diferentes modelos matemáticos aplicados a la liberación del timol a 35 °C (cículos negros), 22 °C (triángulos naranjas), 15 °C (rombos azules) y 5 °C (cuadrados verdes) por parte de las nanopartículas preparadas con 150 mg de APL y 150 mg de timol. A. Modelo cinético de primer orden. B. Modelo de Korsmeyer-Peppas.

Tabla 7. Parámetros de interés obtenidos a partir de la Figura 16.

	Primer orden		Korsmeyer-Peppas	
	R ²	k	R ²	n
35 °C	0,95	0,41	0,99	0,75
22 °C	0,98	0,28	0,99	0,67
15 °C	0,97	0,17	0,99	0,60
5 °C	0,97	0,14	0,98	0,85

4.8. Propiedades antioxidantes, DPPH y ABTS⁺

El experimento de liberación de timol fue modificado tal y como se indica en materiales y métodos. La temperatura de 37 °C fue seleccionada debido a que esta temperatura se producía la mayor tasa de liberación de timol. Con el sobrenadante obtenido a diferentes tiempos y a 37 °C se realizaron ensayos de eliminación de los radicales DPPH y ABTS⁺ (Figura 17), para de esta manera evaluar las propiedades antioxidantes del timol encapsulado. Como cabría esperar, el timol liberado fue capaz de eliminar los dos radicales ensayados (Llana-Ruiz-Cabello, Gutiérrez-Praena, Puerto, Pichardo, Jos, & Cameán, 2015). Debido a que la cinética de liberación del timol contenido en estas nanocápsulas es de primer orden, se produce una disminución en la concentración de timol liberado a lo largo del tiempo, y, por tanto, la capacidad antioxidante del sobrenadante disminuye progresivamente.

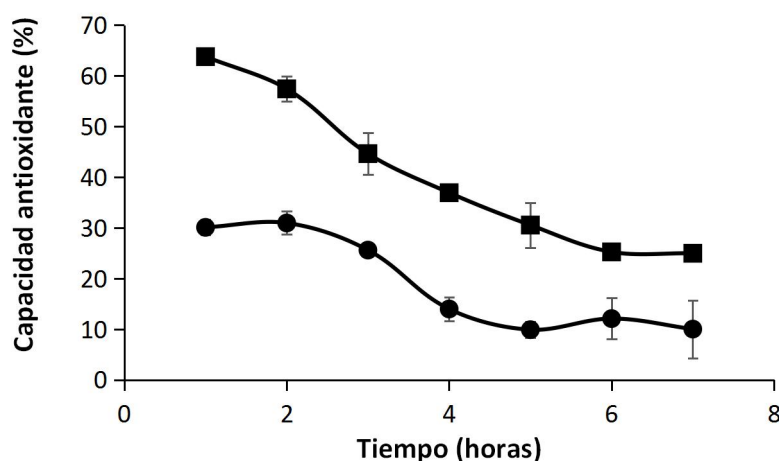


Figura 17. Capacidad de eliminar el radical ABTS⁺ (cuadrados) y DPPH (círculos) del sobrenadante obtenido a diferentes tiempos durante el experimento de liberación de timol a 37 °C.

4.9. Propiedades antimicrobianas

La actividad inhibitoria del timol, tanto en su forma libre como encapsulado en nanopartículas, se comprobó sobre el crecimiento de tres cepas diferentes (*E. coli* CECT 101, *P. taetrolens* LMG 2336 y *S. aureus* CECT 240) empleando el método de

difusión en placa.

En las bacterias Gram-negativas, el timol destruye la membrana externa, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Helander, et al., 1998), lo que conlleva a la muerte celular. En las dos bacterias Gram negativas ensayadas (*E. coli* CECT 101 y *P. taetrolens* LMG 2336) se obtuvieron resultados similares (Figura 18). No se observó diferencia entre el timol libre y encapsulado en nanopartículas para las concentraciones de 1; 0,5; 0,25 y 0,125 mg/mL. En el caso de las nanopartículas con una concentración de timol de 3,1 mg/mL se obtuvo un halo de inhibición de 13,5 mm para *P. taetrolens* LMG 2336 y 11,5 mm para *E. coli* CECT 101.

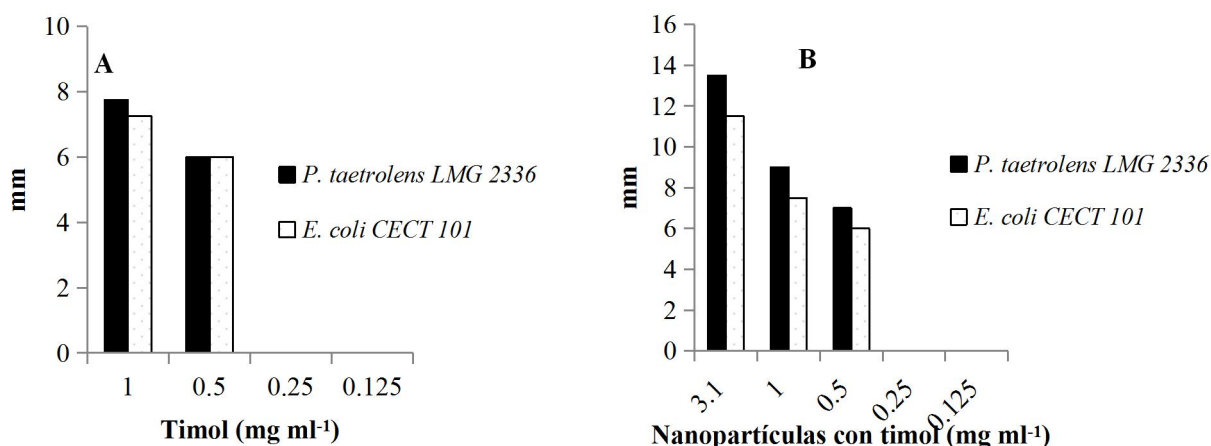


Figura 18: histogramas que representan los halos de inhibición de las cepas *E. coli* CET 101 y *P. taetrolens* LMG 2336 en milímetros cuando se ensayó con (A) soluciones de timol libre y (B) timol encapsulado en nanopartículas.

Con la cepa *S. aureus* CECT 240 se obtuvieron halos de inhibición menores (Figura 19). Sólo se observó inhibición con el timol libre para la concentración de 1 mg/mL, mientras que las nanopartículas produjeron inhibición en las concentraciones de 3,1 y 1 mg mL⁻¹. No se observó ninguna diferencia entre el timol libre y encapsulado, ya que en ambos casos, la concentración de 1 mg/mL provocó una

inhibición de aproximadamente 6 mm.

En las bacterias Gram positivas, el timol actúa interaccionando con las proteínas hidrofóbicas de la membrana mediante puentes de hidrógeno, dando lugar a un cambio en la permeabilidad de la membrana (Juven, Kanner, Schved, & Weisslowicz, 1994a). Además, si existe un pH bajo en el ambiente, la molécula de timol se encuentra en su estado no disociado, facilitando la unión con las partes no hidrofóbicas de la proteína y produciéndose una mayor disolución de la fase lipídica de la membrana (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001)

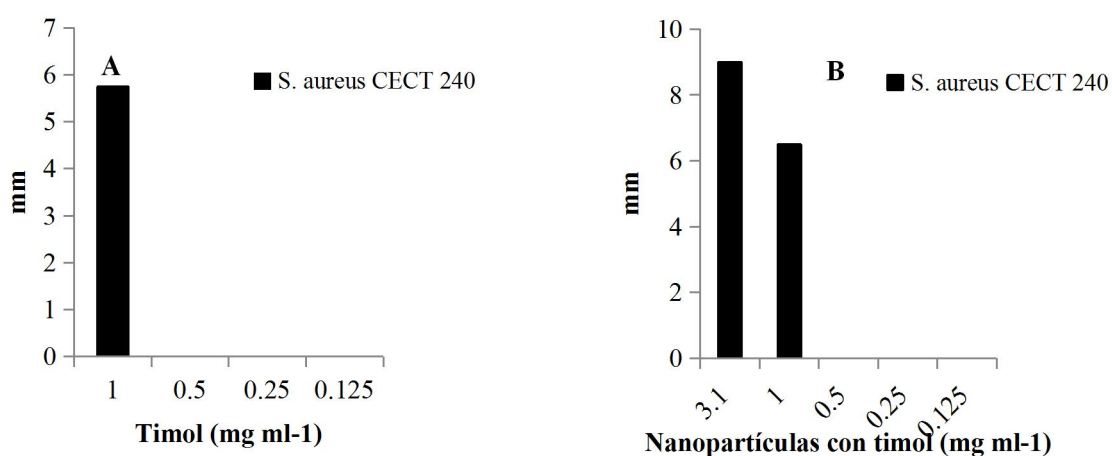


Figura 19: histogramas que representan los halos de inhibición de la cepa *S. aureus* CECT 240 en milímetros cuando se ensayó con (A) soluciones de timol libre y (B) timol encapsulado en nanopartículas.

En todos los casos estudiados no se apreció una diferencia significativa en la inhibición producida por timol libre o encapsulado en nanopartículas. Al aumentar la concentración del timol en las nanopartículas hasta 3,1 mg/mL, las inhibiciones obtenidas fueron mayores para todas las cepas ensayadas (Figura 1B y Figura 2B).

Como ya se comentó en las consideraciones teóricas, en un medio acuoso, la concentración máxima de timol que se puede obtener es de 1 mg/mL. Una de las principales ventajas de la encapsulación de timol en nanopartículas es que permite aumentar su concentración en disolución, incrementándose de esta manera su efectividad como agente antimicrobiano.

5 - CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Según la concentración de APL y timol en el medio, la eficacia de encapsulación varía de forma muy acentuada. Este hecho podría relacionarse con el tamaño de las nanopartículas y su tendencia a precipitar durante la segunda centrifugación que se lleva a cabo durante su preparación. Además, las nanopartículas presentaron una forma esférica.

2. El tamaño de las nanopartículas y la cantidad de timol que contienen son parámetros que permanecen estables por al menos 40 días bajo las condiciones de refrigeración ensayadas.

3. La liberación de timol se ajusta a una cinética de primer orden. Además, su liberación se produce por una mezcla de difusión, siguiendo las leyes de Fick, y por el movimiento de los polímeros que conforman la matriz de las nanopartículas debido al fenómeno de hinchamiento. Como cabría esperar, a la temperatura más baja ensayada el fenómeno de difusión se ve muy reducido, cobrando más importancia la liberación de timol debido al hinchamiento.

6 - BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, J. M., & Shive, M. S. (2012). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 72-82.

Anderson, R., Krueger, N., Byrd, J., Harvey, R., Callaway, T., Edrington, T., & Nisbet, D. (2009). Effects of thymol and diphenyliodonium chloride against *Campylobacter* spp. during pure and mixed culture in vitro. *Journal of applied microbiology*, 107(4), 1258-1268.

Andrade-Ochoa, S., Nevárez-Moorillón, G. V., Sánchez-Torres, L. E., Villanueva-García, M., Sánchez-Ramírez, B. E., Rodríguez-Valdez, L. M., & Rivera-Chavira, B. E. (2015). Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 332.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.

Basim, E., & Basim, H. (2003). Antibacterial activity of *Rosa damascena* essential oil. *Fitoterapia*, 74(4), 394-396.

Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., & Remmal, A. (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*, 38(6), 454-458.

Borowiec, J., Hampl, J., Gebinoga, M., Elsarnagawy, T., Elnakady, Y. A., Fouad, H., Almajhadi, F., Fernekorn, U., Weise, F., Singh, S., Elsarnagawy, D., & Schober, A. (2015). Thermoforming techniques for manufacturing porous scaffolds for application in 3D cell cultivation. *Materials Science and Engineering: C*, 49, 509-516.

Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L. I., & Hmamouchi, M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of ethnopharmacology*, 89(1), 165-169.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3),

223-253.

Chauhan, A. K., & Kang, S. C. (2014). Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. typhimurium in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. *Research in Microbiology*, *165*(7), 559-565.

Chen, H., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2014). Impacts of sample preparation methods on solubility and antilisterial characteristics of essential oil components in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(3), 907-916.

Chen, H., Zhang, Y., & Zhong, Q. (2015). Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *Journal of Food Engineering*, *144*, 93-102.

da Rosa, C. G., de Oliveira Brisola Maciel, M. V., de Carvalho, S. M., de Melo, A. P. Z., Jummes, B., da Silva, T., Martelli, S. M., Villetti, M. A., Bertoldi, F. C., & Barreto, P. L. M. (2015). Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *481*, 337-344.

Dalmolin, L. F., Khalil, N. M., & Mainardes, R. M. (2016). Delivery of vanillin by poly (lactic-acid) nanoparticles: development, characterization and in vitro evaluation of antioxidant activity. *Materials Science and Engineering: C*, *62*, 1-8.

Castro, R. D., de Souza, T. M. P. A., Bezerra, L. M. D., Ferreira, G. L. S., de Brito Costa, E. M. M., & Cavalcanti, A. L. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC complementary and alternative medicine*, *15*(1), 417.

Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, *44*(9), 1908-1914.

Džamić, A., Nikolić, B., Giweli, A., Mitić-Ćulafić, D., Soković, M., Ristić, M., Knežević-Vukčević, J., & Marin, P. (2015). Libyan *Thymus capitatus* essential oil: antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and colon pathogen adhesion-inhibition properties. *Journal of applied microbiology*, *119*(2), 389-399.

Eftekhari, F., Nariman, F., Yousefzadi, M., Hadiand, J., & Ebrahimi, S. N. (2009). Anti-Helicobacter pylori activity and essential oil composition of Thymus caramanicus from Iran. *Natural product communications*, 4(8), 1139-1142.

Freiberg, S., & Zhu, X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International journal of pharmaceutics*, 282(1), 1-18.

Freitas, M. N., & Marchetti, J. M. (2005). Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. *International Journal of Pharmaceutics*, 295(1), 201-211.

Griffin, S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(5), 322-332.

Guerrero, S., Muñiz, E., Teijón, C., Olmo, R., Teijón, J. M., & Blanco, M. D. (2008). Ketotifen-Loaded Microspheres Prepared by Spray-Drying Poly (D,L-Lactide) and Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Polymers: Characterization and In Vivo Evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 3153-3169.

Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G., & 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-Hernández, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., & García-Almendárez, B. E. (2014). Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* HBK) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014.

Hiemenz, P. C. (1986). *Principles of colloid and surface chemistry* (Vol. 188): M. Dekker New York.

Hsu, C.-H., Cui, Z., Mumper, R. J., & Jay, M. (2003). Preparation and characterization of novel coenzyme Q10 nanoparticles engineered from microemulsion precursors. *AAPS PharmSciTech*, 4(3), 24-35.

Huang, Q. (2012). *Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical*

industries: Elsevier.

Iacobellis, N. S., Lo Cantore, P., Capasso, F., & Senatore, F. (2005). Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 57-61.

Itthisoponkul, T., Mitchell, J. R., Taylor, A. J., & Farhat, I. A. (2007). Inclusion complexes of tapioca starch with flavour compounds. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 106-115.

Jesus, F., Ferreiro, L., Bizzi, K., Loreto, E., Pilotto, M., Ludwig, A., Alves, S., Zanette, R., & Santurio, J. (2015). In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 25(2), e89-e93.

Juven, B., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994a). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied microbiology*, 76(6), 626-631.

Juven, B., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994b). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*, 76(6), 626-631.

Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., & Farokhzad, O. C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2971-3010.

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 dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9452-9458.

Kumari, A., Yadav, S. K., Pakade, Y. B., Kumar, V., Singh, B., Chaudhary, A., & Yadav, S. C. (2011). Nanoencapsulation and characterization of *Albizia chinensis* isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 224-232.

Lagouri, V., Blekas, G., Tsimidou, M., Kokkini, S., & Boskou, D. (1993). Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 197(1), 20-23.

Lambert, R., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.

Lee, B. K., Yun, Y., & Park, K. (2016). PLA micro- and nano-particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 176-191.

Leroux, J.-C., Allémann, E., De Jaeghere, F., Doelker, E., & Gurny, R. (1996). Biodegradable nanoparticles — From sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 39(2), 339-350.

Lesmes, U., Cohen, S. H., Shener, Y., & Shimoni, E. (2009). Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 667-675.

Li, K.-K., Yin, S.-W., Yang, X.-Q., Tang, C.-H., & Wei, Z.-H. (2012). Fabrication and characterization of novel antimicrobial films derived from thymol-loaded zein–sodium caseinate (SC) nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(46), 11592-11600.

Licata, M., Tuttolomondo, T., Dugo, G., Ruberto, G., Leto, C., Napoli, E. M., Rando, R., Rita Fede, M., Virga, G., & Leone, R. (2015). Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian oregano biotypes. *Journal of Essential Oil Research*, 27(4), 293-306.

Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112(1), 77-83.

Luna, A., Labaque, M., Zygadlo, J., & Marin, R. (2010). Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poultry Science*, 89(2), 366-370.

Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., & Cameán, A. M. (2015). In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol

and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro*, 29(4), 647-656.

Ma, T., Luo, J., Tian, C., Sun, X., Quan, M., Zheng, C., Kang, L., & Zhan, J. (2015). Influence of technical processing units on chemical composition and antimicrobial activity of carrot (*Daucus carrot* L.) juice essential oil. *Food Chemistry*, 170, 394-400.

Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414.

Martín-Sabroso, C., Fraguas-Sánchez, A., Aparicio-Blanco, J., Cano-Abad, M., & Torres-Suárez, A. (2015). Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 480(1), 27-36.

Mastelić, J., Jerković, I., Vinković, M., Džolić, Z., & Vikić-Topić, D. (2004). Synthesis of selected naturally occurring glucosides of volatile compounds. Their chromatographic and spectroscopic properties. *Croatica chemica acta*, 77(3), 491-500.

Mu, L., Teo, M.-M., Ning, H.-Z., Tan, C.-S., & Feng, S.-S. (2005). Novel powder formulations for controlled delivery of poorly soluble anticancer drug: Application and investigation of TPGS and PEG in spray-dried particulate system. *Journal of Controlled Release*, 103(3), 565-575.

Nieddu, M., Rassu, G., Boatto, G., Bosi, P., Trevisi, P., Giunchedi, P., Carta, A., & Gavini, E. (2014). Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: In vitro and in vivo studies. *Carbohydrate Polymers*, 102, 393-399.

Novy, P., Davidova, H., Serrano-Rojero, C. S., Rondevaldova, J., Pulkrabek, J., & Kokoska, L. (2015). Composition and antimicrobial activity of *Euphrasia rostkoviana* Hayne essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

Pagels, R. F., & Prud'homme, R. K. (2015). Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics.

Journal of Controlled Release, 219, 519-535.

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), 164-168.

Pan, K., Chen, H., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2014). Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1649-1657.

Park, B.-S., Choi, W.-S., Kim, J.-H., Kim, K.-H., & Lee, S.-E. (2005). Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(1), 80-83.

Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli, E., Deans, S., & Eaglesham, E. (1993). Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 2(1), 47-50.

Rahim, Z. H. A., Shaikh, S., Ismail, W. N. H. W., Harun, W. H.-A. W., & Razak, F. A. (2014). The effect of selected plant extracts on the development of single-species dental biofilms. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 24(11), 796-801.

Ravid, U., & Putievsky, E. (1985). Composition of essential oils of *Thymbra spicata* and *Satureja thymbra* chemotypes. *Planta medica*, 51(04), 337-338.

Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 23-36.

Roussaki, M., Gaitanarou, A., Diamanti, P. C., Vouyiouka, S., Papaspyrides, C., Kefalas, P., & Detsi, A. (2014). Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 182-187.

Shah, B., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2012). Nanocapsular dispersion of thymol for enhanced dispersibility and increased antimicrobial effectiveness against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in model food systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8448-8453.

Siepmann, J., & Peppas, N. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 163-174.

Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2001). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(2), 139-157.

Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 328-343.

Smith, A., & Hunneyball, I. M. (1986). Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 30(2), 215-220.

Stahl-Biskup, E., & Sáez, F. (2003). *Thyme: the genus Thymus*: CRC Press.

Takeuchi, H., Yamamoto, H., & Kawashima, Y. (2001). Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 39-54.

Tan, M. X., & Danquah, M. K. (2012). Drug and protein encapsulation by emulsification: technology enhancement using foam formulations. *Chemical Engineering & Technology*, 35(4), 618-626.

Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A., & Chamani, J. (2012). An antioxidant peptide derived from Ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates. *Food Research International*, 49(1), 105-111.

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.

Van de Braak, S., & Leijten, G. (1999). Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. *CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam*, 116.

Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., Dönmez, E., & Tepe, B. (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var.

pectinatus (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 63-67.

Vazquez, B. I., Fente, C., Franco, C., Vazquez, M., & Cepeda, A. (2001). Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International journal of food microbiology*, 67(1), 157-163.

Villanueva Bermejo, D., Angelov, I., Vicente, G., Stateva, R. P., Rodriguez García-Risco, M., Reglero, G., Ibañez, E., & Fornari, T. (2015). Extraction of thymol from different varieties of thyme plants using green solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2901-2907.

Watchararujij, K., Goto, M., Sasaki, M., & Shotipruk, A. (2008). Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. *Bioresource Technology*, 99(14), 6207-6213.

Weiss, J., Gaysinsky, S., Davidson, M., & McClements, J. Nanostructured Encapsulation Systems-CHAPTER 24: Food Antimicrobials.

Wichert, B., & Rohdewald, P. (1990). A new method for the preparation of drug containing polylactic acid microparticles without using organic solvents. *Journal of Controlled Release*, 14(3), 269-283.

Wischke, C., & Schwendeman, S. P. (2008). Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 298-327.

Wu, J., Liu, H., Ge, S., Wang, S., Qin, Z., Chen, L., Zheng, Q., Liu, Q., & Zhang, Q. (2015). The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. *Food Hydrocolloids*, 43, 427-435.

Xiong, X. Y., Li, Y. P., Li, Z. L., Zhou, C. L., Tam, K. C., Liu, Z. Y., & Xie, G. X. (2007). Vesicles from Pluronic/poly(lactic acid) block copolymers as new carriers for oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release*, 120(1), 11-17.

Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S., & Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 174-179.

Xue, J., & Zhong, Q. (2014). Blending lecithin and gelatin improves the

formation of thymol nanodispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(13), 2956-2962.

Yadav, K. S., & Sawant, K. K. (2010). Formulation optimization of etoposide loaded PLGA nanoparticles by double factorial design and their evaluation. *Current drug delivery*, 7(1), 51-64.

Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., & Raneva, V. G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64(1), 59-66.

Ye, C.-L., Dai, D.-H., & Hu, W.-L. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). *Food Control*, 30(1), 48-53.

Yi, J., Lam, T. I., Yokoyama, W., Cheng, L. W., & Zhong, F. (2015). Beta-carotene encapsulated in food protein nanoparticles reduces peroxyl radical oxidation in Caco-2 cells. *Food Hydrocolloids*, 43, 31-40.

Young, W., Hwang, K., McDonald, S., & Oates, C. J. (2010). Sustainable consumption: green consumer behaviour when purchasing products. *Sustainable development*, 18(1), 20-31.

Yu, Y.-H., Lin, C.-Y., Yeh, J.-M., & Lin, W.-H. (2003). Preparation and properties of poly (vinyl alcohol)–clay nanocomposite materials. *Polymer*, 44(12), 3553-3560.

Zahran, H. E.-D. M., & Abdelgaleil, S. A. (2011). Insecticidal and developmental inhibitory properties of monoterpenes on *Culex pipiens* L.(Diptera: Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14(1), 46-51.

Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., & Vigneron, C.(1999). Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 60(2), 179-188.

Zamureenko, V. A., Klyuev, N. A., Bocharov, B. V., Kabanov, V. S., & Zakharov, A. M. (1989). An investigation of the component composition of the essential oil of *Monarda fistulosa*. *Chemistry of Natural Compounds*, 25(5), 549-551.

Zhang, Y., Niu, Y., Luo, Y., Ge, M., Yang, T., Yu, L., & Wang, Q. (2014). Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein

nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. *Food Chemistry*, 142, 269-275.

Zhao, C.-X. (2013). Multiphase flow microfluidics for the production of single or multiple emulsions for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(11), 1420-1446.