

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**Preparación de sistemas coloidales
sostenibles basados en almidón para la
encapsulación de biocompuestos con
actividad antimicrobiana**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

DIEGO HERNAN MONTERO FLOR

Julio, 2023



AGRADECIMIENTOS

A quien agradezco primero es a Dios que me guía y sostiene en cada paso que doy. Él es quien va construyendo el camino al que llamamos vida.

Después agradeceré a mis Padres José y Betty que sin ellos nada de esto tendría sentido para mí, ellos desde su bondad y amor lo comparten todo para de esa manera vernos a mí y mis hermanos brillando con luz propia. También quiero agradecer a mis hermanos Gianna, Mónica, José y Andrea, a mis sobrinas Ana Sofía, María Paula y Victoria y también a mis cuñados Patricio, Diego y Andrés que, aunque no estuvieron cerca de mí, me dieron todo su apoyo incondicional.

A mi institución Universidad del Azuay por brindarme todo el apoyo desde sus cabezas principales Rector Francisco Salgado y vicerrectoras Raffaella Ansaloni y Genoveva Malo, que no dudaron en extender su ayuda para formarme en este máster, el cual servirá para reforzar la enseñanza en nuestra Universidad.

A continuación, agradeceré a mis tutoras Gemma Gutiérrez y María Matos que con su gran conocimiento, carisma, empatía y tranquilidad me supieron encaminar en todo este trayecto de enseñanza, además espero contar con ellas siempre para seguir aprendiendo mucho de ellas. Por otro lado, quiero agradecer a alguien muy importante en su grupo de investigación Rocío Feito que me ayudó muchísimo y se convirtió en una gran amiga.

Y porque no, agradecer a las personas que van compartiendo esta larga historia que se llama vida y que siempre están ahí, ya sean de mi país o de cualquier otro. En el que las fronteras nos separan, pero el cariño nos une: Juan Diego C, Darwin M, Sebastián Q, Xavier R, Fernando Cruz, Diego V, Melina H, Nicole S, Mónica T, Johana T, Ximena O, María M, Rodrigo C, Cirila C, Jordán G, Alfonso A, Marta F, Andrea J, Cinthya V, Jacqueline Q, Bess N, Sofía M, David M, Fernanda S y Josselyn B. Además, espero que sigan compartiendo momentos inolvidables junto a mí.

Por todos ellos lo último que me queda decir es... GRACIAS!!

Índice

1. Introducción y Objetivos	11
1.1. Introducción.....	11
1.2. Objetivos.....	12
2. Consideraciones teóricas	14
2.1. Sistemas coloidales.....	14
2.2. Capacidad antimicrobiana	15
2.2.1. Capacidad antimicrobiana de la vainillina.....	15
2.2.2. Capacidad antimicrobiana de eugenol	16
2.2.3. Capacidad antimicrobiana de cinnamon.....	17
2.3. Preparación de cápsulas para la encapsulación de biocompuestos.....	18
2.3.1. Secado por atomización.....	18
2.3.2. Co-cristalización.....	20
2.3.3. Liofilización.....	20
2.3.4. Encapsulación en levadura	21
2.3.5. Emulsificación	21
2.3.6. Vesículas.....	22
2.3.7. Almidón.....	23
3. Materiales y metodología experimental	26
3.1. Materiales	26
3.1.1. Preparación de fase acuosa y fase orgánica.....	26
3.1.2. Encapsulación de compuesto bioactivos	26
3.1.3. Poder Antimicrobiano.....	27
3.2. Equipos	27
3.3. Metodología experimental.....	29
3.3.1. Síntesis de nanovesículas.....	29
3.3.1.1. Método de Inyección de Etanol.....	30

3.3.1.2. Método de película delgada (Thin Film)	31
3.3.2. Caracterización	32
3.3.2.1. Tamaño	32
3.3.2.2. Morfología	34
3.3.2.3. Estabilidad	35
3.3.2.4. Eficacia de Encapsulación (EE)	36
3.3.3. Pruebas de inhibición.....	37
4. Resultados y Discusión.....	39
4.1. Selección del método.....	39
4.2. Selección de la formulación	43
4.3. Potencial Antimicrobiano	47
4.4. Encapsulación de compuestos y actividad antimicrobiana.....	48
4.5. Estabilidad frente a diferentes medios.....	51
4.6. Eficacia de encapsulación.....	58
5. Conclusiones.....	61
Bibliografía.....	62
Anexos	69

RESUMEN

En la actualidad la utilización de nanomateriales sostenibles está incrementando, por lo que, la síntesis de nanovesículas de almidón se presenta como una opción prometedora, por sus características renovables, biodegradables y biocompatibles. Algunas de sus aplicaciones en el ámbito industrial del sector alimentario conllevan al encapsular diferentes compuestos como probióticos, antioxidantes y bioconservantes (antibacterianos y antifúngicos).

El objetivo principal de este trabajo es la preparación de sistemas coloidales sostenibles de tamaño controlado para la encapsulación de compuestos antibacterianos. Para ello, se estudiaron diferentes métodos de preparación como es la inyección de etanol e hidratación de película delgada, probando diferentes formulaciones. Los nanomateriales preparados fueron caracterizados en términos de tamaño, morfología y monodispersividad.

Ensayos iniciales determinaron que el método de hidratación de película delgada era el más apropiado para la correcta preparación de vesículas sostenibles en base almidón y tensioactivo no iónico Span 60. Se estudió entonces la influencia de la concentración total de compuestos de membrana y la proporción entre almidón y tensioactivo, determinando mejores resultados con concentraciones iguales de ambos. Una vez establecidas las mejores formulaciones se llevaron a cabo experimentos para encapsular compuestos antimicrobianos (vainillina, eugenol, cinnamon oil), obteniéndose morfologías más aceptables con la vainillina. Posteriormente, se testó la actividad antimicrobiana frente a *E.coli* 2×10^7 CFU dando resultados positivos en la eliminación de dicho microorganismo.

Se cuantificó el porcentaje de eficacia de encapsulación de la vainillina dando como resultados entre 62 y 89 % para las diferentes concentraciones de componentes de membrana utilizadas. Se estableció como mejor formulación la que utilizaba un 0,16 % de cada componente por sus características de tamaño, morfología y monodispersividad ya que se observó gran diferencia con el de 0,32 % en el que se utiliza el doble de reactivos. Una vez establecida la capacidad antimicrobiana, se estudió la estabilidad de los sistemas vesiculares conteniendo vainillina frente a diferentes concentraciones de pH (3, 6 y 9), temperatura (4°C, 30°C y 60°C) y salinidad (0 %, 1,5 % y 3 %) siendo inestables a pH ácido y altas concentraciones de sal, observándose en menor medida el efecto de la temperatura de almacenamiento.

ABSTRACT

Currently, the use of sustainable nanomaterials is increasing, therefore the synthesis of starch nanovesicles is a promising option due to their renewable, biodegradable, and biocompatible characteristics. Some of its applications in the food industry involve encapsulating different compounds such as probiotics, antioxidants, and bio-preservatives (antibacterial and antifungal).

This work's main objective is to prepare sustainable size-controlled colloidal systems for encapsulating antibacterial compounds. For this purpose, different preparation methods, such as ethanol injection and thin film hydration, were studied by testing different formulations. The prepared nanomaterials were characterized in size, morphology, and monodispersity. Initial tests determined that the thin film hydration method was the most appropriate for correctly preparing sustainable vesicles based on starch and nonionic surfactant span 60. The influence of the total concentration of membrane compounds and the ratio between starch and surfactant was then studied, determining better results with equal concentrations of both.

Once the best formulations were established, experiments were carried out to encapsulate antimicrobial compounds (vanillin, eugenol, and cinnamon oil), obtaining more acceptable morphologies with vanillin. Subsequently, the antimicrobial activity was tested against *E. coli* 2×10^7 CFU, yielding positive results in eliminating this microorganism. The percentage of vanillin encapsulation efficiency was quantified, with results ranging from 62 to 89 % for the different concentrations of membrane components used. The formulation using 0,16 % of each component was established as the best due to its size, morphology, and monodispersity characteristics since a significant difference was observed with 0,32 %, in which twice as many reagents were used.

Once the antimicrobial capacity was established, the stability of the vesicular systems containing vanillin was studied against different pH concentrations (3, 6, and 9), temperature (4°C, 30°C and 60°C), and salinity (0 %, 1,5 % and 3 %), being unstable at acid pH and high salt concentrations, with the effect of storage temperature being observed to a lesser extent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Formas de agregación de la materia.....	14
Figura 2 Configuración química de la vainillina	16
Figura 3 Protección frente a factores externos	18
Figura 4 Equipo para encapsulación por Spray drying.....	19
Figura 5 Encapsulado por co-cristalización.....	20
Figura 6 Liofilizador.....	21
Figura 7 Dispensor para emulsificación.....	22
Figura 8 Esquema de la técnica de inyección de etanol	30
Figura 9 Esquematización de la técnica de película delgada.....	32
Figura 10 Equipo DLS.....	33
Figura 11 TEM (Microscopio electrónico de transmisión)	34
Figura 12 Equipo Turbiscan Lab (Formulation).....	35
Figura 13 Micrografía TEM de las nanovesículas obtenidas a partir del método Inyección etanol: a). FO Span 60, Etanol; FA Almidón, Agua; b) FO Span 60, Etanol; Almidón, FA Agua; c) FO Etanol; FA Almidón, Agua; d) FO Span 60, Etanol; FA Agua; e) FO Almidón, Etanol.....	41
Figura 14 Micrografía TEM de las nanovesículas obtenidas a partir del método película delgada: a). FO Span 60, Etanol; FA Almidón, Agua; b) FO Span 60, Almidón, Etanol; FA Agua; c) FO Etanol; FA Almidón, Agua; d) FO Span 60, Etanol; FA Agua; e) FO Almidón, Etanol.....	42
Figura 15 Micrografía TEM de las nanovesículas obtenidas a partir del método película delgada: a) SS1; b) SS2; c) SS3; d) SS4; e) SS5; f) SS6; g) SS7; h) SS8; i) SS9; j) SS10; k) SS11; l) SS12; m) SS13; n) SS14; o) SS15; p) SS16; q) SS17	46
Figura 16 a) Placa Aceites (Orange, rose, eugenol, clove, cinnamon); b) Placa Vainillina 1 (15, 20, 25, 30 mg/mL); c) Placa Vainillina 2 (35, 40, 45, 50, 100 mg/mL)	47
Figura 17 Placas vainillina encapsulada: a) 0,08% purificada (f) y sin purificar (sf); b) 0,16% purificada (f) y sin purificar (sf); c) 0,32% purificada (f) y sin purificar (sf)	49
Figura 18 Placas eugenol encapsulado: a) 0,16 % purificado (f) y sin purificar (sf); b) 0,32 % purificado (f) y sin purificar (sf)	50
Figura 19 Encapsulación de eugenol (0,16 % y 0,32 %) formación de emulsiones	50
Figura 20 Placa Cinnamon encapsulado: 0,16 % sin filtrar (C16); b) 0,32 % sin filtrar (C32).....	51

Figura 21 Encapsulación de Cinnamon (0,16 % y 0,32 %) formación de emulsiones ..	51
Figura 22 Vainillina encapsulada sometida a diferentes medios para determinar estabilidad (salinidad, pH y temperatura).....	52
Figura 23 Perfiles de retrodispersión de vesículas en medio de diferente salinidad	53
Figura 24 Perfiles de retrodispersión de vesículas en medio de diferentes pHs.....	55
Figura 25 Perfiles de retrodispersión de vesículas en medio a diferentes temperaturas	56
Figura 26 TSI de las muestras tras 14 días de almacenamiento a diferentes condiciones ambientales	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Tipos de vesículas.....	22
Tabla 2 Principales fuentes de almidón, tamaño, contenido de amilosa y morfología ..	23
Tabla 3 Relación de compuestos y concentraciones en la preparación de nanovesículas mediante el método de inyección de etanol.....	39
Tabla 4 Relación de compuestos y concentraciones en la preparación de nanovesículas mediante el método película delgada.....	39
Tabla 5 Z-average, Tamaño, PDI y potencial Zeta muestras inyección de etanol	40
Tabla 6 Z-average, Tamaño, PDI y potencial Zeta muestras película delgada	40
Tabla 7 Relación de compuestos-concentraciones, Z-average, tamaño, PDI y potencial Zeta en la preparación de nanovesículas mediante el método película delgada.....	44
Tabla 8 Relación de compuestos y concentraciones en la encapsulación de compuestos antimicrobianos	48
Tabla 9 Tamaño las muestras frescas y tras 14 días de almacenamiento a diferentes condiciones ambientales	56
Tabla 10 Eficacia de encapsulación de muestra	59

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. Introducción y Objetivos

1.1. Introducción

A lo largo del tiempo, la utilización de nanocompuestos ha ido ganando mucha atención en el ámbito industrial, tanto es así que se están utilizando en alimentos, envases, aplicaciones biomédicas, biosorbentes para remediación ambiental, textiles e infinidad de aplicaciones (Gamage et al., 2022).

La aplicación de nanopartículas de almidón es utilizada en diferentes aspectos para el desarrollo de nuevos nanomateriales sostenibles, ya que es un material abundante, biodegradable biocompatible y sin toxicidad. Además de que es un material de bajo coste que se puede obtener de varias fuentes naturales, entre ellas cereales, tubérculos, leguminosas y ciertos tipos de frutas en estado verde. Así de esta manera se producen nanocompuestos categorizados “verdes”, considerados como los materiales del futuro (Camacho et al., 2011).

A su vez, debido al interés de formar nanopartículas que provengan de compuestos orgánicos y que cumplan con las funciones de mejorar solubilidad, sistemas transportadores o dispersión de compuestos bioactivos. Los métodos más utilizados para la síntesis adecuada de nanopartículas son la reducción de tamaño, forma o la utilización y modificación de la formulación del material. Por tal motivo, la formulación de los nanocompuestos ayuda fundamentalmente en la estabilidad y protección de los compuestos bioactivos a utilizar (Román-Guerrero et al., 2017).

Debido a esto, la encapsulación de compuestos bioactivos tales como antioxidantes o antimicrobianos, son muy estudiados hoy en día con el fin de encontrar soluciones a las diferentes problemáticas en la industria. Una de ellas es la de formación de biopelículas bacterianas, en donde los patógenos se disponen de esta forma adhiriéndose a ella y desarrollando una resistencia a los antibióticos y no siendo posible su eliminación por medio de la desinfección (Navia et al., 2010).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020), se estima que alrededor de 600 millones de personas se enferman cada año debido a la ingesta de alimentos contaminados y que de estos 420.000 mueren, estas enfermedades son

generalmente de carácter tóxico o infeccioso y son causadas por bacterias, parásitos, virus o sustancias químicas, debido a las malas prácticas de manipulación de alimentos en lo que se engloba la mala higiene del personal, la falta de limpieza de utensilios, equipos e instalaciones donde se procesan los alimentos.

Observando esta problemática, este trabajo va vinculado a encontrar una formulación sostenible para la preparación de vesículas a partir de almidón con el fin de encapsular sustancias antimicrobianas naturales, para evitar la proliferación de patógenos en matrices alimentarias y en envases de alimentos.

1.2. Objetivos

El objetivo principal es la preparación de sistemas coloidales sostenibles de tamaño controlado para la encapsulación de compuestos antibacterianos.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Revisión del estado del arte sobre la síntesis de la nanovesícula a partir de almidón.
- Estudio de la influencia del método de preparación, hidratación de película delgada e inyección de etanol, sobre el tamaño y la morfología de las nanovesículas preparadas.
- Influencia de la concentración, almidón y tensioactivo no iónico sobre el tamaño y la morfología de las nanovesículas preparadas.
- Estudio de la estabilidad de los sistemas vesiculares preparados frente a diferentes condiciones externas: pH, temperatura y salinidad.
- Selección y encapsulación de compuestos naturales con actividad antimicrobiana contra *E.coli*.
- Estudio de la actividad antimicrobiana de las formulaciones óptimas preparadas.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2. Consideraciones teóricas

2.1. Sistemas coloidales

De acuerdo con Moreno Botella (2021) un coloide hace referencia a una combinación de varios componentes, los cuales se encuentran distribuidos de manera uniforme y cuentan con propiedades asociadas mayoritariamente a sus características físicas que a su estructura química. En otras palabras, pueden manifestarse en sustancias puras, mismas que se pueden constituir por átomos similares, tales como plata (Ag), nitrógeno (N_2), oxígeno (O_2), oro (Au), entre otros; o también pueden presentarse en mezclas, conformadas por enlace químico de diferentes átomos tal como se indica en la Figura 1:

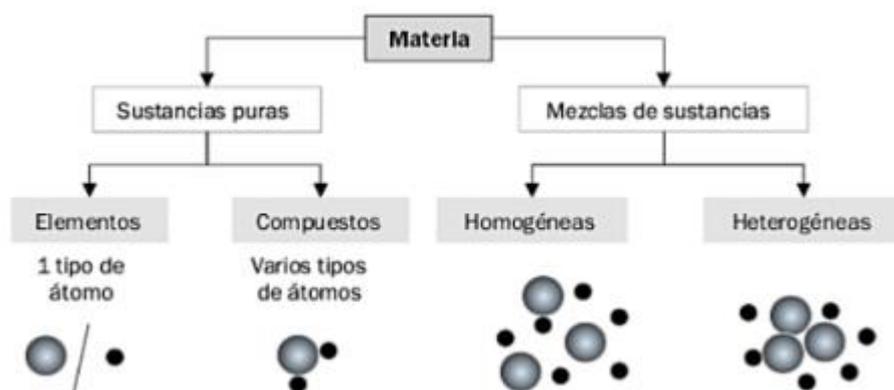


Figura 1 Formas de agregación de la materia

Fuente: Moreno Botella, 2021.

Dentro de la industria alimentaria, los sistemas coloidales son ampliamente utilizados, ya que brindan características positivas en relación a la textura y estabilidad de varios alimentos, debido principalmente a propiedades como gran área superficial y tendencia a la agregación, que derivan de sus tamaños, los cuales oscilan entre la micra y el nanómetro. En ese sentido, un coloide constituye una dispersión donde las partículas de proteínas, grasas, aceites, polisacáridos, entre otros, son distribuidas en un medio dispersante de manera uniforme, dando como resultado alimentos en forma de emulsiones, geles y suspensiones, principalmente (Garda, 2020).

Es necesario que dentro de los sistemas coloidales se tenga en cuenta factores como las propiedades sensoriales y reológicas del alimento, temperatura, pH, estabilidad de las dispersiones e interacción de moléculas, puesto que estos factores condicionan el

comportamiento, así como las propiedades tales como la vida útil, sabor, apariencia y textura (Perry y McClements, 2020).

2.2. Capacidad antimicrobiana

Dentro de los alimentos, existen compuestos que cuentan con capacidad antimicrobiana, lo cual les permite controlar a microorganismos que son potencialmente peligrosos y, además, promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas. Asimismo, existen alimentos que son capaces de producir bacteriófagos, los cuales infectan y se multiplican dentro de las bacterias, proporcionando características antibióticas. Si bien la capacidad antimicrobiana suele encontrarse en especias tales como el clavo de olor, la canela, orégano, también pueden encontrarse en bayas, miel, alimentos picantes, vainilla, aspartamo, estevia, principalmente.

Si bien los compuestos bioactivos que proporcionan capacidad antimicrobiana no brindan beneficios adicionales a una nutrición básica, pueden actuar como inhibidores de fagos y pueden ser empleados para controlar los virus patógenos. Estos compuestos pueden encontrarse en pequeñas cantidades en los alimentos, los cuales pueden ser tanto de origen animal como vegetal. En el caso de los que provienen de origen animal, se puede encontrar ácidos grasos tales como el omega-3, ácido linoleico, luteína, entre otros. En el caso de los que provienen de origen vegetal, se pueden encontrar fitoesteroles, polifenoles, terpenos, tioles, fibra, minerales, vitaminas, probióticos, prebióticos, etc.

2.2.1. Capacidad antimicrobiana de la vainillina

De acuerdo con Cava Roda (2013) la vainillina es el compuesto que brinda sabor y aroma más empleado a nivel mundial. Es de color blanco y cristalino y suele encontrarse en la parte oleosa de la vainilla en su estado natural. Cuenta con una configuración 4-hidroxi-3-methoxibenzaldehido y en su forma artificial, se produce a partir del eugenol. En la Figura 2, se describe la configuración química de la vainillina:

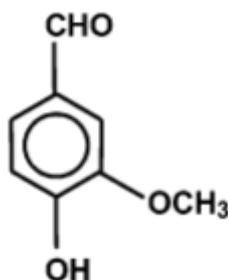


Figura 2 Configuración química de la vainillina

Fuente: Cava Roda, 2013.

Si bien, más de la mitad de la producción de vainillina es empleada en el sector farmacéutico y químico, dentro de la industria alimentaria también se la emplea, debido principalmente a sus características antimicrobianas, antimutagénicas y antifúngicas. En consecuencia, su aplicación resulta eficiente ante una gran variedad de microorganismos patógenos tales como el *Penicilium expansum*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus casei*, *E. coli*, *Listeria innocua*, entre otros.

Por su parte, Marchiano et al. (2023) indica que además de las propiedades antes descritas, la vainillina presenta propiedades anticancerígenas y neuroprotectoras. Gracias a estos beneficios, la vainillina puede ser encapsulada por diferentes métodos en nanovesículas para mejorar su estabilidad, así como su aplicación en diferentes sistemas, ya que se puede conseguir niosomas neutrales al contener colesterol y Span 60. No obstante, el método de hidratación de película delgada es aquel que presenta un 40 % mejor eficiencia de encapsulación en comparación con la técnica de inyección de etanol, consiguiendo niosomas de 255 nm.

2.2.2. Capacidad antimicrobiana de eugenol

El Eugenol, presente en el clavo de olor, es un compuesto fenólico aromático del aceite esencial del clavo y se ha empleado desde hace miles de años como agente antiséptico y antimicrobiano en diversas culturas. En la actualidad, se usa en productos dentales, cosméticos, alimentos y medicinas, gracias a sus características antioxidantes, analgésicas y antiinflamatorias (Beltrão de Freitas et al., 2022).

Además, presenta alta eficiencia antimicrobiana ante bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos, células sésiles y células planctónicas, las cuales son encargadas de la descomposición de alimentos y patógenos humanos. Debido a su alta volatilidad, se pueden formar complejos de inclusión, gracias al empleo de agentes encapsulantes, principalmente la β -ciclodextrina, debido a que este compuesto es capaz de formar una cavidad que permite alojar al eugenol, incrementando su solubilidad acuosa y prolongando su actividad biológica (Abarca et al., 2016).

En ese sentido, la nanoencapsulación del eugenol brinda conservación, estabilidad, protección y liberación controlada del compuesto, lo cual permite ampliar su aplicación a diferentes industrias, ya que el uso de β -ciclodextrina permite gran estabilidad en un rango amplio de temperatura (Alvira, 2018).

2.2.3. Capacidad antimicrobiana de cinnamon

El cinnamon, compuesto que se encuentra en la canela, presenta propiedades antimicrobianas que han sido empleadas para combatir patógenos que se transmiten por los alimentos. Presenta buenos resultados ante bacterias tanto grampositivas como gramnegativas, y, además, el cinnamon ha demostrado su capacidad de inhibición de bacterias que son las causantes de provocar daños a nivel de la membrana celular, inhibir las ATP, alterar el perfil lipídico, la motilidad, porinas de la membrana división celular y la formación de biopelículas (Nabavi et al., 2015).

Si bien la canela es conocida por su capacidad antimicrobiana, también presenta otras propiedades tales como antidiabéticas, antiinflamatorias y antioxidantes, principalmente. Recientemente, también existe evidencia de sus beneficios de protección en contra de ciertos tipos de cánceres (Vasconcelos et al., 2018).

Asimismo, existen alrededor de 250 especies del género *Cinnamomum*, no obstante, los aceites volátiles más representativos provienen de *C. zeylanicum*, *C. verum*, *C. osmophloeum*, *C. cassia*, *C. cassia*, y *C. burmannii*. Finalmente, existe poca información toxicocinética humana para los componentes en el aceite de canela. Estudios en roedores indican que la principal vía metabólica del o-metoxicinaldehído implica la oxidación a los ácidos cinámico y fenilpropiónico correspondientes con la posterior excreción urinaria de ácidos benzoico e hipúrico (Barceloux, 2009).

2.3. Preparación de cápsulas para la encapsulación de biocompuestos

Según Valenzuela De León (2020) la encapsulación hace referencia a un proceso en donde se agregan vitaminas, componentes bioactivos, enzimas y compuestos de alimentos en cápsulas pequeñas, las cuales salvaguardan de factores ambientales que podrían afectar al producto, tales como la humedad, enzimas, iones metálicos, oxígeno, luz, pH y temperatura. En ese sentido, la encapsulación incrementa el tiempo de vida útil de nutrientes funcionales de los alimentos, mismos suelen tener una vida limitada debido a su alta sensibilidad. A continuación, en la Figura 3 se indica la protección frente a factores externos:

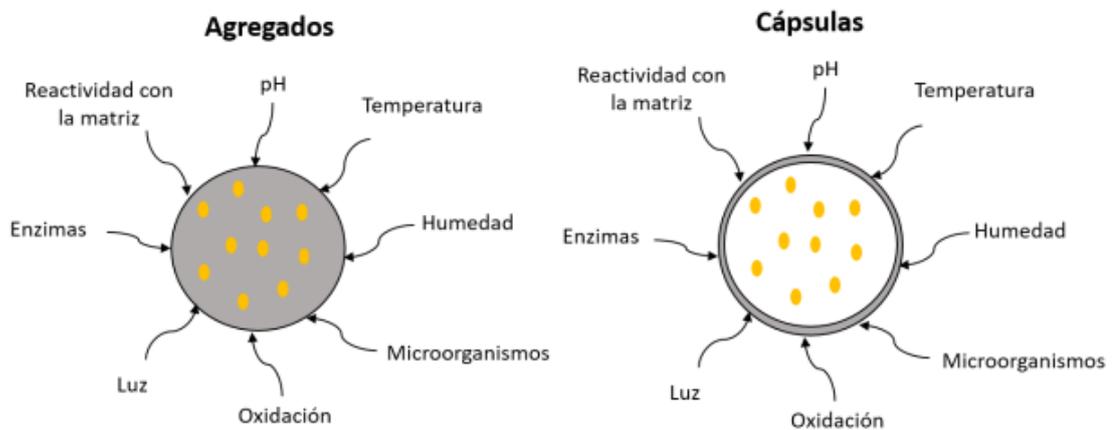


Figura 3 Protección frente a factores externos

Fuente: Leyva Jiménez, 2020.

Por su parte, Díaz-Montes et al. (2023) indican que la encapsulación constituye en la actualidad, una de las técnicas más usadas para la conservación y almacenamiento de compuestos bioactivos que se agregan a varios productos alimenticios, ya que además de su papel protector, tiene un control en cuanto al proceso de liberación de nutrientes al organismo. A continuación, se presentan los principales métodos de encapsulación de compuestos bioactivos.

2.3.1. Secado por atomización

El secado por atomización se considera a la técnica por la cual se produce una rápida evaporación, la cual se consigue debido a que la muestra líquida se pone en contacto con aire caliente que se encuentra en boquillas de alta presión. En ese sentido, es preciso el

uso de un biopolímero o polisacárido que actúe de crioprotector, a la vez que actúa como material base de la cápsula que servirá de vehículo al compuesto a encapsular (Piñón-Balderrama et al., 2020).

Este proceso es relativamente económico en comparación con otros métodos, de aplicación sencilla y con alto empleo en el ámbito industrial. Gracias a la aplicación del secado por atomización, se llega a obtener tanto micropartículas como nanopartículas, lo que permite modificar el estado físico de líquido hasta obtener un compuesto sólido, permitiendo implementar los encapsulados en diversas matrices alimentarias (Castromonte et al., 2020).

En el mismo sentido, Leyva Jiménez (2020) considera esta técnica más económica en comparación con la liofilización, ya que los costos se reducen de cuatro a cinco veces su valor, se emplea tanto para secado como encapsulado y es capaz de producir partículas con dimensiones similares, lo cual hace que esta técnica sea una de las más empleadas en diversas industrias. En la Figura 4, se muestra el equipo empleado para encapsulación por *Spray drying*:

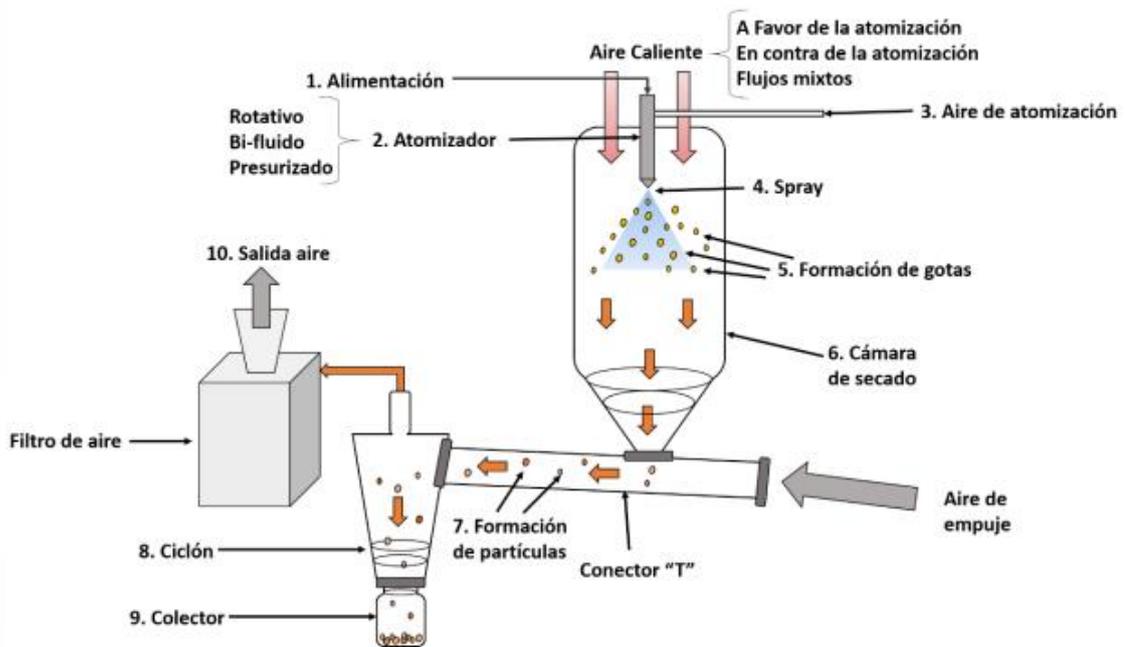


Figura 4 Equipo para encapsulación por *Spray drying*

Fuente: Leyva Jiménez, 2020.

2.3.2. Co-cristalización

La co-cristalización constituye un proceso de bajo coste, fácil de aplicar y flexible en la industria alimentaria (Alfaro-Bejarano, 2022). Para realizar esta técnica, se coloca dentro de un jarabe de sacarosa supersaturada el ingrediente activo, para que de esta manera se cristalicen los dos elementos al mismo tiempo. Gracias a los cristales de superficie limitada y de alta densidad con los que cuentan la sacarosa, este compuesto es empleado como elemento de encapsulación, modificando su estructura a cristales aglomerados, irregulares y de tamaño micro, provocando una base porosa que permite el ingreso del compuesto activo. En la Figura 5, se muestra el encapsulado por co-cristalización:

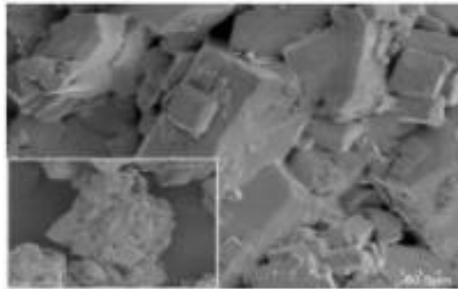


Figura 5 Encapsulado por co-cristalización

Fuente: Alfaro Bejarano, 2022.

2.3.3. Liofilización

La liofilización es una técnica de encapsulación que se realiza con temperaturas bajas y en un ambiente a vacío, lo cual resulta óptimo para minimizar pérdida de compuestos termolábiles, así como la oxidación de lípidos. Este proceso se produce de manera lenta y a baja temperatura (generalmente entre $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se emplea generalmente para la encapsulación de alimentos funcionales. Es preciso el uso de un biopolímero o polisacárido que actúe de crioprotector a la vez que actúa como material base de la capsula que servirá de vehículo al compuesto a encapsular (Di Giorgio et al., 2022).

Además, las fuentes probióticas como los cultivos bacterianos son los principales productos liofilizados (Kandasamy y Naveen, 2022). Asimismo, Rezvankhah et al. (2020) señalan que esta técnica es utilizada para productos termosensibles y, al ser un proceso lento que requiere aproximadamente entre 24 a 48 horas, su aplicación resulta limitada,

quedando reservada su aplicación a sistemas de alto valor añadido. En la Figura 6, se indica el modelo de liofilizador que suele emplearse para encapsulación:



Figura 6 Liofilizador

Fuente: Díaz-Montes et al., 2023.

2.3.4. Encapsulación en levadura

Si bien las levaduras suelen emplearse principalmente en el área de la fermentación, también se han identificado aplicaciones en el ámbito de la encapsulación, debido a que las cepas de este elemento son capaces de acumular grandes cantidades de lípidos a nivel intracelular, las cuales se conocen como levaduras oleaginosas. Esta característica permite acomodar lípidos tanto exógenos como endógenos hasta en un 20 % de su peso.

El proceso de encapsulación de levadura permite que los compuestos a encapsular se protejan de ambientes agresivos. La liberación del compuesto activo se realiza en lugares específicos en tiempos óptimos. Además, la capacidad de absorción de grandes cantidades de hidrófobos y, dentro del proceso, se puede controlar la producción de células cargadas de hidrófobos desarrollando microcápsulas a base de levadura (Coradello y Tirelli, 2021).

2.3.5. Emulsificación

La técnica de encapsulación por emulsificación es considerada como la más sencilla de realizar, puesto que la mezcla de hidrocoloide con el compuesto seleccionado, en una fase discontinua, llega a dispersarse en una fase continua, hasta que se produce la emulsión (Díaz-Montes et al., 2023). Las gotas de fase dispersa formadas pueden entonces separarse de la fase continua por técnicas de decantación o filtración, formando así las cápsulas.

El proceso de la emulsificación puede ejecutarse con diferentes equipos tales como sonicadores, mezcladores magnéticos, dispersores automáticos o mezcladores manuales. Cabe indicar que, indistintamente del equipo que se utilice, la emulsificación se aplica cuando se desea obtener mejores resultados en la estabilización de compuestos por encima de la calidad del producto final, puesto que no se cuenta con controles en torno a la rugosidad, tamaño y morfología de las emulsiones (Díaz-Montes et al., 2023). En la Figura 7, se observa un dispersor que se emplea para emulsificación:



Figura 7 Dispersor para emulsificación

Fuente: Díaz-Montes et al., 2023.

2.3.6. Vesículas

Las vesículas constituyen sistemas coloidales que son empleados como portadores de biocompuestos en la industria alimentaria (Morán et al., 2022). Cuentan con un núcleo acuoso protegido por una membrana rica en polímeros, tensoactivos no iónicos y fosfolípidos, principalmente. Gracias a estas características, el encapsulamiento permite compuestos tanto hidrófilos como hidrófobos, y de acuerdo con su tamaño, se clasifican en la Tabla 1:

Tabla 1 Tipos de vesículas

Vesícula	Tamaño (nm)
Unilamelares (SUV)	20 – 100
Unilamelares grandes (LUV)	> 100
Multilamelares (MLV)	500

Fuente: Morán et al., 2022.

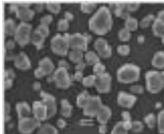
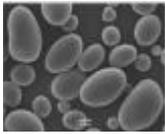
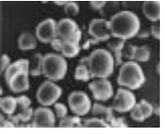
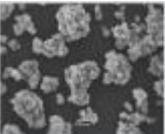
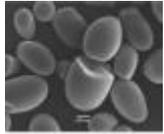
2.3.7. Almidón

Este carbohidrato de almacenamiento puede encontrarse en las raíces, frutos y semillas de las plantas y constituye una fuente de energía de la misma en épocas de rebrote y latencia. Además, es un polímero que cuenta con propiedades fisicoquímicas las cuales pueden modificarse tanto a nivel enzimático, físico y químico, con el propósito de optimizar sus propiedades.

El empleo de almidón en sistemas coloidales para la formación de nanopartículas, se debe a la amilopectina y amilosa. La primera es el principal componente que gran parte de los almidones, cuenta con una estructura ramificada con cadenas cortas de D-glucosa, en tanto que la amilosa ocupa un peso del 15 al 35 % del almidón, cuenta con cadenas largas y ligeras ramificaciones (Archundia Sánchez, 2022).

Dentro de la industria alimenticia, las β -ciclodextrinas, maltodextrinas y los almidones modificados, son los de mayor empleo, debido a sus características, y de estos, los que provienen de la tapioca, arroz, trigo, maíz y patatas, son los que presentan mejores beneficios para la encapsulación (Parra Huertas, 2010). No obstante, también se puede encapsular con almidones provenientes de la quinoa, amaranto, taro y el pinhão (Hoyos-Leyva et al., 2018). Sin embargo, si bien el almidón presenta varias ventajas en su uso como vehículo de encapsulación de biocompuestos, suele presentar un nivel bajo de protección en cuanto a la oxidación se refiere (Sandoval Aldana, et al., 2004). En la Tabla 2, se describen las principales fuentes de almidón, tamaño, contenido de amilosa y morfología:

Tabla 2 Principales fuentes de almidón, tamaño, contenido de amilosa y morfología

Fuente	Maíz	Papa	Tapioca	Arroz	Sagú
Tamaño del gránulo	14 μm	41 μm	17 μm	3 μm	33 μm
Contenido de amilosa	25 %	20 %	17 %	19 %	28 %
Morfología					

Fuente: Jin et al., 2018.

Por su parte, Hoyos-Leyva et al. (2018) consideran a este biopolímero ideal para encapsular diversos compuestos tales como probióticos, proteínas, herbicidas, polifenoles, pigmentos, medicamentos, aromas, aceites esenciales y lípidos, principalmente, esto debido a sus propiedades como su viscosidad, retención de agua, capacidad de modificarse según su funcionalidad, su bajo costo y alta disponibilidad.

Otro de los beneficios que presenta el almidón, radica en la forma de sus gránulos, ya que dicha configuración permite un empaquetado más compacto, lo cual incrementa la retención de los compuestos activos. Asimismo, la manera tanto física como química con las que puede ser modificado, mejora notablemente sus características para encapsulación (Jin et al., 2018).

Finalmente, Maoyafikuddin et al. (2020) indican que los almidones pueden emplearse como reactivo para la síntesis de vesículas unilamelares, las mismas que están conformadas por bicapas de fosfolípidos y/o tensioactivos y cuentan con dimensiones entre los 20 – 100 nm, tal como se indica en la Tabla 1.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3. Materiales y metodología experimental

A continuación, se describe la metodología utilizada en la investigación, además de los equipos necesarios para el desarrollo de la parte experimental para la síntesis, caracterización, elección del experimento óptimo de las NPAs y encapsulación de compuestos antimicrobianos y evaluación de ellos.

3.1. Materiales

3.1.1. Preparación de fase acuosa y fase orgánica

- Almidón de maíz

Polvo de color blanco, insoluble en agua a temperatura ambiente y que fue provisto por la Universidad de Lund (Suecia), debido al diseño experimental este fue utilizado en la fase acuosa como en la fase alcohólica.

- Etanol absoluto

Se utilizó el suministrado por Sigma-Aldrich el que fue utilizado como solvente acuoso en la fase orgánica de la preparación de las NPAs.

- Agua milli-Q

Agua ultrapurificada mediante procesos de filtración y desionización suministrada por la Universidad de Oviedo y utilizada en la fase acuosa.

- Span 60

Conocido también como monoestearato de sorbitano, de la casa comercial Sigma-Aldrich. Es un tensoactivo no iónico de fórmula molecular $C_{24}H_{46}O_6$, tiene la capacidad de emulsionante, dispersante y humectante.

3.1.2. Encapsulación de compuesto bioactivos

- Eugenol

Compuesto incoloro, puro, de la casa comercial Sigma-Aldrich. Es un compuesto extraído de la planta *Syzygium aromaticum* principalmente, el cual posee propiedades antimicrobianas, este compuesto tiene su fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$.

- Cinnamon

Compuesto coloreado, en solución, suministrado por Sigma-Aldrich.

- Vainillina

Reactivo incoloro, puro, suministrado por Sigma-Aldrich.

- Rose oil

Compuesto coloreado, en solución, suministrado por Sigma-Aldrich.

- Clove oil

Compuesto coloreado, en solución, suministrado por Sigma-Aldrich.

- Orange oil

Compuesto coloreado, en solución, suministrado por Sigma-Aldrich.

3.1.3. Poder Antimicrobiano

- Caldo Lb

Este caldo es específico para el crecimiento de *E.coli*, se lo utiliza para crecer y estandarizar las bacterias.

- Medio de cultivo Lb

Al caldo anterior se le añade agar con el motivo de formar un gel para desarrollar las pruebas de inhibición en medio sólido.

3.2. Equipos

- Balanza Sartorius Research R200D (Sartorius)
 - Dimensiones: 21,8 x 36 x 32 cm
 - Peso: 8 kg
 - Diámetro de placa: 11 cm
 - Intervalo de temperatura permitido: 10 – 30°C
 - Tiempo de respuesta 2 s
 - Capacidad 200 g

- Rotavapor BUCHI R-205
 - BUCHI Vacuum controller V-800
 - BUCHI Heating Bath B-490
 - BUCHI Vac V-500
- Agitador magnético Agimatic-E
 - Intervalo de temperatura: 0 - 350°C
 - Velocidad de agitación: 0 – 1.500 rpm
 - Diámetro de placa: 15 cm
- Sonicador Branson SFX 150
 - Modelo de convertidor: convertidor tradicional o con convertidor de mano.
 - Potencia de salida: 150 W.
 - Alimentación de entrada: 120 V o 240 V.
 - Dimensiones: 31,75 cm largo x 19 cm ancho x 23,5 cm alto.
 - Peso: 14 lb.
- Bomba de Jeringa FisherBrand KDS100
 - Jeringas de plástico o vidrio de 10 uL- 60 mL
 - Peso: 2,71800 kg
 - Bomba de caudal rápido
- Equipo DLS Zetasizer Nano ZS (Malvern)
 - Medida de Tamaño
 - Rango de tamaño de partícula máximo (diámetro): 0,3 nm a 10 μ m
 - Volumen de muestra mínimo: 12 μ l
 - Concentración máxima de la muestra: Hasta un 40 % w/v
 - Medida de Potencial Z
 - Rango de tamaño de partícula (diámetro): 3,8 nm a 100 μ m
 - Rango de Potencial Z: sin limitación efectiva.
 - Rango de conductividad: 0 a 200 mS/cm
- Centrifuga Ortoalresa biocen 22R
 - Capacidad máxima tubos 8 x 15 ml
 - Tipo pantalla LCD
 - Velocidad máxima 18.100 rpm
 - Refrigerada
- Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL 1011,

- KV: 100 KV
- Cámara Digital de 11Megapixeles (GATAN)
- Dispositivo de Placas
- hasta 600.000 x
- Resolución (puntos de 0,4 nm, líneas de 0,2 nm).
- TURBISCAN AGS (Formulation)
 - Fuente de luz NIR de 880 nm de longitud de onda.
 - Tecnología: MLS-Multiple Light Scattering y SLS-Static Light Scattering.
 - Detección: S - MLS.
 - Multimuestra: 54 células.
 - Volumen de muestra: 20 ml.
 - Control de T^a: Ambiente+5°C a 60°C.

También se utilizaron tubos eppendorf de 1,5 mL, tubos falcon de 15 y 50 mL, celdas de plástico para las determinaciones de potencial-Z y de tamaño de partícula para la parte de preparación de fase acuosa y fase orgánica. A su vez en la parte microbiológica se utilizó cajas de Petri.

3.3. Metodología experimental

La realización de este trabajo se ejecutó en base a investigaciones anteriores en las que se pusieron a punto dos métodos que han dado muy buenos resultados para sintetizar nanovesículas. En este estudio, se van a adaptar para sintetizar sistemas coloidales utilizando almidón para la encapsulación de compuesto antimicrobianos.

3.3.1. Síntesis de nanovesículas

Para la síntesis de nanovesículas se utilizaron como compuestos de membrana Span 60 y almidón de maíz, los experimentos se desarrollaron primero usándolos por separado y posteriormente se probaron formulaciones con ambos compuestos en la misma proporción (0,16 % p/v). Con los resultados obtenidos de estos experimentos preliminares se eligió el método de preparación más apropiado (inyección de etanol o hidratación de película delgada). A continuación, se probaron a diferentes concentraciones de ambos compuestos, tanto de Span 60 como de almidón, desde 0,04 % (p/v) hasta 0,32 % (p/v) y

así poder determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo la encapsulación del compuesto antimicrobiano.

Tanto los nanocoloides obtenidos mediante inyección de etanol como película delgada fueron caracterizados en términos de tamaño, morfología, dispersión en la disolución y potencial-Z para de esta manera poder discriminar entre los experimentos y así elegir las mejores formulaciones. A continuación, se describen los métodos utilizados:

3.3.1.1. Método de Inyección de Etanol

De acuerdo con Pando Rodríguez (2014), esta técnica consiste en disolver en etanol tanto los aditivos como los tensioactivos, para luego inyectar la disolución en una fase acuosa en donde se encuentra el compuesto bioactivo, donde se forman los niosomas. Posteriormente, el etanol es separado por medio de la evaporación, obteniendo las vesículas con tamaños entre los 50 y 100 nm como se observa en la Figura 8.

Además, Gouda et al. (2021) coinciden en que el método de inyección de etanol constituye una alternativa a otros métodos, ya que para la aplicación de esta técnica no es necesario aplicar la sonicación, por lo que existe mayor protección de los fosfolípidos contra la degradación y oxidación que se producen en otras técnicas como la de película delgada. Asimismo, reduce el daño que puede suscitarse en las moléculas de soluto por sonicación, además de una posible toxicidad debido a la erosión del titanio de las sondas sonicadoras. Cabe indicar, que el etanol es un compuesto más seguro en comparación con el metanol o el cloroformo, empleados en la técnica de película delgada.

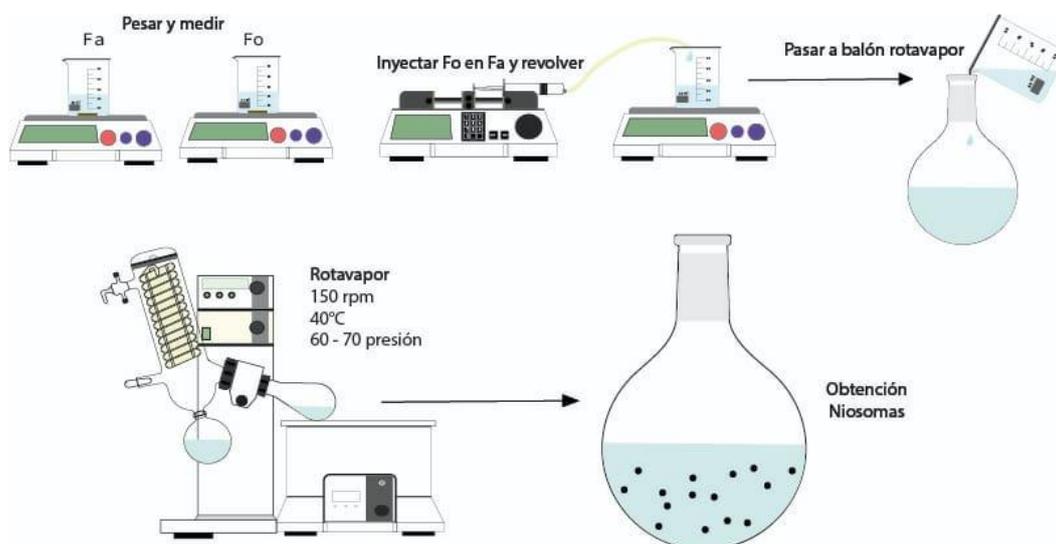


Figura 8 Esquema de la técnica de inyección de etanol

Las diferentes fases acuosas se disuelven mediante calor a 80°C y agitación de 500 rpm en una placa calefactora. A continuación, la fase orgánica (20 mL) se inyecta a la fase acuosa usando una bomba de jeringa a 120 mL/h con un diámetro de jeringa Ø22, mientras la fase acuosa se agita a 400 rpm para la formación de nanovesículas. Una vez juntas las fases, estas se transfieren a un balón de rotavapor para su posterior eliminación de la fase orgánica en las siguientes condiciones: temperatura de 40°C del baño de agua, la rotación del balón es de 150 rpm y la bomba de vacío produce una presión de 60-70 mbar. De esa forma al terminar de evaporar la fase orgánica inyectada ya se tendrían formadas las nanovesículas en la fase acuosa.

3.3.1.2. Método de película delgada (Thin Film)

El método de Thin Film o de hidratación de película delgada (Figura 9), es una de las técnicas más antiguas para la preparación de vesículas multilamelares, en donde los fosfolípidos y/o tensioactivos se disuelven en cloroformo o metanol y se evapora gracias al empleo de una bomba al vacío a una temperatura entre los 45 a 60 °C, lo cual elimina el disolvente empleado. No obstante, si los volúmenes son inferiores a 1 ml, es posible eliminar el disolvente mediante una corriente de nitrógeno. Gracias a este paso, se produce una película delgada, seca y homogénea, compuesta por bicapas, para finalmente, hidratar la película en un medio acuoso durante un tiempo entre una a dos horas, a una temperatura de 60 a 70 °C (Lombardo y Kiselev, 2022).

Cabe indicar que, para este método, se requiere la ejecución de pasos adicionales tales como la extrusión o sonicación, los cuales reducen y homogenizan las dimensiones de las vesículas (Jaafar-Maalej et al., 2010). Además, esta técnica abarca la disolución tanto de estabilizadores como de tensioactivos en un medio orgánico, no obstante, para conseguir óptimos resultados en cuanto a la homogenización se puede aplicar agitación manual o la sonicación (Pando Rodríguez, 2014).

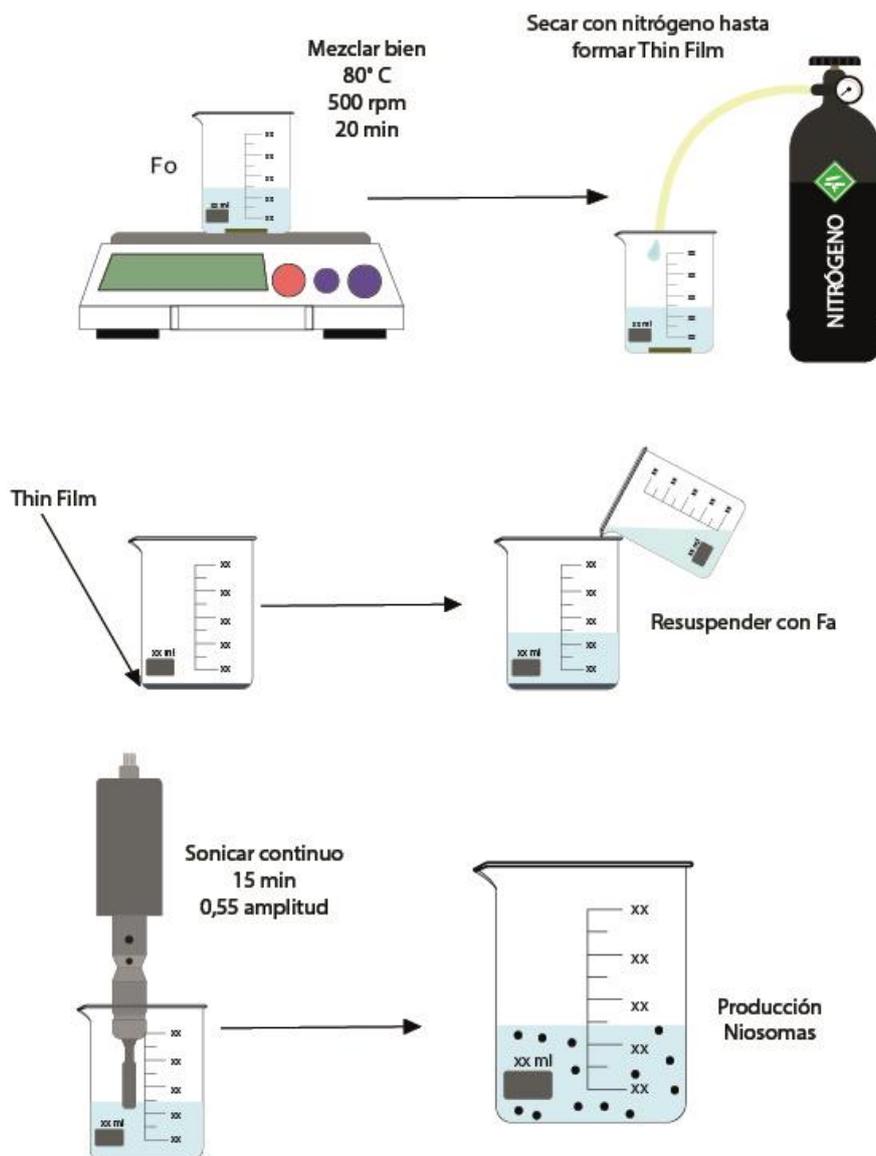


Figura 9 Esquemática de la técnica de película delgada

Se disolvieron los reactivos en la fase orgánica en una placa calefactora a 80°C y 500 rpm alrededor de 20 min. A continuación, se produjo la evaporación de la fase orgánica mediante gas nitrógeno para la formación de la película delgada. Después se resuspendió con la fase acuosa y se llevó a sonicación continua durante 15 minutos y 55 % de intensidad para así formar las nanovesículas.

3.3.2. Caracterización

3.3.2.1. Tamaño

De acuerdo con Valenzuela De León (2020), la Dispersión Dinámica de Luz (DLS), es un método de espectrofotometría que permite identificar la dimensión de las partículas de

forma individual gracias al empleo de la “microscopía combinada con el análisis de imágenes” (p. 34). No obstante, se puede emplear la luz laser como técnica de dispersión, en caso de que se conozca el índice de refracción del medio de suspensión, así como del compuesto a encapsular y de esta manera, comprobar las dimensiones de las partículas, la cuales se encuentran en un rango de 0,02-200 μm .

Por su parte, Carrascal Panadero (2017), considera que esta técnica resulta versátil y no invasiva para la medición de las nanopartículas que suelen encontrarse en la región submicrométrica. Asimismo, el autor indica que “los valores de ζ superiores a +30 mV e inferiores a -30 mV representan sistemas coloidales estables” (p. 39). A continuación, se puede observar el equipo DLS utilizado en la Figura 10:



Figura 10 Equipo DLS

Para el tamaño de partícula, se utilizó el equipo DLS Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern), en el que, mediante la dispersión de luz, dará una idea aproximada del tamaño de partícula. Esta técnica se utilizó para todos los experimentos, por consiguiente, se realizó introduciendo una alícuota en cubetas desechables para determinar si el tamaño de partícula y la homogeneidad (mediante determinación del índice de polidispersidad) de las partículas sea el adecuado.

Algo que es recomendable para esta técnica, es la de realizarla lo antes posible de la síntesis de la muestra, ya que el método con el pasar del tiempo va a ir sedimentando las partículas y no brindará una lectura adecuada del tamaño de las partículas.

3.3.2.2. Morfología

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), es una técnica de microscopía que cuenta con una resolución alta, la cual emplea un haz de electrones que permiten obtener imágenes del material y su estructura interna (Ríos-Aguirre y Gil-Garzón, 2021).

En torno a la encapsulación de alimentos bioactivos, el TEM es empleado para el estudio de la estructura de partículas encapsuladas, puesto que con ella se puede visualizar cada una de ellas a un nivel submicrométrico, y de esta manera, conocer su estructura interna, morfología y dimensiones (Araque Ruiz, 2022). El equipo utilizado se puede observar en la Figura 11:

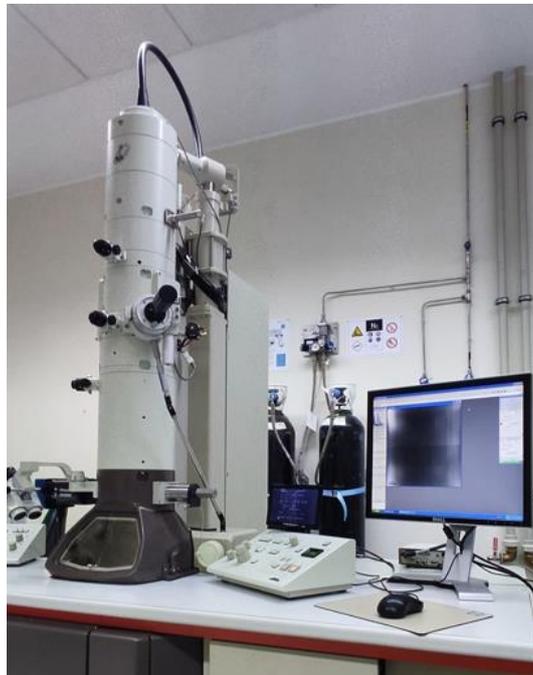


Figura 11 TEM (Microscopio electrónico de transmisión)

El TEM también se utilizó para la caracterización de las nanovesículas, para observar posibles cambios en las morfologías de las nanovesículas con las diferentes formulaciones.

3.3.2.3. Estabilidad

Según Huck Iriart (2013), para determinar la estabilidad de las dispersiones y emulsiones, se puede emplear el Turbiscan, equipo óptico vertical que es empleado para dar seguimiento a cada una de las etapas y procesos físicos, tales como la formación de agregados o sedimentación, que se producen con frecuencia en una dispersión coloidal (Figura 12).



Figura 12 Equipo Turbiscan Lab (Formulation)

En ese sentido, este equipo trabaja en base a la difracción que se produce cuando un haz de luz infrarroja atraviesa a la suspensión estudiada, lo cual permite identificar cada uno de los mecanismos de desestabilización tales como la coalescencia, floculación, sedimentación, entre otros (Estupiñán Sánchez, 2016).

En general, estos equipos funcionan enviando fotones por medio de una muestra y la detección de la luz transmitida y retrodispersada por las partículas que se encuentran en la dispersión, lo cual permite la detección de fenómenos de desestabilización incipientes a lo largo de la muestra examinada, hasta 200 veces más rápido en comparación con otras pruebas visuales (Álvarez Cerimedo, 2013).

Por ello, las muestras con la concentración de Span 60 y almidón encapsuladas anteriormente fueron sometidas a diferentes rangos de temperaturas 4°C, 30°C y 60°C, además de diferentes concentraciones de NaCl 0 %, 1,5 % y 3 % a 30°C y también a diferentes concentraciones de pH 3,0, 6,0 y 9,0, observando así la estabilidad de las nanovesículas en suspensión durante 15 días.

3.3.2.4. Eficacia de Encapsulación (EE)

Según las consideraciones de Naka Kishimoto (2008), para analizar la vainillina se emplea el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), el cual permite analizar además el etil vainillina, p-hidroxibenzaldehído, el ácido vainílico y el ácido hidroxibenzoico (Naka Kishimoto, 2020).

Ya que el método HPLC se basa en la capacidad que cuentan distintos componentes químicos para disolverse y migrar por medio de una fase móvil y una estacionaria, donde se produce su separación, permite conseguir tanto separación como su purificación. En ese sentido, para la vainillina se emplea una columna de la fase estacionaria de sílice, en tanto que la fase móvil consiste en una solución de metanol y agua, en la que sus porcentajes van a depender del nivel de polaridad de los compuestos que se van a separar (Pallo Altamirano, 2022).

Siguiendo las consideraciones acerca de la vainillina, se determinó mediante técnicas de HPLC en la que una vez encapsuladas las muestras, estas se filtraron. Las nanovesículas filtradas se mezclaron con metanol 1:10 para así destruir la estructura y liberar la vainillina. La cuantificación de vainillina se realizó mediante HPLC utilizando la columna C18 (4,6 mm, 150 mm, 5 um), mediante un gradiente lineal se utilizó agua (A) y metanol (B) en la fase móvil, empezando el gradiente desde 20 % de B fue ascendiendo hasta el 100 % de B durante 5 min. Después se mantuvo constante 10 min el flujo utilizando un caudal de 0,8 mL/min. De esta manera, mediante el área de los picos se obtuvieron las concentraciones de vainillina de cada una de las muestras. Finalmente, se utilizó para la eficacia de encapsulación la fórmula siguiente:

$$EE \% = \frac{(\text{concentración de vainillina en nanovesículas purificadas})}{(\text{concentración de vainillina en nanovesículas no purificadas})} \times 100$$

Fuente: Marchiano, 2023.

3.3.3. Pruebas de inhibición

Las pruebas de inhibición se las realizó con diferentes concentraciones de vainillina (100, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 mg/mL), también se utilizaron diferentes aceites esenciales y compuestos puros como eugenol, Cinnamon Leaf oil, Rose Oil, Clove Oil, Orange Oil. Las pruebas se realizaron en agar Lb Miller especial para el crecimiento de *E.coli*. Se realizó mediante la técnica de difusión en agar, haciendo pocillos de un centímetro de diámetro y colocando dentro de ellos 0,1mL de los diferentes posibles antimicrobianos. Para ello se inoculo *E.coli* a 2×10^7 CFU durante 3 días a 30°C, posteriormente se observó la presencia o ausencia de halos en los diferentes reactivos utilizados lo que permitió determinar aquellos que presentaban actividad antimicrobiana. Después de elegir el mejor experimento se dispuso a encapsular los compuestos que dieron una respuesta positiva.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y Discusión

4.1. Selección del método

Para la selección del método lo primero que se realizó fue establecer diferentes formulaciones utilizando Span 60 y almidón mezclándolos y utilizándolos por separado. Las formulaciones se pueden observar en las siguientes tablas 3 y 4. Los métodos utilizados son inyección de etanol e hidratación de película delgada respectivamente.

Tabla 3 Relación de compuestos y concentraciones en la preparación de nanovesículas mediante el método de inyección de etanol

	Componentes de las fases		Concentración componentes % (p/v)	
	Fase orgánica	Fase acuosa	Fase orgánica	Fase acuosa
M1 50mL	Span 60	Almidón	0,16	0,16
M2 50mL	Almidón, Span 60		0,16, 0,16	
M3 50mL		Almidón		0,16
M4 50mL	Span 60		0,16	
M5 50mL	Almidón		0,16	

Tabla 4 Relación de compuestos y concentraciones en la preparación de nanovesículas mediante el método película delgada

	Componentes de las fases		Concentración componentes % (p/v)	
	Fase orgánica	Fase Acuosa	Fase orgánica	Fase acuosa
M1 3mL	Span 60	Almidón	0,16	0,16
M2 3mL	Almidón, Span 60		0,16, 0,16	
M3 3mL		Almidón		0,16
M4 3mL	Span 60		0,16	
M5 3mL	Almidón		0,16	

Una vez realizados los experimentos, se utilizó el equipo DLS para establecer el tamaño de partícula, la monodispersidad de la distribución de tamaños de partícula y el potencial zeta de cada una de las muestras como se puede observar en las tablas 5 y 6. Se puede observar cómo los tamaños obtenidos por el método de inyección en etanol son más pequeños (165-241 nm) en comparación con los tamaños de las nanovesículas sintetizadas por el método de película delgada (153-548 nm). Además, las muestras obtenidas por este segundo método eran más polidispersas con valores de PDI más alto (valores medios de 0,3 para inyección de etanol frente a 0,4 para hidratación de película delgada). Estos resultados están en concordancia con la literatura (Sarabandi et al., 2019).

Tabla 5 Z-average, Tamaño, PDI y potencial Zeta muestras inyección de etanol

	Z-average (nm)	Tamaño (nm)	PDI	Pot zeta (mV)	Tamaño ImageJ (nm)
M1 50mL	241±15	72±8	0,359±0,033	-25,3	273±27
M2 50mL	173±6	61±44	0,325±0,035	-34,2	318±77
M3 50mL	271±55	167±58	0,237±0,152	-20,5	241±54
M4 50mL	165±3	66±20	0,198±0,015	-34,2	110±21
M5 50mL	226±5	199±9	0,271±0,031	-31,1	151±10

Tabla 6 Z-average, Tamaño, PDI y potencial Zeta muestras película delgada

	Z. average (nm)	Tamaño (nm)	PDI	Pot zeta (mV)	Tamaño ImageJ (nm)
M1 3mL	310±7	88±4	0,484±0,015	-17,7	151±39
M2 3mL	199±5	72±11	0,355±0,018	-24,5	259±46
M3 3mL	333±19	230±7	0,437±0,037	-11,4	80±15
M4 3mL	153±3	38±3	0,365±0,016	-24	91±30
M5 3mL	548±59	349±12	0,468±0,084	-21,3	162±9

Adicionalmente, por medio de microscopia electrónica TEM, se observó las morfologías de las muestras tal como se observa en las figuras 13 y 14, Además, se midió su tamaño por medio del programa ImageJ para contrastarlo con el obtenido en DLS ya que si las partículas aglomeran el equipo da valores mayores de los realmente obtenidos, datos medios obtenidos en el programa ImageJ se encuentran recogidos en las tablas 5 y 6. Finalmente, se estableció la mejor formulación teniendo en cuenta todos estos criterios para realizar la selección del método.

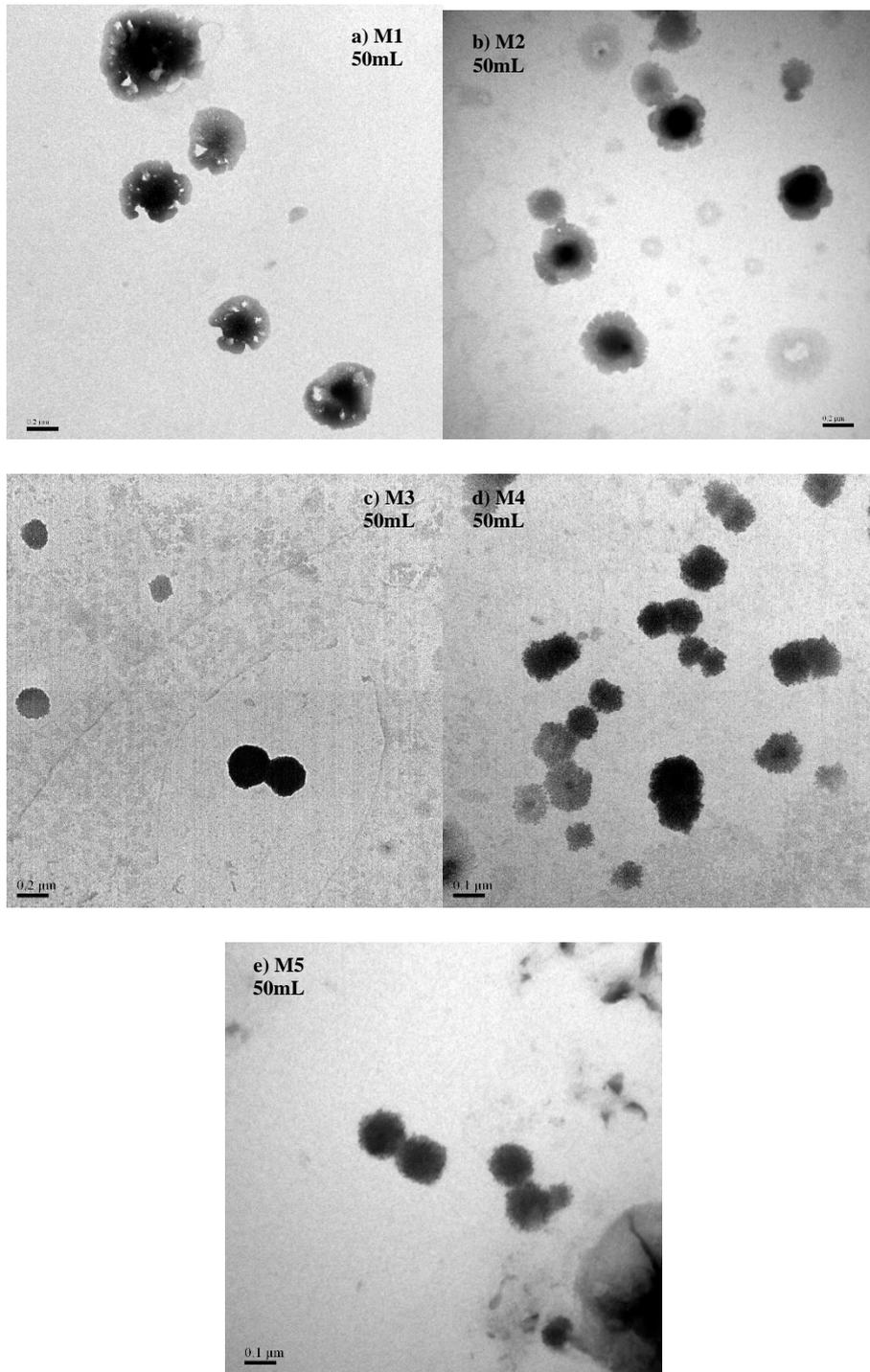


Figura 13 Micrografía TEM de las nanovesículas obtenidas a partir del método Inyección etanol: a). FO Span 60, Etanol; FA Almidón, Agua; b) FO Span 60, Etanol; Almidón, FA Agua; c) FO Etanol; FA Almidón, Agua; d) FO Span 60, Etanol; FA Agua; e) FO Almidón, Etanol

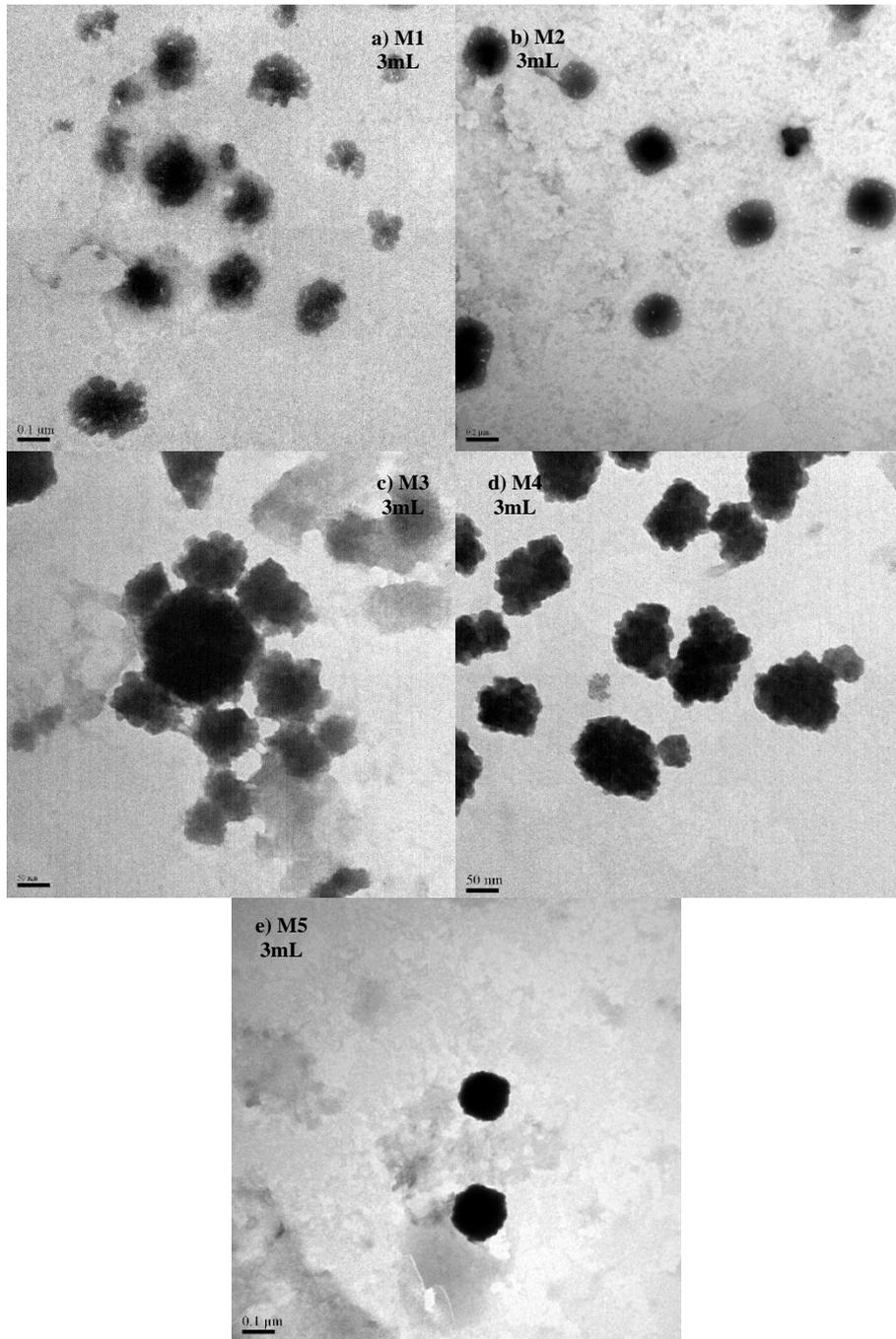


Figura 14 Micrografía TEM de las nanovesículas obtenidas a partir del método película delgada: a). FO Span 60, Etanol; FA Almidón, Agua; b) FO Span 60, Almidón, Etanol; FA Agua; c) FO Etanol; FA Almidón, Agua; d) FO Span 60, Etanol; FA Agua; e) FO Almidón, Etanol

De esta manera, se observó que cuando el Span 60 o el almidón se utilizan por separado tanto en los métodos inyección de etanol y película delgada imágenes c), d) y e) en ambas figuras 13 y 14, las muestras presentan tamaños reducidos (deseables) pero varios de ellos observados al microscopio presentan formas irregulares o atípicas (indeseables) por lo que fueron descartadas.

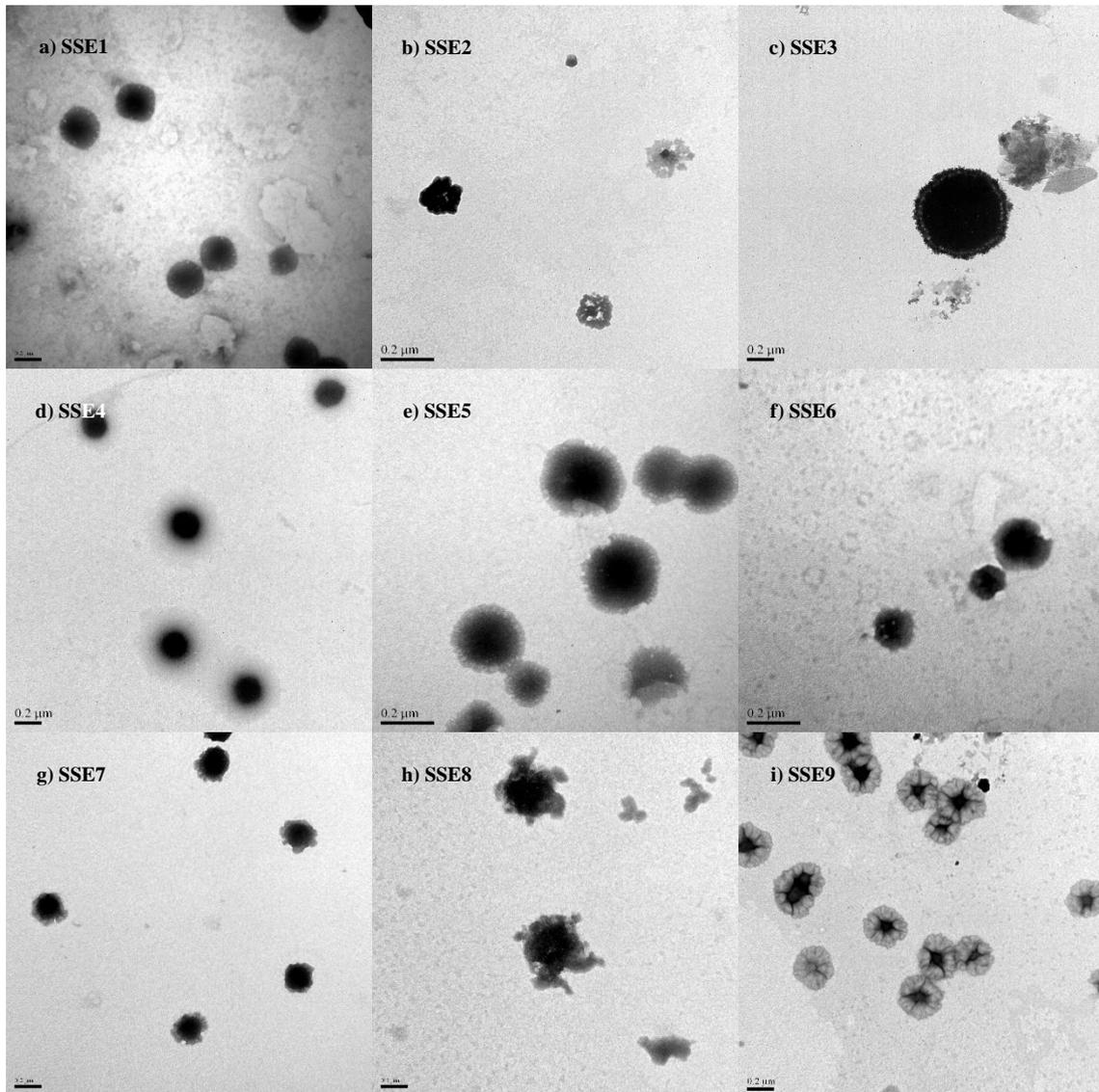
Sin embargo, al observar las muestras en las que se utilizan los dos compuestos a la vez, imágenes a) y b) en las dos figuras 13 y 14, se puede apreciar la formación de nanovesículas. En base a la morfología observada parece que el mejor experimento es el resultante de añadir ambos compuestos en la misma proporción (muestra m2, imagen b) tanto para inyección de etanol como para película delgada. Finalmente se eligió el método de película delgada ya que se obtienen nanovesículas de menor tamaño observadas al microscopio (80nm frente a 241nm).

4.2. Selección de la formulación

Una vez elegido el método de película delgada, se procedió a optimizar la formulación realizando un barrido de concentraciones variando los ratios entre ambos compuestos, por lo que se realizaron 17 experimentos estos se caracterizaron mediante DLS y TEM, se puede observar la relación de compuesto y concentraciones, además de la caracterización de las nanovesículas en los siguientes resultados en la Tabla 7 y en la Figura 15:

Tabla 7 Relación de compuestos-concentraciones, Z-average, tamaño, PDI y potencial Zeta en la preparación de nanovesículas mediante el método película delgada

	fase orgánica	Concentración Almidón (%p/v)	Concentración Span 60 (%p/v)	Z-average (nm)	Tamaño (nm)	PDI	Pot zeta (mV)	Tamaño Image J (nm)
SS1	Almidón, Span 60	0,16	0,16	266±16	70±4	0,52	-24,8	93±16
SS2	Almidón, Span 60	0,16	0,12	241±3	62±5	0,526	-26,5	293±15
SS3	Almidón, Span 60	0,16	0,08	232±10	179±14	0,345	-26,7	687±40
SS4	Almidón, Span 60	0,16	0,04	239±20	87±98	0,362	-25,1	412±55
SS5	Almidón, Span 60	0,12	0,16	212±4	40±9	0,436	-32,3	487±107
SS6	Almidón, Span 60	0,12	0,12	239±7	62±25	0,297	-29,6	325±100
SS7	Almidón, Span 60	0,12	0,08	255±12	63±11	0,513	-29,2	245±8
SS8	Almidón, Span 60	0,12	0,04	216±25	50±19	0,511	-25,8	271±7
SS9	Almidón, Span 60	0,08	0,16	209±2	43±15	0,449	-20,1	299±21
SS10	Almidón, Span 60	0,08	0,12	205±10	57±23	0,298	-26,9	502±45
SS11	Almidón, Span 60	0,08	0,08	213±10	57±9	0,324	-22,2	179±2
SS12	Almidón, Span 60	0,08	0,04	237±25	56±13	0,492	-21	149±12
SS13	Almidón, Span 60	0,04	0,16	185±2	38±10	0,279	-32,6	158±13
SS14	Almidón, Span 60	0,04	0,12	106±4	35±9	0,352	-13,6	181±14
SS15	Almidón, Span 60	0,04	0,08	221±2	46±8	0,412	-26,7	151±10
SS16	Almidón, Span 60	0,04	0,04	192±2	41±10	0,467	-31,2	301±42
SS17	Almidón, Span 60	0,32	0,32	333±14	129±12	0,373	-33,1	159±40



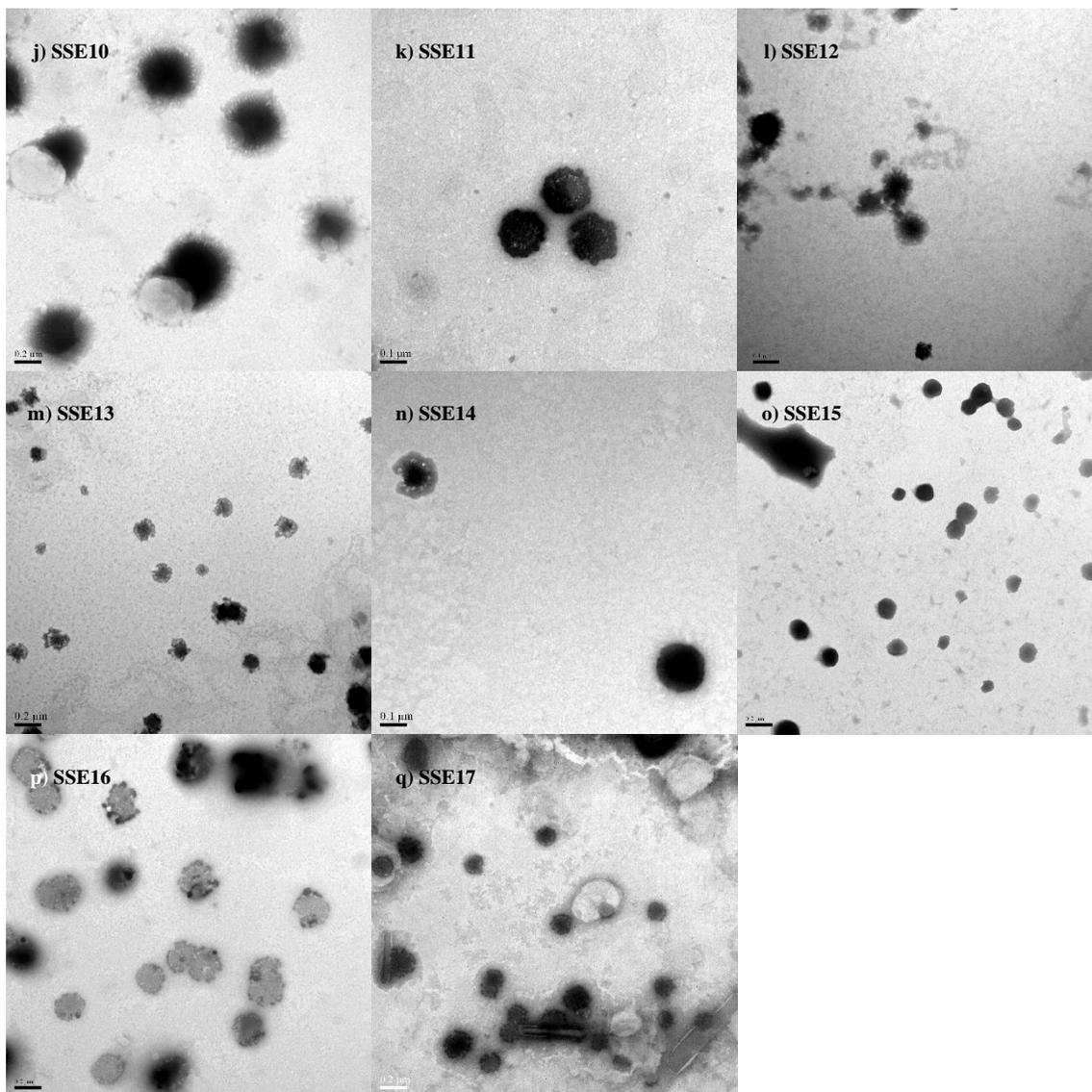


Figura 15 Micrografía TEM de las nanovesículas obtenidas a partir del método película delgada: a) SS1; b) SS2; c) SS3; d) SS4; e) SS5; f) SS6; g) SS7; h) SS8; i) SS9; j) SS10; k) SS11; l) SS12; m) SS13; n) SS14; o) SS15; p) SS16; q) SS17

De acuerdo con los datos brindados por el DLS y las imágenes del TEM, se eligieron los experimentos SS1 (0,16 %; 0,16 %), SS11(0,08 %; 0,08 %) y SS17 (0,32 %; 0,32 %) los que serán utilizados en la encapsulación de compuestos. En base a la morfología observada los experimentos SS1, SS11 Y SS17 presentaron una buena formación de nanovesículas observados en las imágenes a) k) y q) de la Figura 15, además de tamaños adecuados para bioaplicaciones desde 93-179 nm.

4.3. Potencial Antimicrobiano

Se probaron los compuestos con potencial antimicrobiano para así determinar cuál de ellos será utilizado para los ensayos de encapsulación. Para ello, se colocaron en cajas de Petri, agar Miller en el cual se inoculó *E.coli* al 2×10^7 CFU, se realizaron pocillos de 1 cm de diámetro y se colocó cada uno de los compuestos antimicrobianos dando como resultado lo siguiente:

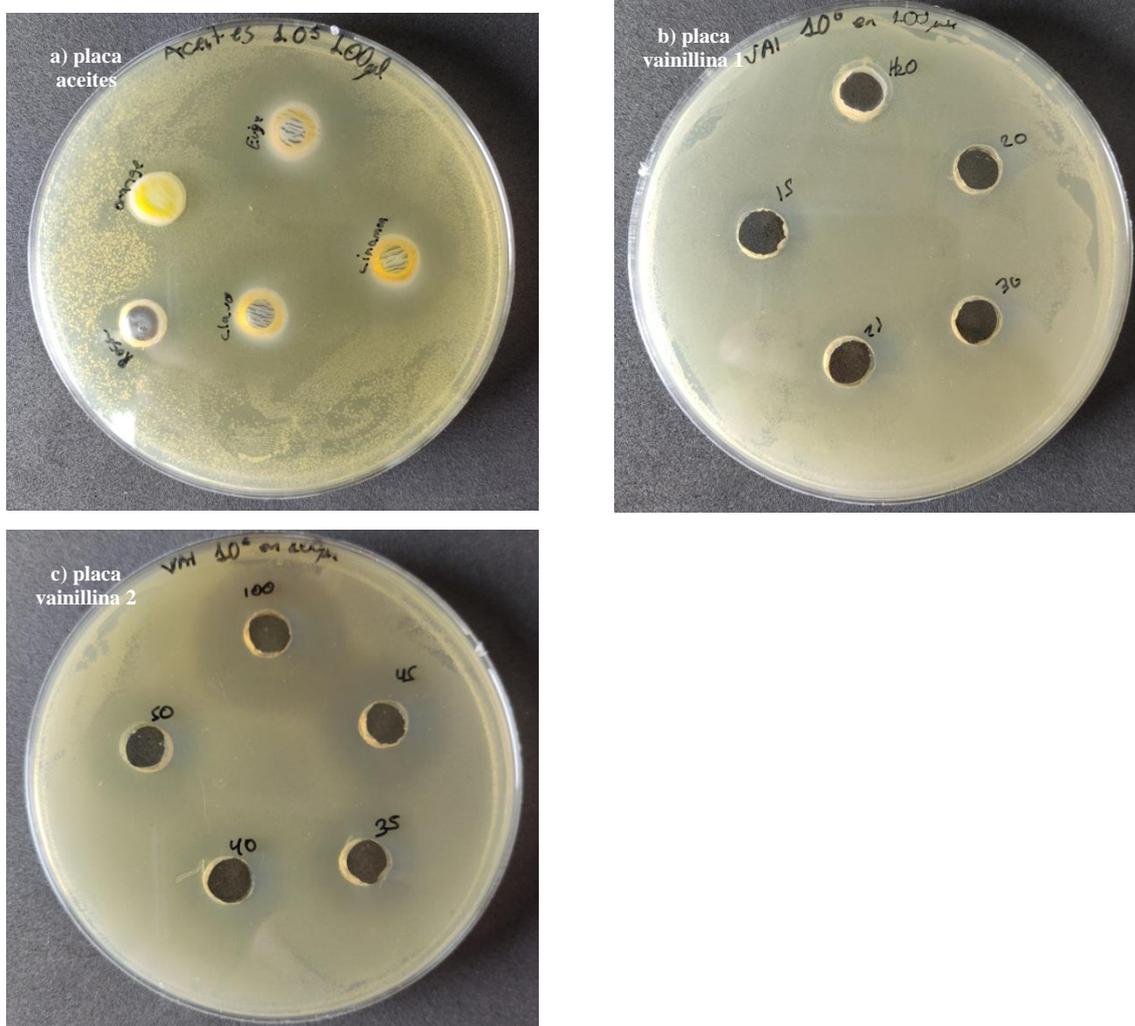


Figura 16 a) Placa Aceites (Orange, rose, eugenol, clove, cinnamon); b) Placa Vainillina 1 (15, 20, 25, 30 mg/mL); c) Placa Vainillina 2 (35, 40, 45, 50, 100 mg/mL)

En la Figura 16, se puede observar los compuestos que dieron positivo para capacidad antimicrobiana en la sección a) los que dieron positivo fueron Eugenol, Clavo y Cinnamon, en la sección b) ninguna concentración de vainillina tuvo capacidad antimicrobiana y en la sección c) existe capacidad antimicrobiana desde 35 mg/mL dando mejores resultados mientras va aumentando la concentración hasta 100 mg/mL.

4.4. Encapsulación de compuestos y actividad antimicrobiana

La encapsulación se realizó por el método de hidratación de película delgada, variando las concentraciones tanto de almidón como de Span 60 manteniendo su concentración total y se incorporó una cantidad de antimicrobiano del 50 % de la fase orgánica (1,2 mL de etanol absoluto). Las diferentes formulaciones se presentan a continuación en la Tabla 8:

Tabla 8 Relación de compuestos y concentraciones en la encapsulación de compuestos antimicrobianos

	Antimicrobiano	Almidón (%p/v)	Span 60 (%p/v)
8V	0,6 g	0,08	0,08
16V	0,6 g	0,16	0,16
16C	0,6 mL	0,16	0,16
16E	0,6 mL	0,16	0,16
32V	0,6 g	0,32	0,32
32C	0,6 mL	0,32	0,32
32E	0,6 mL	0,32	0,32

Nota: V muestras con vainillina, C muestras con cinnamón y E muestras con eugenol.

Se analiza la capacidad antimicrobiana de las muestras preparadas, tanto purificadas como sin purificar. En las muestras purificadas se elimina todo el compuesto antimicrobiano no encapsulado en las nanovesículas. Para dicha filtración se utiliza la técnica de filtración con una columna de Sepharosa.

En la Figura 17 se puede observar cómo mejora la eficacia de vainillina al aumentar la concentración de almidón y Span 60, a su vez se observa que la purificación de la muestra no afecta en el poder antimicrobiano del compuesto. Indicando que la propia vainillina encapsulada tiene capacidad antimicrobiana.

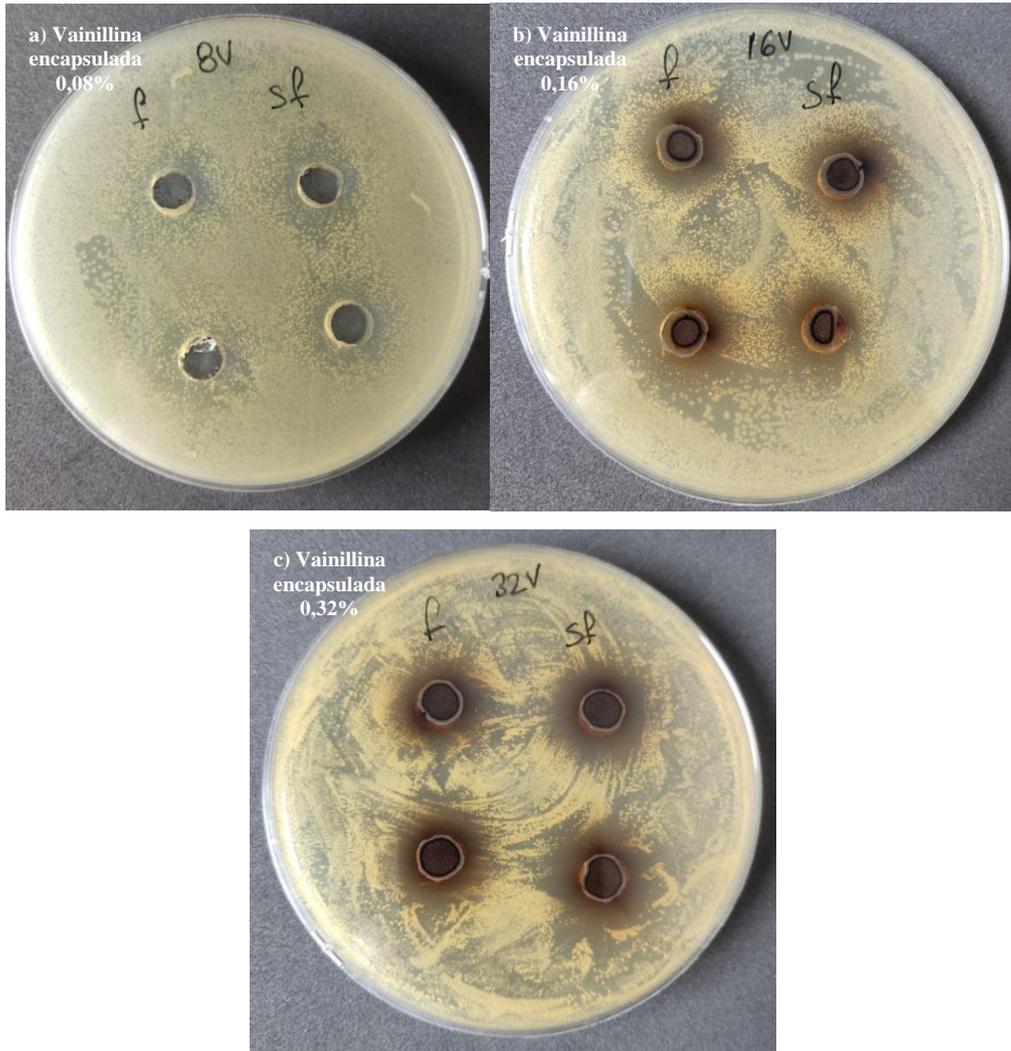


Figura 17 Placas vainillina encapsulada: a) 0,08% purificada (f) y sin purificar (sf); b) 0,16% purificada (f) y sin purificar (sf); c) 0,32% purificada (f) y sin purificar (sf)

La Figura 18 muestra que el eugenol se ve afectado cuando este es purificado. Viendo que para la muestra E16 el sistema purificado no contienen actividad antimicrobiana, indicando que es el eugenol libre el que está actuando en dicha actividad. Para la muestra E32 se aprecia capacidad antimicrobiana para la muestra tanto purificada como sin purificar, pero esta capacidad es mayor para las muestras sin purificar.

En la Figura 19, mientras aumenta la concentración de almidón y Span 60 se va formando una emulsión en vez de un sistema propiamente vesicular.



Figura 18 Placas eugenol encapsulado: a) 0,16 % purificado (f) y sin purificar (sf); b) 0,32 % purificado (f) y sin purificar (sf)



Figura 19 Encapsulación de eugenol (0,16 % y 0,32 %) formación de emulsiones

En la Figura 20 se observa que en la encapsulación de Cinnamon, no inhibe su capacidad antimicrobiana. Sin embargo, en la Figura 21 se puede observar que no se logró realizar una emulsión homogénea separándose en fases con aceite libre en la parte superior.

A raíz de los resultados observados se selecciona a la vainillina como el compuesto más apropiado para la preparación de sistemas niosomales sostenibles con capacidad antimicrobiana.



Figura 20 Placa Cinnamom encapsulado: a) 0,16 % sin filtrar (C16); b) 0,32 % sin filtrar (C32)

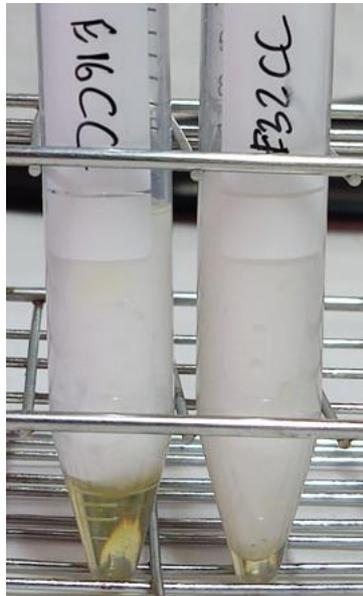


Figura 21 Encapsulación de Cinnamom (0,16 % y 0,32 %) formación de emulsiones

4.5. Estabilidad frente a diferentes medios

A continuación, se eligió la vainillina encapsulada para determinar la estabilidad de las nanovesículas al 0,16 % de almidón y 0,16 % de Span 60. Después de sintetizar la muestra elegida, se procedió a someter a diferentes temperaturas, pH y concentración de NaCl para medir la estabilidad de las nanovesículas en diferentes condiciones ambientales. Una fotografía de dichas muestras se detalla en la Figura 22.



Figura 22 Vainillina encapsulada sometida a diferentes medios para determinar estabilidad (salinidad, pH y temperatura)

Se observó que únicamente las muestras almacenadas sin sal y pH básicos mantenían la homogeneidad sin apreciarse precipitaciones responsables de la ruptura de las nanovesículas formadas. La temperatura no parece tener una influencia tan sobre la estabilidad de las nanovesículas.

Se analizaron los perfiles de retrodispersión de las emulsiones preparadas, obtenidos con las muestras de turbiscan,

En la Figura 23 no se observan grandes cambios en los perfiles de retrodispersión de las tres muestras almacenadas en medios de diferente salinidad, aunque se observa en todas ellas un aumento del perfil de backscattering en la parte baja de la celda, indicando la precipitación de la muestra consecuencia de la ruptura de las vesículas, este precipitado es mayor para las concentraciones más elevadas de sal.

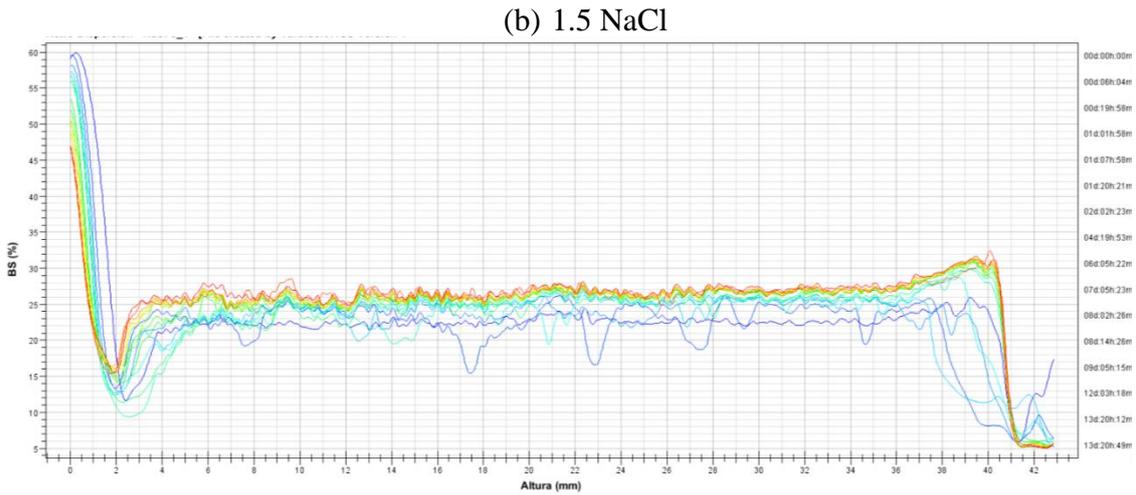
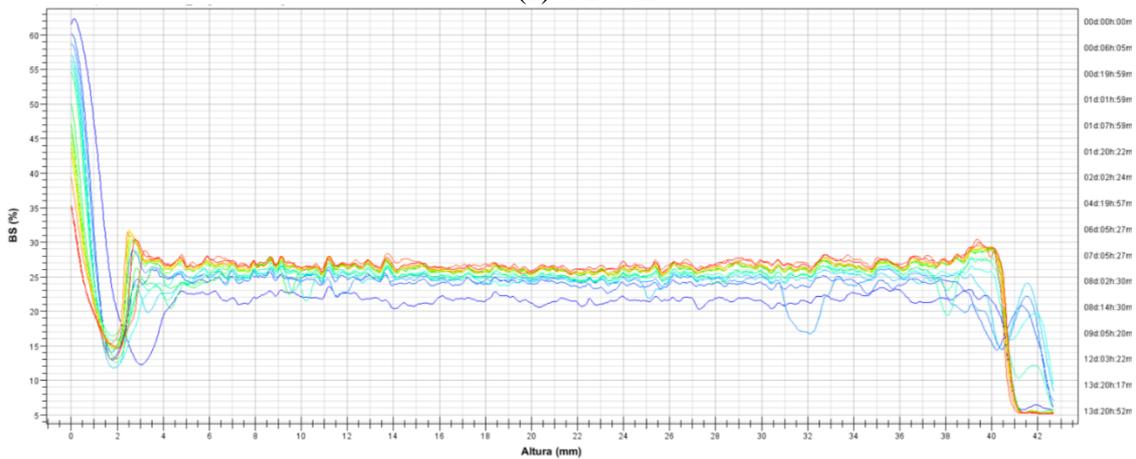
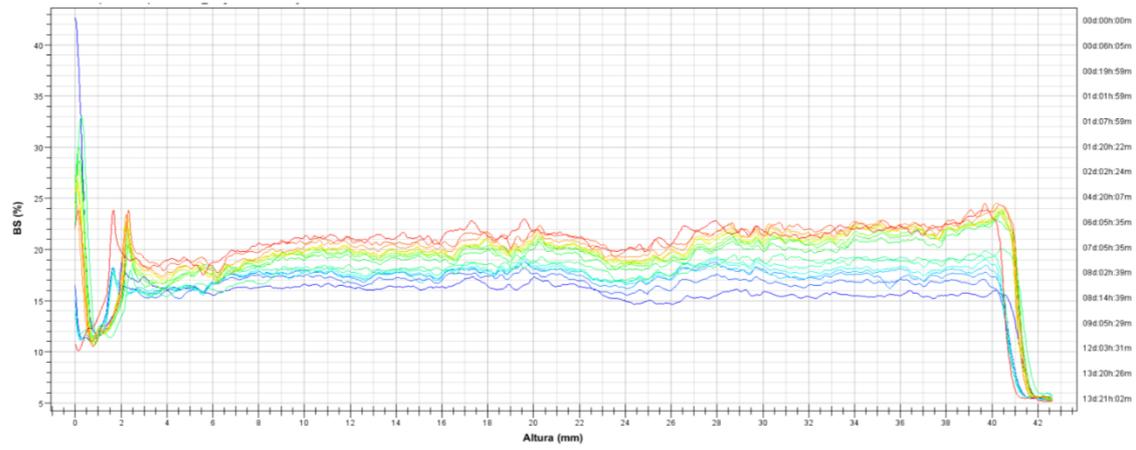
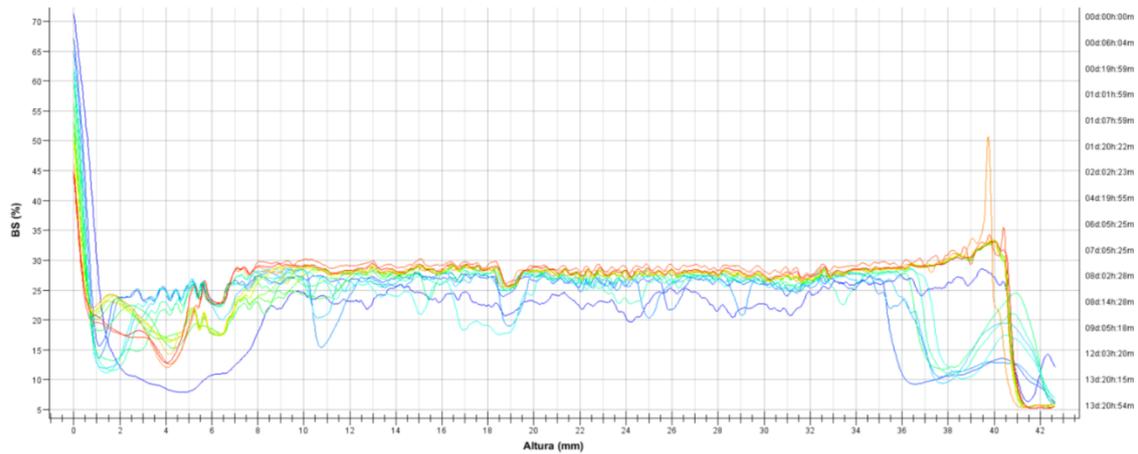
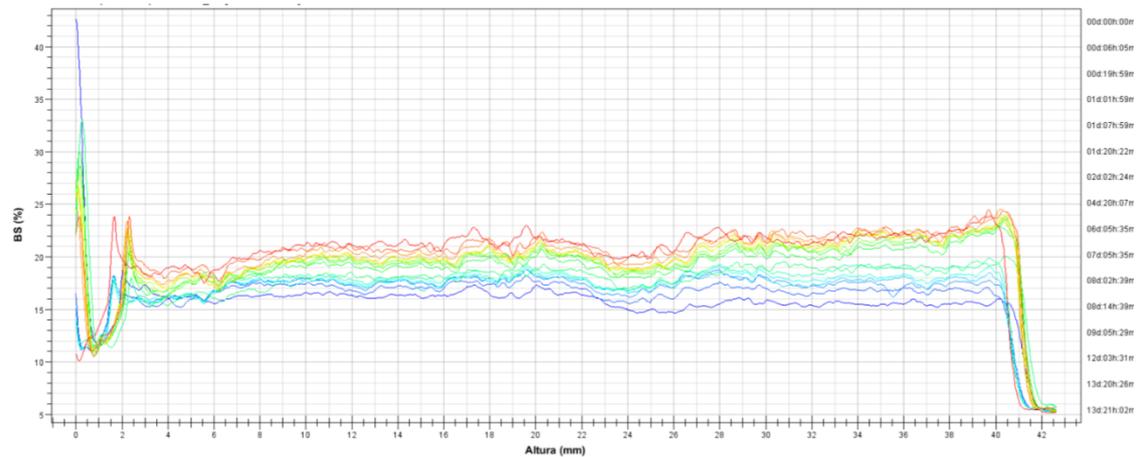


Figura 23 Perfiles de retrodispersión de vesículas en medio de diferente salinidad

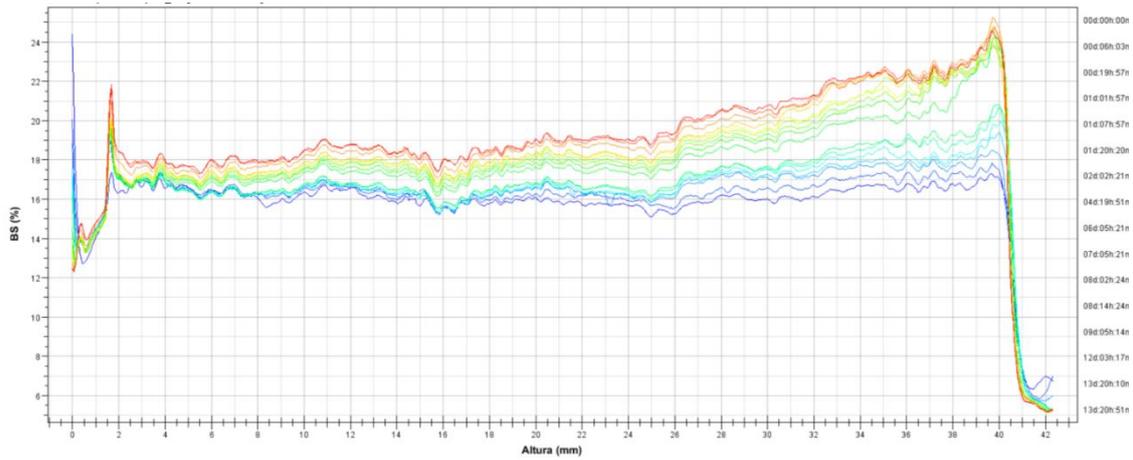
Se observó en la Figura 24 que a pHs ácidos existe una gran heterogeneidad de las muestras, tal y como se puede apreciar en la Figura 22, por la presumible ruptura de las vesículas preparadas. Tanto a pH 6 como a pH 9 las muestras presentan una mayor homogeneidad, aunque si se aprecia en ambos casos mayor diferencia en la parte superior de la celda con un aumento del perfil de retrodispersión en esta zona, especialmente para pH 9. Este hecho puede deberse a una posible aglomeración de vesículas en la parte superior lo que provoca una mayor retrodispersión de la luz que es emitida en dicha zona. Sin embargo, al observar las fotografías de las mismas, las muestras parecen blanquecinas en su totalidad sin capas de cremado ni clarificado aparentes, lo que indica que se debe a ligeros cambios en las muestras.



(a) pH 3



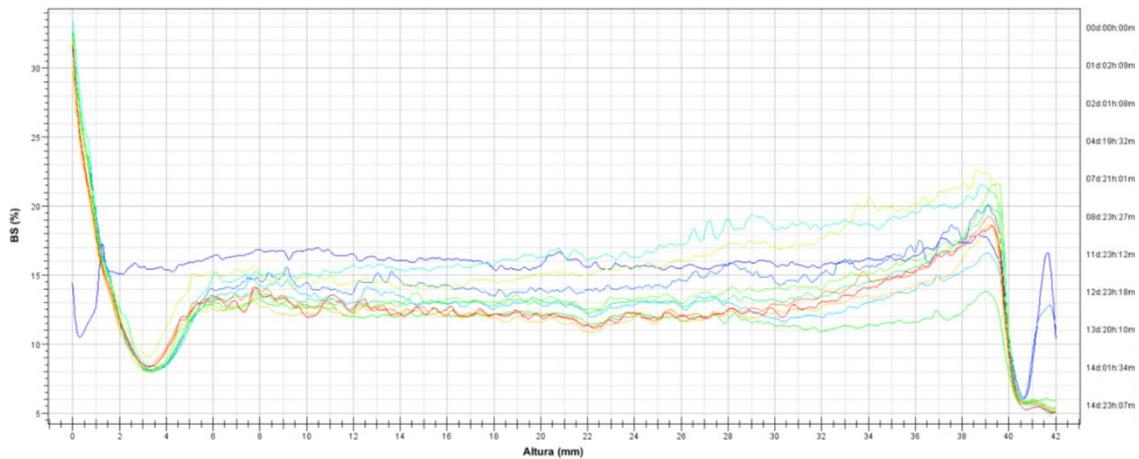
(b) pH 6



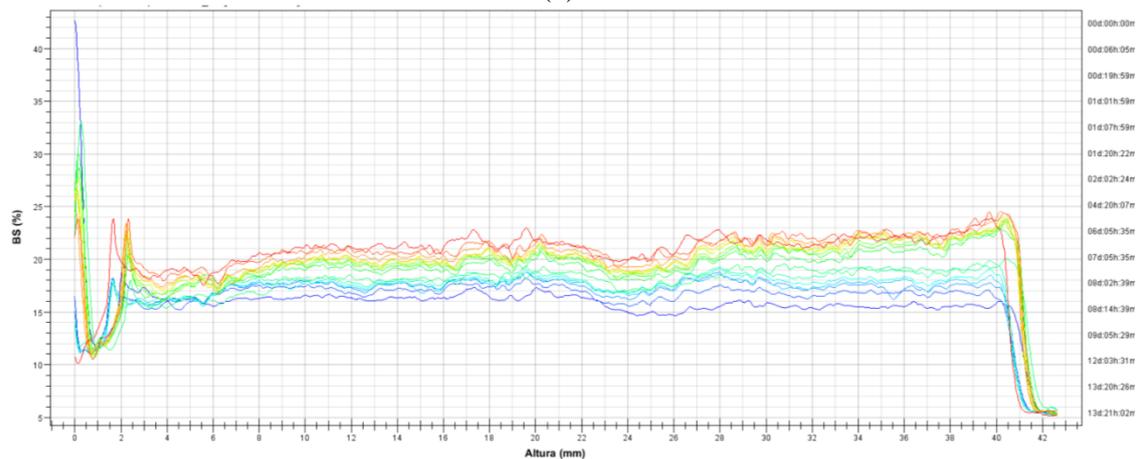
(c) pH 9

Figura 24 Perfiles de retrodispersión de vesículas en medio de diferentes pHs

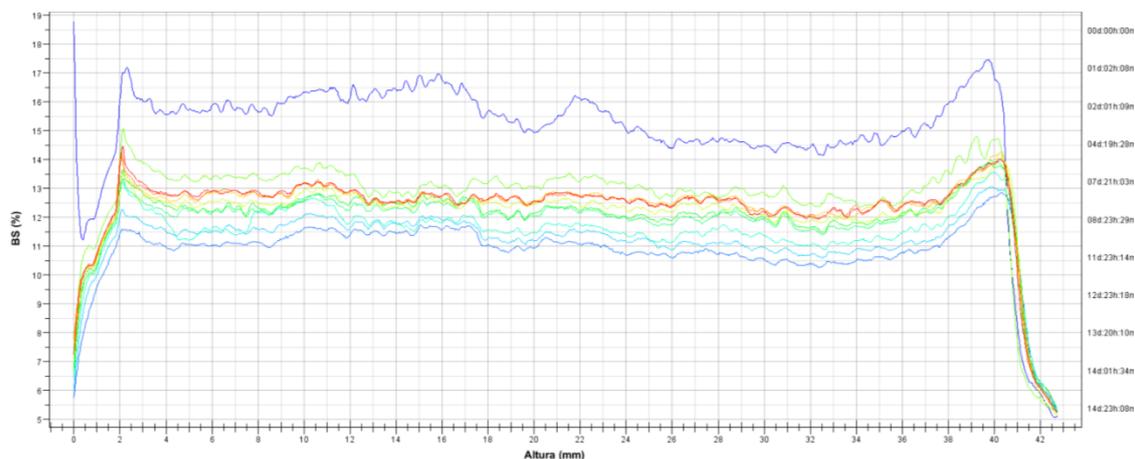
En las muestras almacenadas a diferentes temperaturas no se aprecian capas diferenciadas entre las muestras, pero si se ven un cambio a lo largo de toda la muestra indicando el cambio de tamaño de las vesículas almacenadas. Puede observarse que la muestra almacenada a 60°C sufre un cambio brusco entre la primera y segunda medida, pero a partir de ese momento los cambios apreciados son menores.



(a) 4°C



(b) 30°C



(c) 60°C

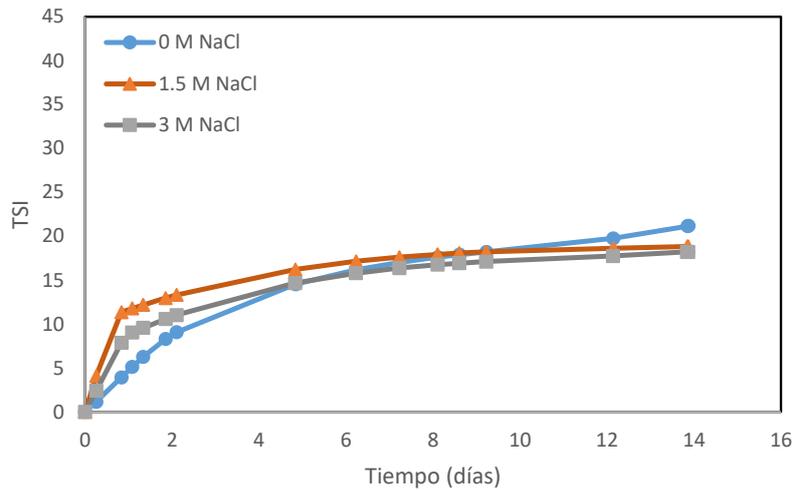
Figura 25 Perfiles de retrodispersión de vesículas en medio a diferentes temperaturas

Comparando con las medidas de tamaño obtenidas con DLS (Tabla 10) se ve las muestras en la que la presencia de vesículas sigue siendo apreciable, el tamaño de las mismas se reduce durante el almacenamiento produciéndose reducciones mayores a pH 6 y temperatura de almacenamiento de 60°C.

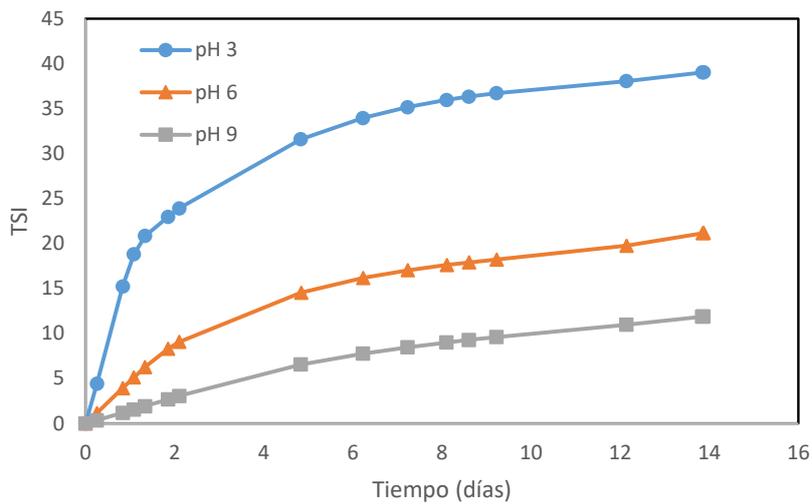
Tabla 9 Tamaño las muestras frescas y tras 14 días de almacenamiento a diferentes condiciones ambientales

Parámetro		Tamaño frescas (nm)	Tamaño 14 días (nm)
NaCl (mol/L)	0	508 ± 12	370 ± 7
	1,5	Inestable	Inestable
	3	Inestable	Inestable
pH	3	Inestable	Inestable
	6	508 ± 12	370 ± 7
	9	502 ± 25	432 ± 1
Temperatura (°C)	4	508 ± 12	380 ± 3
	30	508 ± 12	370 ± 7
	60	508 ± 12	301 ± 7

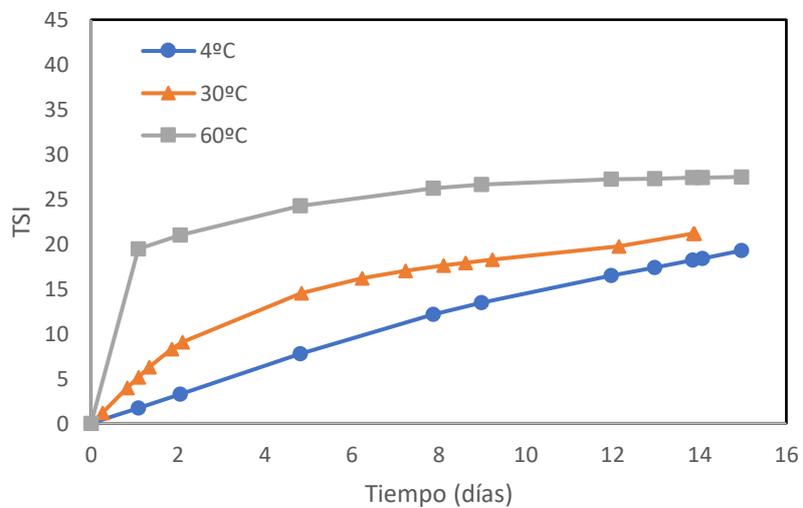
Se analiza además el parámetro TSI, turbiscan Stability Index que indica la estabilidad global de la muestra en función de los cambios totales que ha sufrido durante el tiempo de almacenamiento (Figura 26).



(a) Efecto de la salinidad del medio



(b) Efecto del pH del medio



(c) Efecto de la temperatura del medio

Figura 26 TSI de las muestras tras 14 días de almacenamiento a diferentes condiciones ambientales

Puede observarse que el pH es que tiene mayor efecto sobre la estabilidad de las vesículas, observándose mayor inestabilidad, mayor valor de TSI, para pH ácidos. Mientras que el almacenamiento a pH básico ofrece incluso una estabilidad ligeramente mayor que el observado al pH natural del medio, pH 6. Comportamiento similar fue observado en vesículas preparadas con Span 60 y colesterol encapsulando rifamicina (Marchianò et al., 2022).

Por otro lado, puede observarse que el almacenamiento a bajas temperaturas ofrece una inestabilidad paulatina para las muestras almacenadas, tanto a 4 como a 30 °C. Sin embargo, la inestabilidad observada en el almacenamiento a 60 °C parece ocurrir durante las primeras horas y a partir de ese momento no grandes cambios son apreciados en el parámetro de TSI, estos cambios iniciales pueden ser debidos a la adaptación de los componentes de membrana a la nuestra temperatura y por tanto su cambio en la estructura, los cuales una vez alcanzados parecen ser mantenidos en el tiempo.

Por último, la salinidad del medio parece afectar en mayor medida a la inestabilidad de las vesículas ya que en la en la Figura 22 se puede observar su precipitación al tiempo cero. Cabe mencionar que la Figura 26 en la sección a) no nos puede brindar suficiente información, ya que en este caso la inestabilidad observada con las muestras de 1,5 y 3 % de NaCl se produjo de inmediato no siendo posible evaluar cambios en la muestra durante el almacenamiento.

4.6. Eficacia de encapsulación

Por medio de HPLC se determinó la cantidad de vainillina presente en las muestras, para ello se hizo uso de un calibrado inicial (Ver Anexo 1). En la Tabla 10 se muestran los valores de EE de vainillina obtenidos para los sistemas preparados:

Tabla 10 Eficacia de encapsulación de muestra

MUESTRA	EE (%)
8V	62,0
16V	85,6
32V	88,8

Se ve como aumenta la EE con la cantidad de componentes de membrana vesicular (Span 60 y almidón) alcanzando valores del 89 % cuando se usó concentración de 0,32 % (p/v), obteniéndose valores similares, 86 %, con la concentración de 0,16 % (p/v). Para concentraciones menores, 0,08 % (p/v), se observó un cambio brusco en la EE con valores en torno al 62 %. Estos valores más altos de la EE justificarían el mayor potencial antimicrobiano observado para esas formulaciones.

5. CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Del presente trabajo se pueden extraer las conclusiones mencionadas a continuación:

-Se observó que el mejor método para la síntesis de nanovesículas es el de hidratación película delgada, ya que produce nanovesículas con tamaños más apropiados para bioaplicaciones, y mejor morfología. Además de que la incorporación de los componentes de membrana en la fase orgánica ofrece resultados más satisfactorios que la incorporación en la fase acuosa.

-La concentración mínima necesaria de almidón y Span 60 determinada fue de 0,16 % (p/v) de cada uno, ya que concentraciones menores no producen la formación adecuada de nanovesículas. Por otro lado, una cantidad mayor de compuestos de membrana aumenta el tamaño de las nanovesículas formadas.

-La concentración salina y el pH ácido hacen que se desestabilicen las nanovesículas, produciendo la ruptura y precipitación de las mismas. A su vez la temperatura de 4, 30 y 60°C y el pH de 6-9, no afectan en la estabilidad de estas, encontrándose estabilidad más elevada para pH básico y altas temperaturas. Por otro lado, el tamaño de partículas disminuye con el tiempo produciéndose reducciones del tamaño entre 20-30 % durante 14 días de almacenamiento.

-El eugenol, cinnamón, clavo de olor y vainillina presentaron actividad antimicrobiana frente a *E. coli*. La encapsulación de la vainillina mejoró su efecto antimicrobiano, siendo la formulación óptima en la que se usaba un total de componentes de 0,16 % (p/v) de cada compuesto, ya que se alcanzaron valores del 85 % de eficacia de encapsulación.

Bibliografía

- Abarca, R. L., Rodríguez, F. J., Guarda, A., Galotto, M. J., & Bruna, J. E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry*, 196, 968-975.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.023>
- Alfaro Bejarano, A. (2022). Encapsulación de aceites grasos poliinsaturados empleando la esporopolenina como potencial agente encapsulante [Universidad Autónoma del Estado de México]. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/112951>
- Álvarez Cerimedo, M. (2013). Estabilidad de emulsiones y encapsulación de aceites con propiedades nutraceuticas [Universidad de Buenos Aires].
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n5363_AlvarezCerimedo
- Alvira, E. (2018). Theoretical Study of the β -Cyclodextrin Inclusion Complex Formation of Eugenol in Water. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(4), 928.
<https://doi.org/10.3390/molecules23040928>
- Araque Ruiz, V. (2022). Encapsulación del ácido fólico en matriz de alginato de sodio/alcohol polivinílico para su posible integración en productos nutraceuticos [Universidad EIA]. <https://repository.eia.edu.co/handle/11190/5375>
- Archundia Sánchez, A. (2022). Evaluación del almidón de maíz doblemente modificado como agente encapsulante del extracto de hibiscus sabdariffa [Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo]. <http://200.57.56.70:8080/xmlui/handle/231104/2837>
- Barceloux, D. G. (2009). Cinnamon (*Cinnamomum* Species). *Disease-a-Month*, 55(6), 327-335. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2009.03.003>
- Beltrão de Freitas, C. A., Souza Costa, C. H., Santana da Costa, K., Aranha da Paz, S. P., Silva, J. R. A., Alves, C. N., & Lameira, J. (2022). Assessment of host-guest molecular

encapsulation of eugenol using β -cyclodextrin. *Frontiers in Chemistry*, 10, 1061624.

<https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1061624>

Camacho Elizondo, M., Vega Baudrit, J., & Campos Gallo, A. (2011). Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(4), 292-306.

Carrascal Panadero, A. (2017). Desarrollo de nanoestructuras de beta-lactoglobulina para la encapsulación y liberación controlada de compuestos bioactivos [Universidad de Oviedo]. <https://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/43600>

Castromonte, M., Wacyk, J., & Valenzuela, C. (2020). Encapsulación de extractos antioxidantes desde sub-productos agroindustriales: Una revisión. *Revista chilena de nutrición*, 47(5), 836-847. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182020000500836>

Cava Roda, R. (2013). Efecto antimicrobiano de vainillina y de aceites esenciales de canela y clavo en leche de vaca pasteurizada [Universidad de Murcia].

<https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/36692>

Coradello, G., & Tirelli, N. (2021). Yeast Cells in Microencapsulation. General Features and Controlling Factors of the Encapsulation Process. *Molecules*, 26(11).

<https://doi.org/10.3390/molecules26113123>

Di Giorgio, L., Salgado, P. R., & Mauri, A. N. (2022). Fish oil encapsulated in soy protein particles by lyophilization. Effect of drying process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(1), 206-213. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11347>

Díaz-Montes, E., Cerón-Montes, G. I., & Vargas-León, E. A. (2023). Encapsulación de compuestos bioactivos: Una revisión sistemática. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 10(20). <https://doi.org/10.29057/icbi.v10i20.9575>

- Estupiñán Sánchez, Ó. R. (2016). Nanovesículas para la encapsulación de fármacos antitumorales: Biomimesis de estrategias de transporte [Universidad de Oviedo].
<https://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/38985>
- Gamage, A., Punniamoorthy Thiviya, Mani, S., Prabaharan Graceraj Ponnusamy, Asanga Manamperi, Evon, P., Othmane Merah, & Madhujith, T. (2022). *Environmental Properties and Applications of Biodegradable Starch-Based Nanocomposites*. 14(21), 4578–4578. <https://doi.org/10.3390/polym14214578>
- Garda, M. R. (2020). Técnicas del manejo de los alimentos (3ra ed). Eudeba.
- Gouda, A., Sakr, O. S., Nasr, M., & Sammour, O. (2021). Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102174.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102174>
- Hoyos-Leyva, J. D., Bello-Pérez, L. A., Álvarez-Ramírez, J., & García, H. S. (2018). Microencapsulation using starch as wall material: A review. *Food Reviews International*, 34(2), 148-161. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1261298>
- Huck Iriart, C. (2013). Propiedades fisicoquímicas de microemulsiones estabilizadas con caseinato de sodio [Universidad de Buenos Aires].
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n5430_HuckIriart
- Jaafar-Maalej, C., Diab, R., Andrieu, V., Elaissari, A., & Fessi, H. (2010). Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of Liposome Research*, 20(3), 228-243. <https://doi.org/10.3109/08982100903347923>
- Jin, Y., Li, J. Z., & Malaki Nik, A. (2018). Chapter 17—Starch-Based Microencapsulation. En M. Sjöö & L. Nilsson (Eds.), *Starch in Food (Second Edition)* (pp. 661-690). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100868-3.00017-2>

- Kandasamy, S., & Naveen, R. (2022). A review on the encapsulation of bioactive components using spray-drying and freeze-drying techniques. *Journal of Food Process Engineering*, 45(8). <https://doi.org/10.1111/jfpe.14059>
- Leyva Jiménez, F. J. (2020). Aplicación de tecnologías avanzadas de extracción y encapsulación para la obtención de ingredientes funcionales a partir de *Lippia citriodora* [Universidad de Granada]. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/62879>
- Lombardo, D., & Kiselev, M. A. (2022). Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics*, 14(3), 543. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>
- Maoyafikuddin, M., Pundir, M., & Thaokar, R. (2020). Starch aided synthesis of giant unilamellar vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 226, 104834. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.104834>
- Marchianò, V., Matos, M., López, M., Weng, S., Serrano-Pertierra, E., Luque, S., Blanco-López, M. C., & Gutiérrez, G. (2023). Nanovesicles as Vanillin Carriers for Antimicrobial Applications. *Membranes*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/membranes13010095>
- Marchianò, V., Matos, M., Marcet, I., Cabal, M., Gutiérrez, G., Blanco-López, M. C. (2022). Stability of Non-Ionic Surfactant Vesicles Loaded with Rifamycin S, *Pharmaceutics*, 14, a 2626. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122626>
- Morán, D., Saweres-Argüelles, C., Marchiano, V., Bazsefidpar, S., Serrano-Pertierra, E., Matos, M., Gutierrez, G., & Blanco-López, M. C. (2022). Sustainable antibiofilm self-assembled colloidal systems. *Frontiers in Soft Matter*, 2, 1-15. <https://doi.org/10.3389/frsfm.2022.1041881>

- Moreno Botella, R. (2021). Los coloides. Los Libros De La Catarata.
- Nabavi, S. F., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sánchez, E., Daglia, M., & Nabavi, S. M. (2015). Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients*, 7(9), 7729-7748.
<https://doi.org/10.3390/nu7095359>
- Naka Kishimoto, A. M. (2020). Vanilla pompona (Orchidaceae), especie de orquídea de los humedales de Madre de Dios: Cuantificación por HPLC de la Vainillina y otros componentes aromáticos [Pontificia Universidad Católica del Perú].
<https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/16107>
- Navia, D. P., Villada, H. S., & Mosquera, S. A. (2010). Biofilms in the food industry. *Biología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 8(2), 118–128.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612010000200015&script=sci_abstract
- Ortega-Galindo, A. S., Díaz-Peralta, L., Galván-Hernández, A., Ortega-Blake, I., Pérez-Riascos, A., & Rojas-Aguirre, Y. (2023). Los liposomas en nanomedicina: Del concepto a sus aplicaciones clínicas y tendencias actuales en investigación. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 16(31).
<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.31.69795>
- Pallo Altamirano, T. C. (2022). Estudio del proceso de obtención de vainillina a partir de lignina mediante un proceso asistido con microondas: Efecto de la concentración de hidróxido de sodio (NaOH) sobre la obtención de vainillina a partir de lignina en un proceso asistido con microondas. [Escuela Politécnica Nacional].
<http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/23138>
- Pando Rodríguez, D. (2014). Formulación y preparación de niosomas conteniendo biocompuestos. Universidad de Oviedo.

- Parra Huertas, R. A. (2010). Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669-5684.
- Perry, S. L., & McClements, D. J. (2020). Recent Advances in Encapsulation, Protection, and Oral Delivery of Bioactive Proteins and Peptides using Colloidal Systems. *Molecules*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/molecules25051161>
- Piñón-Balderrama, C. I., Leyva-Porras, C., Terán-Figueroa, Y., Espinosa-Solís, V., Álvarez-Salas, C., & Saavedra-Leos, M. Z. (2020). Encapsulation of Active Ingredients in Food Industry by Spray-Drying and Nano Spray-Drying Technologies. *Processes*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/pr8080889>
- Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., & Askari, G. (2020). Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology*, 38(1-2), 235-258. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1653906>
- Ríos-Aguirre, S., & Gil-Garzón, M. A. (2021). Microencapsulación por secado por aspersión de compuestos bioactivos en diversas matrices: Una revisión. *Tecnológicas*, 24(51), 206-229. <https://doi.org/10.22430/22565337.1836>
- Román-Guerrero, A., & García Márquez, E. (2017). Emulsiones. En *Tecnologías de nano/microencapsulación de compuestos bioactivos* (pp. 46-76). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
- Sandoval Aldana, A., Rodríguez Sandoval, E., & Ayala Aponte, A. (2004). Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. *Ingeniería y competitividad*, 5(2). <https://doi.org/10.25100/iyc.v5i2.2298>
- Sarabandi, K., Rafiee, Z., Khodaei, D., & Jafari, S. M. (2019). Chapter Nine—Encapsulation of food ingredients by nanoliposomes. En S. M. Jafari (Ed.), *Lipid-Based Nanostructures for Food Encapsulation Purposes* (pp. 347-404). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815673-5.00009-X>

Valenzuela De León, E. (2020). Revisión de literatura en métodos de fabricación y caracterización de micro/nanopartículas para encapsulación de compuestos bioactivos usando quitosano como material encapsulante [Escuela Agrícola Panamericana].

<https://bdigital.zamorano.edu/items/e118119f-2968-4dd7-b7b8-adbb4b18b737>

Vasconcelos, N. G., Croda, J., & Simionatto, S. (2018). Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microbial Pathogenesis*, 120, 198-203.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.036>

Anexos

Anexo 1 Curva de calibración Vainillina

