



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Química

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de “Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos”

“PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE SISTEMAS MICELARES QUE ENCAPSULAN ACEITES ESENCIALES”

Autora: Lic. Delmonte Agustina.

Director: Dr. Pérez Adrian Alejandro.

Co-directora: Dra. Visentini Flavia Fátima.

Lugar de trabajo: Área de Biocoloides y Nanotecnología - Instituto de Tecnología de Alimentos - Facultad de Ingeniería Química - Universidad Nacional del Litoral

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Adrián Pérez, y a mi codirectora, Flavia Visentini, a quienes admiro profundamente y agradezco por haberme acompañado en este camino. Gracias por su dedicación y por brindarme su tiempo y conocimiento, siempre con calidez humana.

A mis compañeros del Área de Biocoloides y Nanotecnología, por su colaboración, compañerismo y apoyo. Gracias por compartir conmigo no solo conocimientos, sino también momentos inolvidables.

A mi familia y amigos, por ser mi pilar fundamental durante todos estos años, brindándome su amor y aliento en cada etapa de este proceso.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET), por el otorgamiento de la Beca Doctoral.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos y a la Facultad de Ingeniería Química, por proporcionarme el espacio y los recursos necesarios para el desarrollo experimental de esta investigación.

Al financiamiento de los siguientes proyectos, que hicieron posible esta tesis:

- PICT 2021-CAT-I-00188: “Desarrollo de alimentos plant-based y funcionales análogos de quesos”. Organismo financiador: Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT), Argentina. Investigador Responsable: Dr. Adrian Pérez.
- PICT-2017-1823: “Impacto de la matriz alimentaria y la nanoencapsulación sobre la bioaccesibilidad y actividad antidiabética de compuestos bioactivos”. Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (ANPCyT). Investigador Responsable: Dr. Adrian Pérez.

A todos los que, de una u otra manera, han sido parte de este camino, muchas gracias.

PUBLICACIONES

El presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

- Delmonte, A., Visentini, F.F., Fernández, J.L., Santiago, L.G. & Perez, A.A. (2024). Development, characterization, and evaluation of the antioxidant activity of nanocarriers based on surfactant swollen micelles that encapsulate essential oils. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 235.
- Delmonte, A., Visentini, F.F., Hick, E., Burns P., Santiago, L.G. & Perez, A.A. Physicochemical stability, antifungal activity, and gastrointestinal digestibility of essential oils encapsulated in surfactant swollen micelles. En condiciones de ser enviada para su revisión.

Presentación en reuniones científicas:

- Delmonte, A., Visentini, F.F. y Perez, A.A. Sistemas micelares que encapsulan aceites esenciales para el desarrollo de alimentos funcionales. Online Sessions: II Jornadas Internacionales de Desarrollo Agroalimentario - Ecuador (YACHAY TECH 2024). Modalidad: exposición oral.
- Delmonte, A., Visentini, F.F. y Perez, A.A. Evaluación de métodos para la obtención de sistemas micelares de Tween 80 que encapsulan aceites esenciales. Encuentro de Jóvenes Investigadores (EJI 2023). Modalidad: exposición oral.
- Delmonte, A., Visentini, F.F. y Perez, A.A. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad anti-*Cándida spp.* de sistemas micelares que encapsulan aceites esenciales. X Congreso de Alimentos, Siglo XXI: Alimentos, Nutrición y Salud (CASLAN 2023). Modalidad: poster.
- Delmonte, A., Visentini, F.F., Santiago, L.G. y Perez, A.A. Evaluación de métodos para la obtención de sistemas micelares que encapsulan aceites esenciales culinarios. VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICyTAC 2022). Modalidad: poster.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ACEITES ESENCIALES.	2
1.1.1. Propiedades biológicas	4
1.1.1.1. Actividad antifúngica.....	4
1.1.1.1.1. Aceites esenciales de orégano y tomillo como antifúngicos.....	5
1.1.1.1.2. Mecanismos de acción antifúngica	6
1.1.1.1.3. Evaluación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i>	8
1.1.1.2. Actividad antioxidante	9
1.1.1.2.1. Clasificación de los antioxidantes	10
1.1.1.2.2. Aceites esenciales de orégano y tomillo como antioxidantes	11
1.1.1.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	12
1.2. SISTEMAS MICELARES.....	14
1.2.1. Métodos de obtención.....	19
1.2.2. Componentes	19
1.2.2.1. Tensioactivos	19
1.2.2.2. Cosurfactantes.....	21
1.2.2.3. Fase oleosa	21
1.2.3. Sistemas micelares que encapsulan aceites esenciales	22
1.3. FUNDAMENTACIÓN DEL TRABAJO	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. OBJETIVO GENERAL	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1. MATERIALES	28
3.2. MÉTODOS	28
3.2.1. Ensayos preliminares	28
3.2.1.1. Análisis de la composición de los aceites esenciales.....	29
3.2.1.2. Determinación de la Concentración Micelar Crítica	29
3.2.2. Obtención de sistemas micelares que encapsulan aceites esenciales	29

3.2.2.1. Método de autoensamblaje	30
3.2.2.2. Método de titulación	30
3.2.3. Evaluación de las características fisicoquímicas, propiedades antioxidantes, antimicrobianas y de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de los SMs bioactivos	31
3.2.3.1. Capacidad y cinética de solubilización	32
3.2.3.2. Distribución de tamaño de partículas.....	32
3.2.3.3. Eficiencia de encapsulación.....	32
3.2.3.4. Microscopía de fuerza atómica	33
3.2.3.5. Microscopía electrónica de transmisión.....	34
3.2.3.6. Estabilidad fisicoquímica.....	34
3.2.3.7. Actividad antioxidante por el método ABTS.....	35
3.2.3.8. Actividad antioxidante por el método Poder Reductor.....	35
3.2.3.9. Actividad antifúngica.....	36
3.2.3.10. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	37
3.2.4. Análisis estadístico	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1. ENSAYOS PRELIMINARES.....	41
4.1.1. Análisis de la composición de los aceites esenciales.....	41
4.1.2. Determinación de la Concentración Micelar Crítica	42
4.2. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS, PROPIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIMICROBIANAS Y DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i> DE LOS SMs BIOACTIVOS ...	
.....	43
4.2.1. Capacidad y cinética de solubilización.....	43
4.2.2. Distribución de tamaño de partículas	47
4.2.3. Eficiencia de encapsulación.....	53
4.2.4. Microscopía de fuerza atómica.....	57
4.2.5. Microscopía electrónica de transmisión	59
4.2.6. Estabilidad fisicoquímica	59
4.2.7. Actividad antioxidante por los métodos ABTS y Poder Reductor	64
4.2.8. Actividad antifúngica	65
4.2.9. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	66

5. CONCLUSIONES.....	73
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición relativa de los principales componentes de AEO y AET	41
Tabla 2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el d_H (nm) de los SMS-1 cargados con AEO y AET a diferentes SOR..	49
Tabla 3. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el d_H (nm) de los sistemas SMS-2 cargados con diferentes concentraciones de AEO y AET (% p/p).	50
Tabla 4. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la eficiencia de encapsulación (%) de SMS-1 cargados con AEO y AET a diferentes SOR..	54
Tabla 5. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la eficiencia de encapsulación (%) de SMS-2 cargados con diferentes concentraciones de AEO y AET (% p/p).	55
Tabla 6. Valores de CIM y CFM de AEO y AET libres y encapsulados en SMS-2 para <i>Candida spp.</i>	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los compuestos carvacrol y timol.....	6
Figura 2. Interacción de p-cimeno, timol y carvacrol con esteroides de membrana	7
Figura 3. Mecanismos de reacción antioxidante basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y transferencia de un electrón (SET).....	13
Figura 4. Estructuras obtenidas según la concentración de tensioactivo y aceite.....	16
Figura 5. Micelas de tensioactivo con moléculas de aceite incorporadas en su interior	17
Figura 6. Diagrama esquemático de la energía libre de los SMs en comparación con el estado de separación de fases.....	18
Figura 7. Esquema de obtención de SMs-1.	30
Figura 8. Esquema de obtención de SMs-2.	31
Figura 9. Efecto de la concentración de Tween 80 (% p/p) sobre la tensión superficial (mN/m) en la interfase aire-agua de una solución acuosa de tensioactivo.....	43
Figura 10. Variación de la turbidez de la solución de Tween 80 (1% p/p) titulada con alícuotas de emulsión de AEO y AET con la concentración de AE.....	45
Figura 11. Apariencia visual de los SMs-1 cargados con AEO y AET a diferentes SOR (p/p) y SMs-2 con diferentes concentraciones de AEO y AET (% p/p) a 1, 7, 14 y 30 días de almacenamiento	46
Figura 12. Efecto de la concentración de AEO y AET sobre la cinética de solubilización de gotas de emulsión madre en soluciones de Tween 80 al 1% (p/p).....	47
Figura 13. Distribución de tamaño de partículas basada en la intensidad (PSDi, %) de SMs-1 cargados con AEO y AET a diferentes SOR y SMs-2 cargados con diferentes concentraciones de AEO y AET (% p/p) en el día 1, 7, 14 y 30 de almacenamiento	53
Figura 14. Imágenes topográficas de microscopía de fuerza atómica (AFM) de SMs vacíos, SMs-1 y SMs-2 cargados con AEO y AET.....	58
Figura 15. Micrografías TEM de SMs vacíos y SMs-2 cargados con AEO y AET	59
Figura 16. Estabilidad de los SMs-2 cargados con AEO y AET frente a la temperatura, fuerza iónica, pH, dilución acuosa y centrifugación.....	63

Figura 17. Distribución de tamaño de partículas basada en la intensidad (PSDi, %) de los SMs vacíos y SMs-2 cargados con AEO y AET, antes y después de la digestión secuencial gástrica e intestinal.....	68
Figura 18. Estabilidad (E*), bioaccesibilidad (B*) y bioaccesibilidad efectiva (BE) de los SMs-2 cargados con AEO y AET luego de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> ..	70
Figura 19. Actividad de captación del radical ABTS ⁺ (mg Trolox mL ⁻¹) y poder reductor (g EAA mL ⁻¹) del SIF, SMs vacíos y SMs-2 cargados con AEO y AET, luego de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .	72

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABS	Absorbancia
ABTS	Sal diamónica del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AEs	Aceites esenciales
AEO	Aceite esencial de orégano
AET	Aceite esencial de tomillo
AFM	Microscopía de fuerza atómica
B*	Bioaccesibilidad
BDE	Entalpía de disociación de enlace
BE	Bioaccesibilidad efectiva
CFM	Concentración fungicida mínima
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CMC	Concentración micelar crítica
CR	Contenido relativo
C _{sat}	Capacidad máxima de solubilización
d _H	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión de luz dinámica
E*	Estabilidad
EAA	Equivalentes a ácido ascórbico
EE	Eficiencia de encapsulación
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
IP	Potencial de ionización
PSD	Distribución de tamaño de partículas
PSDi	Distribución de tamaño de partículas en función de la intensidad
PSDv	Distribución de tamaño de partículas en función del volumen
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SB	Sales biliares
SBD	Caldo dextrosa Sabouraud
SET	Transferencia de un electrón
SGF	Fluido gástrico simulado

SIF	Fluido intestinal simulado
SMs	Sistemas micelares
SMs-1	Sistemas micelares obtenidos por el método de autoensamblaje
SMs-2	Sistemas micelares obtenidos por el método de titulación
SOR	Relaciones Tween 80/aceite esencial
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

RESUMEN

En los últimos años, la investigación en ciencia y tecnología de los alimentos ha cobrado gran relevancia, especialmente en el desarrollo de alimentos funcionales sensorialmente atractivos. En este contexto, los aceites esenciales (AEs) se destacan por sus múltiples propiedades biológicas, como actividad antioxidante, antimicrobiana, entre otras. Si bien su incorporación en matrices alimenticias es viable debido a su reconocimiento como sustancias seguras (GRAS), su aplicación directa presenta desafíos debido a su elevada hidrofobicidad, volatilidad y susceptibilidad al deterioro oxidativo y fotoquímico. Para superar estas limitaciones, se han estudiado diferentes sistemas de encapsulación, destacándose los sistemas micelares (SMs) como una opción prometedora, ya que son estructuras coloidales termodinámicamente estables, de tamaño nanométrico, que pueden incorporarse en alimentos sin alterar sus propiedades fisicoquímicas.

El objetivo de la presente tesis fue desarrollar una tecnología de encapsulación de AEs derivados de especias culinarias, específicamente de *Origanum vulgare* (AEO) y *Thymus vulgaris* (AET), basada en SMs. Se compararon dos métodos de obtención de SMs. El primero (SMs-1), implicó un proceso de autoensamblaje, mientras que el segundo (SMs-2), una operación de titulación de una emulsión en una solución de tensioactivo. Se utilizaron Tween 80 y etanol como tensioactivo y cosurfactante, respectivamente. Se determinó la cinética de solubilización y la concentración de saturación (C_{sat}) de los AEs, junto con el tamaño de partícula (medido por dispersión de luz dinámica - DLS), eficiencia de encapsulación (EE) y estabilidad durante 30 días como parámetros de control. Además, se analizó la morfología de los SMs mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Por último, se evaluó la estabilidad fisicoquímica, la actividad antioxidante, antimicrobiana y la digestión gastrointestinal *in vitro* de los SMs-2. La actividad antioxidante se evaluó por los métodos ABTS y poder reductor, y la actividad antimicrobiana frente a *Candida spp.* mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM).

Los resultados mostraron que la solubilización de los AEs en los SMs fue rápida (inferior a 50 s), con valores de C_{sat} de 0,17 y 0,21 % (p/p) para SMs-2 con AEO y AET, respectivamente. Los SMs-2 exhibieron mayor estabilidad coloidal, mayor EE y tamaños de partículas más

pequeños y homogéneos en comparación con los SMs-1. Además, mantuvieron o aumentaron su EE durante el almacenamiento. Las micrografías AFM y TEM confirmaron la morfología redondeada y heterogénea de los SMs-1 y la morfología más pequeña, homogénea y esférica de los SMs-2. Los SMs-2 fueron estables frente a la temperatura, fuerza iónica, pH, centrifugación y dilución acuosa. Además, mostraron una elevada actividad de captación del radical ABTS⁺ y poder reductor. Los SMs-2 inhibieron todas las cepas de *Candida* evaluadas, con menores valores de CIM y CFM para los SMs-2 con AEO. Posteriormente, al aplicar una digestión gastrointestinal simulada, los SMs-2 protegieron en menor medida al AET de las condiciones gastrointestinales, sin embargo, permitieron la solubilización del AEO y AET posiblemente formando micelas mixtas con los componentes del fluido intestinal simulado como las sales biliares. Además, pudo observarse que los AEs encapsulados en SMs-2 mostraron una actividad antioxidante considerable luego de la digestión gastrointestinal. Como conclusión, el método SMs-2 resultó eficaz para producir nanotransportadores de AEs, con potencial para ser utilizados como nanoingredientes en alimentos funcionales con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ACEITES ESENCIALES.

Los aceites esenciales (AEs) son sustancias naturales producidas por las plantas como una compleja mezcla de metabolitos secundarios bioactivos tales como fenoles, monoterpenos y sesquiterpenos. Se han identificado aproximadamente 3.000 AEs extraídos de diversas partes de las plantas como flores, hojas, semillas, corteza, raíces, etc., cuya composición varía incluso en aquellos extraídos de la misma especie vegetal, debido a diferencias en las épocas de recolección, métodos de extracción y condiciones ambientales (Coimbra y col., 2022).

Otro aspecto relevante de los AEs es que son reconocidos como seguros (GRAS) por la FDA (*Food and Drug Administration*), por lo tanto, su incorporación en matrices alimenticias no conllevaría riesgos significativos en la salud de los consumidores (Yamine y col., 2022). No obstante, su aplicación presenta diversas limitaciones debido a su naturaleza lipofílica, elevada volatilidad y susceptibilidad al deterioro oxidativo y fotoquímico.

Desde el punto de vista estructural, los componentes químicos de los AEs se pueden clasificar en cuatro grupos principales: terpenos, terpenoides, fenilpropanoides y otros compuestos (Masyita y col., 2022).

➤ Terpenos

Los terpenos o isoprenoides presentan estructuras moleculares formadas por unidades de isopreno que pueden reorganizarse en estructuras cíclicas. La diversidad estructural de los terpenos está determinada por el número de unidades de isopreno. Los hemiterpenos están formados por una unidad de isopreno (C5), los monoterpenos por dos unidades (C10) y los sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40), por tres, cuatro, seis y ocho unidades de isopreno, respectivamente. Algunos ejemplos comunes de terpenos presentes en los AEs son el mirceno, o-cimeno y α -pineno.

➤ Terpenoides

Los terpenoides son terpenos que contienen moléculas de oxígeno, que se forman mediante modificaciones bioquímicas como la eliminación o adición de grupos metilo. Por lo tanto, pueden

ser alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, epóxidos, cetonas y fenoles. Estos compuestos bioactivos confieren a los AEs una amplia gama de actividades biológicas, tales como propiedades anticancerígenas, antialérgicas, antimicrobianas y antioxidantes. Algunos ejemplos de terpenoides incluyen el carvacrol, timol y acetato de linalilo.

➤ Fenilpropanoides

Los fenilpropanoides se sintetizan por la vía del ácido shikímico y su estructura básica deriva del grupo fenol aromático de seis carbonos, unido a la cola de propeno de tres carbonos del ácido cinámico. Esta estructura presenta frecuentemente un doble enlace carbono-carbono y una oxigenación en la tercera, cuarta o quinta posición. Algunos ejemplos de fenilpropanoides incluyen el cinamaldehído, eugenol e isoeugenol.

➤ Otros componentes

Los AEs contienen derivados de aminoácidos como alanina, isoleucina, leucina, valina y metionina. Además, se pueden encontrar componentes como policétidos, lípidos y derivados de azufre.

Entre el 90% y 95% de los componentes de los AEs son sustancias volátiles, como los terpenos y terpenoides, que pueden perderse durante el procesamiento de los alimentos. Además, estos compuestos son altamente sensibles a factores externos como el oxígeno, calor, luz e irradiación, lo que puede afectar su bioactividad. Por otro lado, muchos de los compuestos bioactivos presentes en los AEs, como alcoholes orgánicos, ácidos grasos, éteres y cetonas, les confieren una marcada hidrofobicidad, dificultando su incorporación y distribución homogénea en alimentos de naturaleza acuosa (Deseta, 2022). Sortear estas limitaciones representa un desafío para la aplicación de los AEs en la industria alimenticia y ha impulsado el desarrollo de estrategias de encapsulación que permiten mejorar su estabilidad.

1.1.1. Propiedades biológicas

Las propiedades biológicas de los AEs se atribuyen a la combinación de compuestos bioactivos que los constituyen (terpenos, terpenoides y fenilpropanoides). Entre ellas, destacan su actividad antifúngica y antioxidante, las cuales se detallarán a continuación.

1.1.1.1. Actividad antifúngica

Los hongos representan una causa creciente de infecciones humanas agudas o crónicas profundas, especialmente de infecciones recurrentes de mucosas, piel y uñas. Estas pueden volverse graves en individuos debilitados o inmunodeprimidos (Reyes-Jurado y col., 2015). Dentro de este grupo, *Cándida spp.* es el principal agente causante de micosis a nivel mundial. Se han identificado alrededor de 200 especies de este género, siendo *C. albicans* la más prevalente. Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado un aumento significativo en la incidencia de otras especies, como *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (Jahagirdar y col., 2018).

Estas levaduras suelen encontrarse como microorganismos comensales inofensivos en la cavidad oral, piel y tractos gastrointestinal y urogenital de la mayoría de las personas. No obstante, en determinadas circunstancias pueden volverse oportunistas y proliferar en exceso (Dadar y col., 2018). Un ejemplo de esto es la colonización intestinal por *Candida spp.*, favorecida por desequilibrios en la microbiota intestinal debido al uso frecuente de antibióticos y dietas ricas en carbohidratos, como la dieta occidental (Kumamoto y col., 2020). Este crecimiento excesivo puede manifestarse con síntomas como distensión y dolor abdominal, flatulencias, náuseas, dispepsia, fatiga, diarrea y estreñimiento (Bhagatwala y Rao, 2019; Lacour y col., 2002).

Si bien el tratamiento farmacológico con polienos, pirimidinas, azoles y equinocandinas suele ser eficaz para erradicar *Candida spp.*, es importante considerar que estas levaduras forman parte de la microbiota de la mayoría de los seres humanos. Por ello, prevenir su crecimiento descontrolado y colonización resulta tan relevante como su tratamiento convencional (Jahagirdar y col., 2018; Martins y col., 2014). Esto ha impulsado la investigación en el desarrollo de alimentos funcionales capaces de controlar y prevenir la proliferación excesiva de *Candida spp.* a nivel intestinal.

1.1.1.1.1. Aceites esenciales de orégano y tomillo como antifúngicos

Numerosos reportes han demostrado la actividad antifúngica del aceite esencial de orégano (AEO) y aceite esencial de tomillo (AET). [Marlete y col. \(2013\)](#) evidenciaron la capacidad inhibitoria del AEO frente a *C. albicans*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. De manera similar, [Nikolić y col. \(2014\)](#) evaluaron la actividad antimicrobiana del AET, encontrando una notable actividad antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata*. Además, diversos estudios sugieren que tanto el AEO como el AET podrían constituir una alternativa a los tratamientos antifúngicos convencionales, especialmente frente a cepas de *Cándida* resistentes al fluconazol ([Alshaikh y Perveen, 2021](#); [Pozzatti y col., 2008](#); [Soares y col., 2015](#)).

La actividad antifúngica del AEO y AET es altamente variable, ya que factores como la altitud y tipo de suelo, clima, momento de cosecha, métodos de extracción, condiciones de almacenamiento, entre otros, influyen en la composición, calidad y cantidad de los compuestos bioactivos presentes en los AEs ([Marlete y col., 2013](#)).

Se ha asociado la actividad antifúngica del AEO y AET a la estructura química de sus componentes mayoritarios, carvacrol y timol ([Figura 1](#)). Se sugiere que el anillo aromático y el grupo hidroxilo (-OH) permiten la formación de enlaces de hidrógeno con los sitios activos de las enzimas microbianas. Sin embargo, se ha demostrado que estos compuestos no son los únicos responsables de la actividad antifúngica de los AEs ([Marlete y col., 2013](#); [Pradebon Brondani y col., 2018](#)).

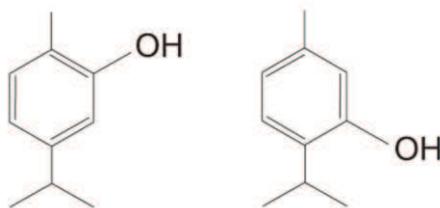


Figura 1. Estructura química de los compuestos carvacrol (izquierda) y timol (derecha) (Deseta, 2022).

Componentes minoritarios, como p-cimeno, γ -terpineno, α -terpineol, 1,8-cineol y linalol, también influyen en la actividad antifúngica de los AEs. Se ha comprobado que γ -terpineno, α -terpineol, 1,8-cineol y linalol poseen actividad antimicrobiana. Por el contrario, la presencia de p-cimeno ejerce un efecto antagonista sobre el carvacrol y el timol, reduciendo su efectividad. Por lo tanto, la actividad antifúngica de los AEs no solo depende de su composición, sino también de la interacción entre sus componentes (Marlete y col., 2013).

1.1.1.1.2. Mecanismos de acción antifúngica

Debido a la gran variedad de compuestos químicos presentes en los AEs, su actividad antimicrobiana no parece estar determinada por un único mecanismo de acción, sino por la interacción de múltiples componentes con distintas estructuras celulares (Reyes-Jurado y col., 2019).

Los AEs pueden ejercer su acción antifúngica a nivel de la pared, membrana e interior celular (Nazzaro y col., 2017).

➤ Mecanismos de acción antifúngica a nivel de la pared y membrana celular

La pared celular fúngica desempeña un papel importante en el crecimiento y viabilidad de los hongos, y está constituida principalmente por glucano, quitina y manano. Numerosos estudios han demostrado que algunos AEs (e.g. AEs de anís, naranjo y comino) ejercen su actividad antifúngica inhibiendo la polimerización de la quitina, lo que afecta la maduración de la pared

celular e interfiere con la división y crecimiento celular. Este mecanismo ha sido observado para hongos de los géneros *Mucor* y *Aspergillus* (Işcan y col., 2016; Sharma y Tripathi, 2008; Yutani y col., 2011).

Por otro lado, los AEs también pueden actuar sobre la membrana celular, alterando su permeabilidad y fluidez. El p-cimeno, carvacrol y timol, presentes en el AEO y AET, afectan la biosíntesis de ergosterol, un lípido esencial de la membrana celular de los hongos, similar al colesterol en células animales (Figura 2). La reducción o ausencia de ergosterol provoca inestabilidad osmótica y metabólica, comprometiendo la reproducción y viabilidad de la célula fúngica (Fani y Kohanteb, 2017). Este mecanismo ha sido observado en *Candida spp.* (Lima y col., 2013; Nazzaro y col., 2017).

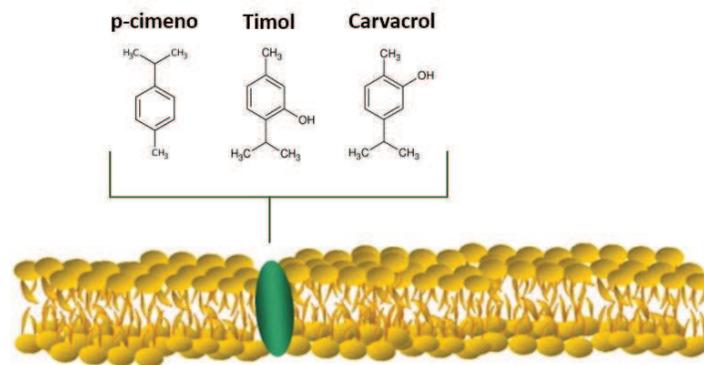


Figura 2. Interacción de p-cimeno, timol y carvacrol con esteroides de membrana (Lima y col., 2013).

➤ Mecanismos de acción antifúngica en el interior celular

Algunos AEs afectan la función mitocondrial al inhibir la acción de las deshidrogenasas involucradas en la biosíntesis de ATP, como la lactato, malato y succinato deshidrogenasa (Nazzaro y col., 2017). La disfunción mitocondrial induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y un aumento excesivo de ROS, conduce a la inactivación enzimática, disfunción

celular y, finalmente, muerte celular. Este mecanismo se observó para el AE de eneldo frente a *C. albicans* (Y. Chen y col., 2013; Haque y col., 2016).

Otro mecanismo antifúngico fue identificado para timol y eugenol (compuestos bioactivos presentes en AEO, AET, AE de canela, entre otros.) frente a *Candida spp.* Estos compuestos fueron capaces de inhibir la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática fúngica. Esta enzima es fundamental para mantener el gradiente electroquímico de protones, por lo tanto, influye en la absorción de nutrientes, regulación del pH intracelular y crecimiento celular. Su inhibición provoca acidificación, seguida de la muerte celular (Nazzaro y col., 2017).

Un estudio realizado por Ahmad y col. (2013) identificó otro mecanismo de acción del timol y el carvacrol, relacionado con la inhibición de la sobreexpresión de los genes de las bombas de eflujo *CDRI* y *MDRI* en cepas de *Candida* resistentes al fluconazol. Se ha demostrado un efecto antimicótico sinérgico entre carvacrol, timol y fluconazol, donde los terpenoides inhibieron el eflujo de fármacos en un 70-90%. Esto evidencia su potencial para bloquear las bombas transportadoras de medicamentos y mejorar la eficacia del tratamiento antifúngico.

1.1.1.1.3. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*

Existen numerosos métodos para la evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*. Los más utilizados son los métodos de difusión en agar (disco de papel o pocillo) y los de dilución (agar y caldo). Estos últimos permiten determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), definida como la menor concentración de compuesto capaz de inhibir el desarrollo microbiano (Freitas y Cattelan, 2018).

➤ Dilución en agar

Esta técnica consiste en preparar diferentes diluciones del compuesto a evaluar, las cuales se mezclan con el medio de cultivo sólido y se distribuyen en placas de Petri. Posteriormente, se inoculan los microorganismos de ensayo y se incuban bajo condiciones óptimas de temperatura y tiempo. Las principales ventajas de este método son la posibilidad de evaluar múltiples microorganismos simultáneamente, la fácil detección de contaminación y la compatibilidad con medios de cultivo que contengan materiales opacos (Reyes-Jurado y col., 2015).

➤ Dilución en caldo o microdilución

Los métodos de dilución en caldo o microdilución se llevan a cabo en tubos o microplacas que contienen un medio de cultivo líquido (caldo) con concentraciones crecientes del compuesto en estudio. A cada tubo o pocillo se le añade un número definido de células microbianas viables. Tras la incubación, se evalúa el crecimiento microbiano mediante la presencia de turbidez o sedimentación (Reyes-Jurado y col., 2015). La principal desventaja del método de dilución en caldo es la gran cantidad de material, espacio físico y medio de cultivo requerido. Por esta razón, se ha desarrollado el método de microdilución, una versión a escala reducida de la dilución en caldo (Schumacher y col., 2018).

1.1.1.2. Actividad antioxidante

Los antioxidantes son sustancias que, en bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, tienen la capacidad de retardar o prevenir el daño causado por la oxidación, el enranciamiento y la formación de sabores desagradables en los alimentos. Además, han despertado gran interés en el ámbito de la salud debido a su capacidad para proteger al organismo del daño inducido por especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y cloro (Freitas y Cattelan, 2018).

La oxidación es una reacción química que implica la transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Los radicales libres generados en estas reacciones inician una serie de reacciones en cadena que provocan daño celular. Los antioxidantes interrumpen estas reacciones eliminando los radicales libres intermedios y oxidándose ellos mismos, por lo que suelen ser agentes reductores, como los tioles o polifenoles (Dontha, 2016).

El estrés oxidativo en los sistemas biológicos es un proceso complejo caracterizado por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del organismo para eliminarlos mediante antioxidantes endógenos y exógenos. Durante los procesos metabólicos, se generan ROS, como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, que pueden inducir daño celular. Un exceso de ROS en el organismo se asocia con diversas patologías, incluyendo enfermedades cardiovasculares y cáncer. Para controlar estos efectos, los sistemas biológicos cuentan con mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos capaces de inactivar las ROS.

Los antioxidantes endógenos incluyen enzimas, como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, o compuestos no enzimáticos, como la bilirrubina y la albúmina. Cuando un organismo está expuesto a una concentración elevada de ROS, el sistema antioxidante endógeno puede verse comprometido. Por lo tanto, para compensar este déficit, el organismo puede utilizar antioxidantes exógenos suministrados a través de alimentos, suplementos nutricionales o productos farmacéuticos (Shalaby, 2019).

1.1.1.2.1. Clasificación de los antioxidantes

En términos generales, los antioxidantes se clasifican en dos grupos (Dontha, 2016):

- Antioxidantes enzimáticos: son aquellos que actúan descomponiendo y eliminando los radicales libres. Estas enzimas convierten los radicales en peróxido de hidrógeno y posteriormente en agua, en un proceso de varios pasos que requiere una serie de cofactores de oligoelementos metálicos como cobre, zinc, manganeso y hierro. Estos antioxidantes no pueden administrarse por vía oral, sino que deben ser sintetizados por el organismo. Ejemplos incluyen la superóxido dismutasa, catalasa, selenoproteínas y glutatión reductasa y peroxidasa.
- Antioxidantes no enzimáticos: son aquellos que interrumpen las reacciones en cadena de los radicales libres. Por ejemplo, la vitamina E detiene la propagación de los radicales tras solo cinco reacciones. Otros ejemplos son la vitamina C, los polifenoles vegetales, carotenoides y glutatión.

Según su solubilidad, los antioxidantes se clasifican en (Dontha, 2016):

- Antioxidantes hidrofílicos: son solubles en medio acuoso como la vitamina C, polifenoles y glutatión. Se encuentran en los fluidos corporales acuosos, como la sangre, y en el citosol o matriz citoplasmática.
- Antioxidantes hidrofóbicos: son insolubles en medio acuoso y se localizan principalmente en las membranas celulares. Ejemplos incluyen las vitaminas E y A, los carotenoides y el ácido lipoico.

Dado que los radicales libres pueden generarse tanto en el citosol como en las membranas celulares, la célula requiere de antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos para garantizar una protección efectiva.

Por último, según su origen, los antioxidantes se clasifican en (Dontha, 2016):

- Antioxidantes sintéticos: la mayoría son compuestos de tipo fenólico. Los antioxidantes sintéticos más utilizados incluyen el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y tertbutilhidroquinona (TBHQ). Sin embargo, estos compuestos son cada vez más cuestionados ya que estudios recientes han demostrado efectos citotóxicos, genotóxicos y potencialmente cancerígenos (Al-Abdaly y col., 2021; Esazadeh y col., 2024).
- Antioxidantes naturales: son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, responsables de la actividad antioxidante de diversos alimentos. Algunos ejemplos incluyen el ácido ascórbico, α -tocoferol, ácidos fenólicos (como el ácido benzoico, ácido trans-cinámico y ácido hidroxicinámico), cumarinas, lignanos, estilbenos, flavonoides, isoflavonoides, polímeros fenólicos y terpenoides.

1.1.1.2.2. Aceites esenciales de orégano y tomillo como antioxidantes

Numerosos estudios han demostrado la actividad antioxidante del AEO y AET, lo que sugiere su potencial aplicación como ingredientes funcionales en alimentos y productos farmacéuticos, con el fin de promover la salud y prevenir enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo (Boskovic y col., 2019; Labiad y col., 2022; Sarikurkcu y col., 2015). El efecto antioxidante de estos AEs se atribuye principalmente a sus compuestos mayoritarios, carvacrol y timol, cuyos mecanismos de acción incluyen la captación de radicales libres, quelación de metales de transición que actúan como catalizadores en algunas reacciones de oxidación, e inactivación del oxígeno singlete. Ambos compuestos pueden donar átomos de hidrógeno a los radicales libres, convirtiéndolos en productos no radicales más estables (Freitas y Cattelan, 2018).

Además de los compuestos fenólicos, otros terpenoides presentes en menor proporción en los AEs también han mostrado actividad antioxidante. En particular, el γ -terpineno y linalool, presentes en el AEO y AET, actúan como antioxidantes mediante un mecanismo de co-oxidación que induce la terminación de la cadena oxidativa. Sin embargo, su eficacia es inferior a la de los

terpenoides fenólicos, por lo que se requieren concentraciones más elevadas para ejercer su acción. Asimismo, la relación entre la concentración de estos compuestos y su actividad antioxidante no es lineal, lo que limita su efecto a un pequeño rango de concentraciones. A pesar de estas limitaciones, su presencia podría contribuir al efecto antioxidante global de los AEs, complementando la acción de los compuestos fenólicos (Baschieri y col., 2017).

Por lo tanto, la combinación de compuestos antioxidantes presentes en el AEO y el AET los convierte en sustancias prometedoras para el desarrollo de alimentos funcionales con potencial para reducir el estrés oxidativo en el organismo y contribuir al mantenimiento del equilibrio redox en los sistemas biológicos (Freitas y Cattelan, 2018).

1.1.1.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

En función de la reacción química que se produce entre los compuestos antioxidantes y los radicales libres, los ensayos de capacidad antioxidante se clasifican en: ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en la transferencia de un electrón (SET) (Figura 3).

En el mecanismo HAT, el radical libre extrae un átomo de hidrógeno del antioxidante, lo que genera un nuevo radical a partir del propio antioxidante. La facilidad con la que ocurre esta reacción depende de la entalpía de disociación de enlace (BDE), un parámetro clave para evaluar la capacidad antioxidante. Cuanto menor sea la BDE del grupo donador de hidrógeno en el antioxidante, más fácilmente se transferirá el hidrógeno y, por lo tanto, más eficiente será la neutralización del radical libre. El método ABTS es un ejemplo de ensayo basado en HAT.

Por otro lado, el mecanismo SET, consiste en la transferencia de un solo electrón desde el antioxidante (que actúa como nucleófilo) hacia el radical libre, dando lugar a un radical intermedio, que puede participar en diversas reacciones secundarias. En este proceso, el antioxidante pierde un electrón y se convierte en un catión radical. El parámetro más relevante en este mecanismo es el potencial de ionización (PI) del antioxidante: a menor PI, más fácil resulta la donación de electrones y, en consecuencia, mayor es su capacidad antioxidante. Un ejemplo de ensayo basado en SET es el método de poder reductor (Liang y Kitts, 2014).

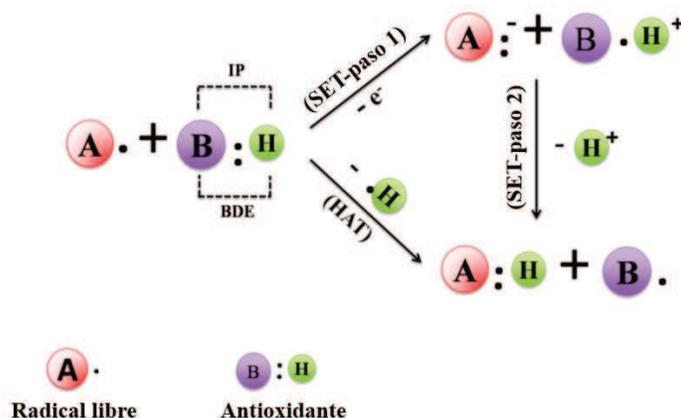


Figura 3. Mecanismos de reacción antioxidante basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y transferencia de un electrón (SET). IP: potencial de ionización. BDE: entalpía de disociación de enlace (Liang y Kitts, 2014).

Distinguir entre las reacciones HAT y SET suele ser complejo, ya que en la mayoría de los casos ocurren de manera simultánea. Por ello, para dilucidar la actividad antioxidante de un compuesto, es fundamental realizar ensayos que consideren tanto mecanismos basados en HAT como en SET (Aebisher y col., 2021).

➤ Método ABTS

El ensayo ABTS utiliza un radical libre, generado por la oxidación de la sal diamónica del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) con persulfato de potasio. El radical ABTS⁺ presenta un color azul-verde con una absorbancia (ABS) máxima a 734 nm y se decolora cuando es reducido por un compuesto antioxidante. Esta decoloración indica el grado de eliminación de radicales libres, expresado como porcentaje de inhibición.

Además, la actividad antioxidante puede compararse con la del Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), un análogo hidrosoluble de la vitamina E. De este modo, los resultados se expresan en términos de capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

El método ABTS tiene la ventaja de ser efectivo a diferentes pH y aplicable tanto a compuestos hidrofílicos como lipofílicos. No obstante, su principal limitación es la posible interferencia de sustancias antioxidantes coloreadas (Liang y Kitts, 2014).

➤ Método Poder Reductor

Este método se basa en la reducción del ion férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}), en presencia de antioxidantes. Las sustancias con potencial reductor (antioxidantes) reaccionan con el ferricianuro potásico (Fe^{3+}), generando ferrocianuro potásico (Fe^{2+}), el cual, a su vez, forma un complejo de color azul intenso con cloruro férrico. La cantidad de complejo formado es directamente proporcional al poder reductor de la muestra de ensayo (Dontha, 2016).

Además, la actividad antioxidante puede compararse con la del ácido ascórbico. De este modo, los resultados pueden expresarse como mg equivalentes a ácido ascórbico (EAA) mL^{-1} (Finos y col., 2024; Xiao y col., 2020).

El método poder reductor presenta la ventaja de ser eficaz para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos (Berker y col., 2012). No obstante, una de sus principales limitaciones es que el resultado depende del tiempo de reacción; por lo tanto, la reacción puede no haberse completado al momento de su detención (Amorati y Valgimigli, 2015).

1.2. SISTEMAS MICELARES.

Como se mencionó en la sección 1.1., la aplicación directa de los AEs derivados de especias culinarias en un producto alimenticio presenta diversas limitaciones asociadas a su naturaleza lipofílica, elevada volatilidad y susceptibilidad al deterioro oxidativo y fotoquímico. En este sentido, la encapsulación de los AEs en nano o microestructuras constituye una estrategia eficaz para mejorar su solubilidad acuosa, retención en la matriz alimenticia y protección frente a factores injuriantes.

Entre los distintos sistemas de encapsulación diseñados para la solubilización, transporte y protección de compuestos bioactivos, se destacan los sistemas micelares (SMs) como una

alternativa prometedora. Los SMs se definen como sistemas formados por agua, aceite y, por lo menos un compuesto tensioactivo, que, bajo condiciones y concentraciones óptimas, producen una solución líquida simple, ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (McClements, 2012).

La concentración de tensioactivo y aceite constituye un parámetro fundamental en la formación de SMs, ya que influye directamente en la organización estructural del sistema. Como se observa en la [Figura 4](#), en función de dichas concentraciones, es posible obtener diversas configuraciones, tales como micelas esféricas (A), micelas inversas (B), bicapas (C), estructuras hexagonales (D), hexagonales inversas (E), cúbicas micelares (F), cúbicas inversas (G) y bicontinuas (H) ([Figura 4, Callender y col., 2017](#)).

A elevadas fracciones acuosas, se favorece la formación de micelas esféricas, estructuras hexagonales y cúbicas micelares. En condiciones de fracciones acuosas intermedias, pueden desarrollarse bicapas o estructuras bicontinuas, según el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) del sistema. Por otro lado, a bajas fracciones acuosas, se promueve la formación de micelas, estructuras hexagonales y cúbicas inversas ([Callender y col., 2017](#)).

Si bien el presente trabajo se centra específicamente en estructuras micelares, la mención de las demás estructuras permite comprender la diversidad morfológica potencial de estos sistemas coloidales, y resalta la importancia de controlar la relación tensioactivo/aceite y la concentración de dichos componentes para dirigir la formación estructural deseada.

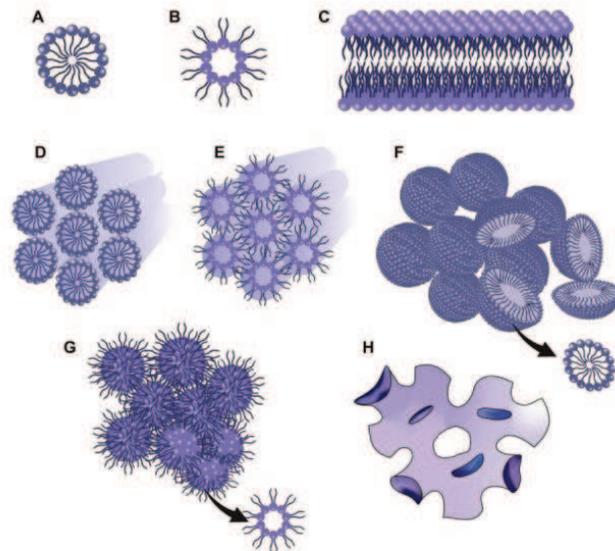


Figura 4. Estructuras obtenidas según la concentración de tensioactivo y aceite. A) Micela B) Micela inversa C) Bicapas D) Estructura hexagonal E) Estructura hexagonal inversa F) Estructura cúbica micelar G) Estructura cúbica micelar inversa H) Estructura bicontinua (Silva y Pórfido, 2023).

Las micelas son partículas de tamaño pequeño y morfología esférica donde las moléculas de tensioactivo se organizan de manera que sus colas apolares se asocian entre sí formando un núcleo hidrofóbico. Esta disposición minimiza el área de contacto termodinámicamente desfavorable entre los grupos apolares y el agua. Por otro lado, los grupos de cabeza polares de los tensioactivos se orientan hacia la fase acuosa circundante.

Las moléculas de aceite pueden incorporarse en el interior hidrofóbico de la micela, ya sea formando un núcleo separado o ubicándose entre las colas de los tensioactivos (Figura 5). En caso de que las moléculas de aceite presenten grupos polares, estas pueden integrarse en la micela de manera que dichos grupos interactúen con las cabezas polares de los tensioactivos o se extiendan parcialmente en la fase acuosa (McClements, 2012).

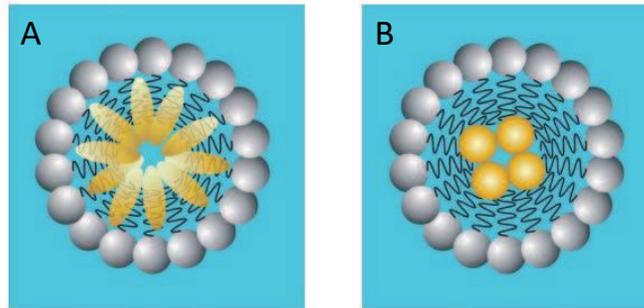


Figura 5. Micelas de tensioactivo con moléculas de aceite incorporadas en su interior. Las moléculas de aceite pueden ubicarse A) entre las colas apolares de los tensioactivos y/o B) en el núcleo de la micela (McClements, 2012).

Los SMs presentan como ventajas su pequeño tamaño de partícula (10-100 nm), su obtención mediante métodos sencillos y su capacidad para solubilizar y encapsular sustancias hidrofóbicas. Estas características influyen directamente en su capacidad para mejorar la biodisponibilidad y estabilidad de los compuestos bioactivos, así como en su aplicabilidad en diversas industrias, como la alimenticia, farmacéutica y cosmética.

Dado que los SMs son sistemas de naturaleza líquida, pueden atravesar el sistema digestivo en un lapso de 20 a 30 min, mientras que los sistemas de encapsulación sólidos pueden tardar hasta 3 horas. En consecuencia, los compuestos bioactivos en solución están expuestos durante menos tiempo a degradaciones enzimáticas, lo que favorece una mayor estabilidad en el tracto gastrointestinal (Callender et al., 2017).

El tamaño de partícula de los SMs oscila entre 10 y 100 nm de diámetro, lo que influye en sus propiedades ópticas, estabilidad gravitacional y bioaccesibilidad. A medida que el radio de las partículas disminuye por debajo de los 30 nm, las dispersiones coloidales tienden a volverse translúcidas o transparentes. Asimismo, su estabilidad frente a la separación gravitacional (cremado o sedimentación) aumenta significativamente cuando el radio de las partículas es inferior a 90 nm, ya que el movimiento browniano prevalece sobre las fuerzas gravitacionales. Además, el pequeño tamaño de partícula incrementa la relación superficie/volumen disponible para la absorción de los compuestos bioactivos, lo que mejora su bioaccesibilidad.

Los SMs pueden formarse espontáneamente mediante la combinación de aceite, agua y un tensioactivo, sin necesidad de aplicar energía externa, ya que son sistemas termodinámicamente estables. Sin embargo, en la práctica, a menudo se requiere de agitación o calentamiento, para superar barreras de energía cinética o limitaciones en el transporte de masa que podrían retrasar su formación (Figura 6). No obstante, la cantidad de energía requerida es significativamente menor en comparación con la empleada en la producción de emulsiones o nanoemulsiones, lo que convierte a este sistema de encapsulación en una alternativa eficiente y económicamente viable (Callender y col., 2017; McClements, 2012).

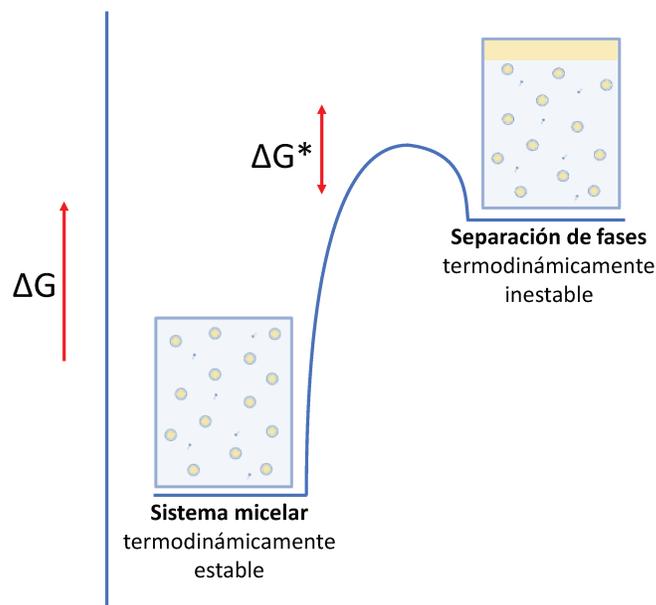


Figura 6. Diagrama esquemático de la energía libre de los sistemas micelares en comparación con el estado de separación de fases. Los sistemas micelares tienen una energía libre (ΔG) menor que el estado de separación de fases. Los dos estados están separados por una energía de activación ΔG^* (McClements, 2012).

1.2.1. Métodos de obtención

Los métodos de obtención de SMs pueden clasificarse, a grandes rasgos, en métodos de alta y baja energía. Los primeros emplean dispositivos mecánicos, llamados homogeneizadores, que generan fuerzas intensas para mezclar las fases de aceite y agua, favoreciendo la formación de partículas de pequeño tamaño. Entre estos dispositivos se incluyen los homogeneizadores de válvula de alta presión, microfluidizadores y equipos de sonicación.

Por otro lado, los métodos de baja energía se basan en la formación espontánea de partículas pequeñas en sistemas mixtos de tensioactivos, aceite y agua, cuando se modifican las condiciones de la solución o del entorno. Ejemplos de estos incluyen el método de inversión de fase y la emulsificación espontánea.

En el método de emulsificación espontánea, se genera una dispersión coloidal ópticamente transparente cuando una mezcla de tensioactivo y aceite se incorpora a una solución acuosa bajo agitación suave. De manera similar, en el método de inversión de fase inducida por temperatura, la dispersión coloidal se forma al calentar una mezcla de tensioactivo, aceite y agua hasta alcanzar la temperatura de inversión de fase, seguido de un enfriamiento controlado con agitación continua (McClements, 2012).

1.2.2. Componentes

Los SMs están constituidos por un tensioactivo, que puede estar acompañado o no de un cosurfactante, una fase oleosa y una fase acuosa

1.2.2.1. Tensioactivos

Los tensioactivos, también conocidos como emulsionantes, compuestos anfifílicos o surfactantes, desempeñan un papel fundamental en la formación de los SMs al reducir la tensión interfacial. Esta reducción, sumada a las contribuciones entálpicas derivadas de la disminución de las interacciones entre las colas hidrofóbicas del tensioactivo y el disolvente polar, disminuye la energía libre global del sistema, facilitando así la formación de los SMs.

En estado diluido, los tensioactivos existen como monómeros. Sin embargo, cuando se alcanza una concentración mínima, denominada concentración micelar crítica (CMC), las moléculas de tensioactivo se asocian espontáneamente para formar micelas.

El HLB permite cuantificar la contribución relativa de las regiones hidrofílicas e hidrofóbicas de la molécula de tensioactivo. Generalmente, los tensioactivos con un HLB bajo (3-8) favorecen la formación de SMs agua en aceite, mientras que aquellos con un HLB alto (8-18) promueven la formación de SMs aceite en agua.

Los tensioactivos se clasifican en cuatro clases principales: no iónicos, zwitteriónicos, aniónicos y catiónicos. Los tensioactivos no iónicos son ampliamente utilizados en la preparación de SMs debido a su baja toxicidad e irritabilidad. Particularmente, los SMs basados en polisorbatos (serie Tween) suelen considerarse seguros y no irritantes (Flanagan y Singh, 2006).

Los tensioactivos no iónicos de la serie Tween son los más empleados en la industria alimenticia y se caracterizan por la presencia de una cadena de polioxietileno hidrofílica y una cadena de hidrocarburo hidrofóbica en su estructura molecular. Dependiendo del número de grupos polioxietileno, se clasifican en: Tween 20 (monolaurato de sorbitan polioxietileno), Tween 40 (monopalmitato de sorbitan polioxietileno), Tween 60 (monoestearato de sorbitan polioxietileno) y Tween 80 (monooleato de sorbitan polioxietileno) (Callender y col., 2017).

Las diferencias en la estructura molecular de estos tensioactivos influyen en su capacidad para solubilizar aceites y formar distintos tipos de dispersiones coloidales (Ziani y col., 2012). En este sentido, numerosos antecedentes proponen al Tween 80 (con un HLB = 15) como tensioactivo para la producción de SMs estables capaces de encapsular diversos AEs, como por ejemplo, AE de limón (Rao y McClements, 2012), AEO (Sedaghat Doost et al., 2020), AET y AE de canela (Ma y col., 2016). Gracias a su bajo peso molecular, alta disponibilidad y baja toxicidad, el Tween 80 representa una excelente opción para la formulación de SMs con potencial aplicación en la industria alimenticia.

1.2.2.2. Cosurfactantes

La formación de SMs también puede requerir la presencia de un cosurfactante, cuya función es reducir aún más la tensión interfacial y aumentar la fluidez de la interfase, lo que incrementa la entropía del sistema. Además, los cosurfactantes pueden modificar la curvatura de la película interfacial, al separar las cadenas hidrocarbonadas de tensioactivo, permitiendo así una mayor penetración de aceite (Flanagan y Singh, 2006).

Entre los cosurfactantes más utilizados para la formación de SMs se encuentran los alcoholes de cadena corta, como etanol, propanol, butanol y pentanol. Aunque el etanol es menos eficaz que los demás, se destaca por ser un ingrediente seguro para su aplicación en sistemas biocompatibles (de Castro Santana y col., 2012).

Un estudio de Lieu y Dang (2021) demostró que la incorporación de etanol como cosurfactante favorece la formación de SMs de Tween 80 y AE de canela. De manera similar, Golwala y col. (2020) observaron que el uso de etanol como cosurfactante aumentó la cantidad de aceite solubilizado por el SM.

En función de lo expuesto, el etanol se perfila como una alternativa viable para la obtención de SMs con potencial aplicación en la industria alimenticia.

1.2.2.3. Fase oleosa

La fase oleosa de los SMs suele estar compuesta por triglicéridos de cadena media, AEs o compuestos hidrofóbicos de bajo peso molecular. Por ejemplo, se han desarrollado SMs utilizando AE de clavo (He y col., 2016), AEs de maní y limón (Calligaris y col., 2019), curcumina (Merenkova y col., 2022) y Miglyol 818 (Kalaitzaki y col., 2014).

La formación de SMs con aceites de alto peso molecular, como los triglicéridos, resulta más compleja. Estos contienen ácidos grasos de cadena larga y su tamaño voluminoso dificulta la penetración de la película interfacial y la obtención de una curvatura óptima para la estabilización del sistema (Flanagan y Singh, 2006).

La cantidad de aceite que puede incorporarse en las micelas de tensioactivo no solo depende de las propiedades del aceite (como volumen molar, geometría y polaridad), sino también de las características del tensioactivo (como el HLB y su concentración) y de las condiciones ambientales (como temperatura, pH y fuerza iónica).

La capacidad máxima de solubilización de aceite en los SMs se expresa como concentración de saturación (C_{sat}) y representa los gramos de aceite solubilizado por el tensioactivo bajo condiciones ambientales específicas. Si la cantidad total de aceite en el sistema es menor que dicho valor, todas las moléculas de aceite serán solubilizadas y se formarán los SMs. En cambio, si la cantidad de aceite supera este límite, las micelas no podrán solubilizarlo completamente, lo que afectará la estabilidad del sistema (McClements, 2012).

1.2.3. Sistemas micelares que encapsulan aceites esenciales

Existen numerosos antecedentes sobre la encapsulación de AEs y sus compuestos bioactivos en SMs de Tween 80. He y col., (2016) desarrollaron SMs utilizando AE de clavo, Tween 80 y etanol como fase oleosa, tensioactivo y cosurfactante, respectivamente. Estos SMs demostraron una eficaz actividad antifúngica contra *Penicillium digitatum*, un patógeno postcosecha de naranjas. Además, observaron que los SMs fueron más efectivos que los AEs en su forma libre, debido a su pequeño tamaño, lo que favoreció la permeabilización de la membrana celular.

Por su parte, Deng y col., (2015) formularon SMs de timol, Tween 80 y etanol, con una elevada actividad antioxidante. Estos SMs fueron propuestos como una alternativa viable para la incorporación de timol en bebidas.

En un estudio reciente, Brandt y col., (2023) incorporaron SMs de AE de romero y Tween 80 en puré de tomate, evidenciando actividad antifúngica contra los géneros *Mucor*, *Aspergillus* y *Penicillium*, lo que contribuyó a la conservación del producto. Asimismo, se observó una marcada actividad antioxidante.

Si bien se han desarrollado SMs con AEs, Tween 80 y etanol con actividad antifúngica y antioxidante, hasta el momento no se han encontrado estudios sobre la actividad antifúngica de

SMs de AEO y AET frente a *Candida spp.* Además, se desconoce su bioactividad tras ser sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.

1.3. FUNDAMENTACIÓN DEL TRABAJO

En la actualidad, existe un creciente interés en la investigación en el ámbito de la ciencia y tecnología de los alimentos, dirigida al desarrollo de alimentos funcionales sensorialmente atractivos. En este contexto, los AEs han adquirido relevancia debido a sus numerosas propiedades biológicas entre las que se destacan las propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Coimbra y col., 2022).

La incorporación de AEs en una matriz alimenticia permitiría obtener alimentos seguros, ya que se trata de sustancias reconocidas como GRAS por la FDA, y con destacadas propiedades biológicas (Yamine y col., 2022). Sin embargo, la aplicación directa de los AEs en un alimento presenta una serie de limitaciones asociadas a su naturaleza lipofílica, elevada volatilidad y susceptibilidad al deterioro oxidativo y fotoquímico. En este sentido, la encapsulación de AEs en nano o microestructuras constituye una estrategia promisoría para mejorar su solubilidad acuosa, retención en la matriz alimenticia y protección frente a factores injuriantes (Delshadi y col., 2020; Yamine y col., 2022).

Dentro de las diferentes tecnologías de encapsulación existentes, los SMs constituyen una alternativa prometedora para la incorporación de AEs en la formulación de alimentos ya que, al tratarse de sistemas coloidales termodinámicamente estables y de tamaño nanométrico (10-100 nm), no afectarían sustancialmente las propiedades fisicoquímicas de los mismos (e.g. actividad de agua, color y textura) (Guo y col., 2020; Lesmes y McClements, 2009).

La evaluación de la actividad antifúngica frente a *Candida spp.* fue incorporada en este trabajo con el objetivo de explorar el potencial de los SMs como herramientas funcionales para el control del crecimiento fúngico intestinal. Considerando que *Candida* puede proliferar bajo ciertas condiciones generando desequilibrios en la microbiota, y que los AEs evaluados han demostrado

actividad antifúngica en estudios previos, resulta pertinente analizar si dicha bioactividad se conserva, mejora o se ve afectada por el proceso de encapsulación.

Desde esta perspectiva, la presente tesis de maestría abordará el estudio y desarrollo de SMs capaces de encapsular AEs derivados de especias culinarias para su potencial incorporación como nanoingredientes en la formulación de alimentos, brindando conocimientos relevantes para el campo de la nanotecnología aplicada a la industria alimenticia.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Reunir conocimientos básicos y aplicados que permitan el desarrollo de una tecnología de encapsulación de aceites esenciales (AEs) derivados de especias culinarias basada en sistemas micelares (SMs), contribuyendo de esta manera al diseño de alimentos funcionales con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En virtud de lo anteriormente expuesto, los objetivos específicos que se plantean son los siguientes:

Objetivo 1. Obtener SMs que encapsulen aceite esencial de *Origanum vulgare* (AEO) y aceite esencial de *Thymus vulgaris* (AET).

Objetivo 2. Evaluar las características fisicoquímicas, propiedades antioxidantes, antimicrobianas y la digestión gastrointestinal *in vitro* de los SMs bioactivos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Para los estudios desarrollados en la presente tesis de maestría se utilizaron los siguientes materiales:

- Aceites esenciales: aceite esencial de *Origanum vulgare* (AEO) y aceite esencial de *Thymus vulgaris* (AET) adquiridos de Sigma-Aldrich (Estados Unidos) y almacenados según las recomendaciones del fabricante hasta el momento de ser utilizados.
- El reactivo ABTS utilizado para la determinación de actividad antioxidante se adquirió de Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Persulfato de potasio, ferricianuro potásico, ácido tricloroacético y cloruro férrico, se adquirieron de Biopack (Argentina).
- Medio de cultivo: Caldo Dextrosa Sabouraud (SBD; Britania) suplementado con 1,5% de agar. Luego de su preparación, el medio de cultivo fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 min.
- Reactivos utilizados para la evaluación de la digestión gastrointestinal *in vitro*: ácido 3,5-dinitrosalicílico (D0550), ácido ascórbico, pepsina de mucosa gástrica porcina (P7000), pancreatina de páncreas porcino (P7545), extracto biliar porcino (B8631), hemoglobina (H2500), clorhidrato de éster metílico de N α -p-tosil-L-arginina (TAME, T4626) y cóctel de inhibidores de proteasas (P2714). Los mismos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Estados Unidos).
- Reactivos analíticos adicionales como Tween 80, etanol absoluto, n-hexano, metanol y cloruro de sodio, se adquirieron de Cicarelli o Biopack (Argentina). Todos ellos se utilizaron y conservaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ensayos preliminares

Se determinó la composición del AEO y AET, y la CMC del Tween 80; información fundamental para el diseño del sistema de encapsulación y el estudio de las propiedades biológicas de los AEs.

3.2.1.1. Análisis de la composición de los aceites esenciales

La composición del AEO y AET se determinó por GC-FID/MS mediante un cromatógrafo de gases Thermo Trace 1300 (Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.), equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un espectrómetro de masas de la serie ISQ (Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.). La separación se realizó con una columna capilar TR 5MS (30 m × 0,25 mm de diámetro interno, espesor de película de 0,25 mm). Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 300°C. La temperatura inicial fue de 40°C y se incrementó gradualmente hasta 200°C a un ritmo de 5°C min⁻¹, manteniéndose durante 20 min a 200°C. La velocidad lineal del gas portador de helio fue de 1,5 mL min⁻¹ a una relación *split* de 100:1. Para el análisis, se inyectó una alícuota de muestra de 1,0 µL. La identificación de los componentes se realizó comparando los espectros de masas registrados con los estándares de la biblioteca XCalibur del software MS del NIST. Los análisis cuantitativos se llevaron a cabo utilizando el pico del área normalizada, y cada componente se expresó como porcentaje de área. Por último, se seleccionó el área del pico como señal analítica para determinar el contenido relativo (CR, %) de los componentes identificados.

3.2.1.2. Determinación de la Concentración Micelar Crítica

La CMC de Tween 80 se determinó mediante tensiometría de gota pendiente (Attension Theta, Biolin Scientific, Helsinki, Finlandia) a una temperatura de ensayo de 25°C. Para ello, se midió la tensión superficial (mN m⁻¹) sobre la interfase aire/agua de soluciones acuosas de Tween 80 preparadas a concentraciones crecientes (3.10⁻⁴ - 0,1% p/p). Luego se graficaron los valores de tensión superficial obtenidos en función del logaritmo natural (ln) de la concentración de Tween 80 y, a partir de dicha gráfica, se obtuvo el valor de CMC mediante la intersección de dos rectas provenientes del ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal simple (Rehman y col., 2017).

3.2.2. Obtención de sistemas micelares que encapsulan aceites esenciales

Se evaluaron dos métodos de obtención de SMs. El primero (SMs-1) se basó en un proceso de autoensamblaje de baja energía mecánica, mientras que el segundo (SMs-2) consistió en la titulación de una solución acuosa de tensioactivo con una emulsión madre de AE obtenida

mediante un proceso de alta energía mecánica. En ambos casos se utilizó Tween 80 como tensioactivo, etanol como cosurfactante y AE (AEO y AET) como fase oleosa.

3.2.2.1. Método de autoensamblaje

Los sistemas SMs-1 se obtuvieron según la metodología descrita por [Sedaghat Doost y col., \(2020\)](#) con algunas modificaciones. En este sentido, se añadieron 0,4 g de AE disuelto en etanol absoluto (50% p/p) a una solución acuosa con cantidades variables de Tween 80 (0,01 - 0,20 g), obteniéndose relaciones Tween 80/AE (SOR) comprendidas entre 0,05 y 1,00 (p/p). A continuación, las mezclas se agitaron durante 30 s utilizando un vórtex (Vortex MX-S DLab, China) y se almacenaron a temperatura ambiente (25°C) ([Figura 7](#)). Los SMs-1 obtenidos presentaron un valor de pH igual a 6,0.



Figura 7. Esquema de obtención de SMs-1.

3.2.2.2. Método de titulación

Para la obtención de los sistemas SMs-2, inicialmente se formuló una emulsión madre con AE (5,0% p/p), etanol absoluto (5,0% p/p) y Tween 80 (2,5% p/p), la cual se homogenizó a 15.000 rpm durante 5 min utilizando un agitador de alta velocidad (IKA dispersor digital ULTRA-TURRAX T25, Alemania). Posteriormente, se tituló una solución acuosa de Tween 80 (1% p/p) con alícuotas crecientes de emulsión madre para obtener SMs-2 con un rango de concentración

final de AE comprendido entre 0,0125 y 3% (p/p) (Figura 8, Rao y McClements, 2012). Los SMs-2 obtenidos presentaron un valor de pH igual a 6,0.

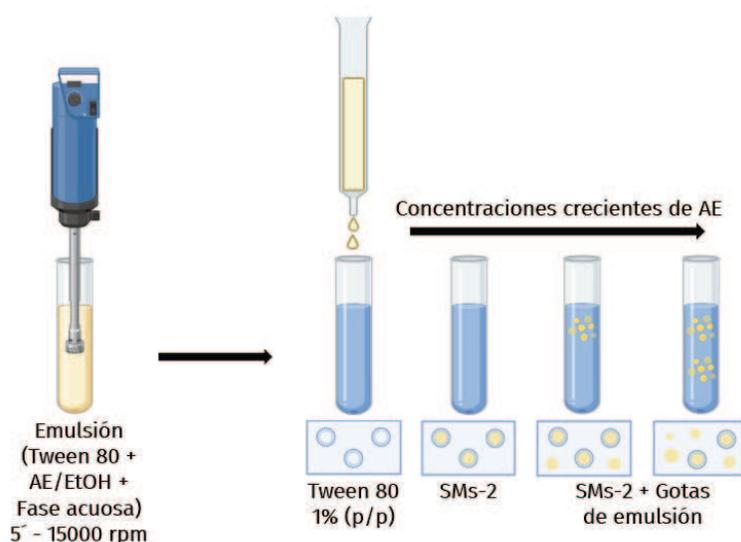


Figura 8. Esquema de obtención de SMs-2.

3.2.3. Evaluación de las características fisicoquímicas, propiedades antioxidantes, antimicrobianas y de la digestión gastrointestinal *in vitro* de los SMs bioactivos

Los sistemas SMs-1 y SMs-2 se compararon en términos de tamaño de partícula, eficiencia de encapsulación (EE) y morfología, haciendo hincapié en la evaluación de la estabilidad de los SMs durante un periodo de almacenamiento de 30 días. De acuerdo a los resultados que fueron obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis, se seleccionó el sistema SMs-2 para ser analizado en profundidad. En este contexto, se llevó a cabo una evaluación exhaustiva de la estabilidad de los sistemas SMs-2 cargados con AEO y AET frente a diferentes factores fisicoquímicos y un estudio de sus propiedades antioxidantes y antifúngicas. Además, se simuló su digestión gastrointestinal con el objetivo de obtener información acerca de su estabilidad, bioaccesibilidad y actividad antioxidante luego del proceso digestivo.

3.2.3.1. Capacidad y cinética de solubilización

La C_{sat} se determinó midiendo la ABS a 600 nm de los SMs-2 luego de 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C), utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Jenway 7305 (UK). El valor de C_{sat} se obtuvo de la intersección de dos líneas rectas (derivadas del ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal simple) correspondientes a concentraciones relativamente bajas y altas de AE (Rao y McClements, 2012). Es importante señalar que esta medición no pudo realizarse para los sistemas SMs-1 debido a la observación de heterogeneidad de fases (separación de fases, regiones turbias, translúcidas y opacas). Además, se determinó la cinética de solubilización de los SMs-2 mediante mediciones de turbidez (600 nm) en función del tiempo (300 s), inmediatamente después de que la solución de Tween 80 (1% p/p) sea titulada con alícuotas de la emulsión madre de AE (AEO y AET). Para ello, se utilizó un espectrofotómetro Lambda 20 UV/VIS (Perkin Elmer, Alemania).

3.2.3.2. Distribución de tamaño de partículas

El tamaño de partícula de los SMs vacíos y de los sistemas SMs-1 y SMs-2 cargados con AE (AEO y AET) se determinó a 25°C utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). La distribución de tamaño de partículas (PSD) se obtuvo mediante dispersión de luz dinámica (DLS) a 173° y 632,8 nm de longitud de onda. El diámetro hidrodinámico (d_H) de las partículas se registró a partir del pico de la curva de intensidad (%) en función del diámetro (nm) (PSDi). También, se consideró la distribución de tamaño de partículas en función del volumen (PSDv). En el caso de los SMs-1, las muestras se tomaron de la región del tubo que presentó una apariencia translúcida. Además, fue necesario diluir los sistemas SMs-1 para minimizar los efectos de dispersión múltiple que impiden una correcta determinación de la PSD (Kang y col., 2022). Para determinar la estabilidad coloidal de SMs-1 y SMs-2, se registraron sus tamaños de partícula a 1, 7, 14 y 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C).

3.2.3.3. Eficiencia de encapsulación

Inicialmente, se determinó la longitud de onda a la máxima ABS de AE (AEO y AET) disueltos en n-hexano utilizando un espectrofotómetro UV/VIS (Lambda 20, Perkin Elmer), dando como resultado 281 nm y 273 nm respectivamente. Posteriormente, se realizaron curvas estándares

(calibrado) de ABS en función de la concentración de AE en n-hexano, en un intervalo comprendido entre $3 \cdot 10^{-4}$ y $9 \cdot 10^{-3}$ % (p/p).

Para determinar la EE de los sistemas SMs-1, se midió tanto el AE libre como el AE total. En este sentido, se tomaron 0,3 g de SMs-1 de la zona del tubo donde se observó una apariencia translúcida, se disolvieron en 2 g de n-hexano y se agitaron durante 30 s utilizando un vórtex. Luego, para obtener la concentración de AE libre, se midió la ABS de los sobrenadantes a 281 nm para AEO y 273 nm para AET, utilizando un espectrofotómetro Jenway 7305 (Reino Unido) (Dávila-Rodríguez y col., 2019). Para determinar el AE total, 0,02 g de los sistemas SMs-1 se disolvieron en 2 g de metanol y se agitaron durante 10 s en vórtex (Sun y col., 2018). A continuación, 0,3 g de esta solución se diluyeron con 2 g de n-hexano y se agitaron durante 30 s en vórtex. Por último, se recogieron los sobrenadantes y se midió la ABS a nivel de la longitud de onda correspondiente para cada AE.

Para SMs-2 sólo se determinó el AE libre de la misma manera que para SMs-1.

La EE se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{T_{AE} - L_{AE}}{T_{AE}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

dónde: T_{AE} es el AE total medido en SMs-1 o la concentración teórica de AE en SMs-2, y L_{AE} es el AE libre medido para SMs-1 y SMs-2. La EE se determinó a los días 1, 7, 14 y 30 de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C).

3.2.3.4. Microscopía de fuerza atómica

Se analizó la morfología y ultraestructura de los SMs vacíos y de los sistemas SMs-1 y SMs-2 cargados con AE (AEO y AET) mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). Para ello, alícuotas de cada sistema se adsorbieron sobre una superficie de mica (1 cm^2) mediante un proceso de secado en una cámara de vacío a temperatura ambiente (25°C). La obtención de imágenes de AFM se realizó en modo “*tapping*” utilizando un microscopio Agilent 5400 (EE.UU.). Se utilizaron *cantilevers* de AFM recubiertos de aluminio (OPUS, modelo: 160AC-NA), con las siguientes especificaciones: longitud: 160 μm ; radio de la punta: < 7 nm; ancho medio: $40 \pm 2 \mu\text{m}$;

grosor: $4 \pm 0,5 \mu\text{m}$; altura de la punta: $14 \mu\text{m}$; constante de resorte: 26 N/m . La frecuencia de oscilación del *cantilever* se fijó en 280 kHz , y las muestras se escanearon a 1 línea s^{-1} . Se utilizó el software Gwyddion 2.44 para el procesamiento de imágenes (Jalali-Jivan y col., 2020).

3.2.3.5. Microscopía electrónica de transmisión

Además, la morfología de los SMs-2 vacíos y cargados con AE (AEO y AET) se examinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM - JEOL, JEM-2100 Plus, Japón) con un voltaje de aceleración de 100 kV . Para la obtención de imágenes TEM nítidas, la rejilla de cobre junto con la muestra se tiñó con una solución de ácido fosfotúngstico al $2\% \text{ v/v}$ (Bergonzi y col., 2014).

3.2.3.6. Estabilidad fisicoquímica

Dado que el objetivo de la presente tesis es desarrollar SMs capaces de encapsular AEs para su potencial aplicación como nanoingredientes funcionales en alimentos, resultó fundamental evaluar su estabilidad frente a diferentes factores fisicoquímicos como temperatura, fuerza iónica, pH, dilución acuosa y centrifugación.

Todas las determinaciones de estabilidad se llevaron a cabo mediante mediciones de tamaño de partícula (DLS - 173° y $632,8 \text{ nm}$) antes y después de someter los sistemas SMs-2 cargados con AEO ($0,17\% \text{ p/p}$) y AET ($0,21\% \text{ p/p}$), a diferentes tratamientos. La medición del tamaño de partícula antes y después de los tratamientos permitiría detectar posibles cambios en la estabilidad coloidal de los SMs-2, siendo un indicador sensible para evaluar su integridad estructural frente a diferentes condiciones fisicoquímicas. Las concentraciones de AEO y AET seleccionadas corresponden a los valores de C_{sat} , es decir, a la máxima concentración de AE capaz de ser solubilizada por los SMs-2.

En cuanto a la estabilidad frente a la temperatura, los sistemas SMs-2 se incubaron a 4 , 50 y $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min (Sedaghat Doost y col., 2020). Respecto a la estabilidad frente a la fuerza iónica, los sistemas se mezclaron en partes iguales con soluciones de cloruro de sodio a diferentes concentraciones (100 , 300 y 500 mM) (Kang y col., 2022). La estabilidad frente a variaciones de pH se evaluó ajustando el pH de los sistemas a 3 , 5 , 7 y 9 utilizando HCl o NaOH $0,1$ y 1 M

(Gaysinsky y col., 2005). El efecto de la dilución se estudió diluyendo los sistemas 1, 10 y 20 veces (v/v) con agua destilada (Sedaghat Doost y col., 2020). Finalmente, para evaluar la estabilidad física, los sistemas se centrifugaron (HealForce, Nefuge 18R) a 1.000 y 3.000 rpm durante 15 min (Mori Cortés y col., 2019).

3.2.3.7. Actividad antioxidante por el método ABTS

La actividad de captación del radical ABTS^+ que poseen los SMs-2 vacíos y cargados con AEO (C_{sat} 0,17% p/p) y AET (C_{sat} 0,21% p/p) se evaluó según el método reportado por Finos y col. (2024), con algunas modificaciones. En primer lugar, se obtuvo el radical ABTS^+ añadiendo 0,04 mL de persulfato potásico 70 mM a 10 mL de solución ABTS 2 mM e incubando este reactivo en oscuridad durante 16 h a temperatura ambiente (25°C). A continuación, la solución de radical ABTS^+ se diluyó con una solución salina tampón fosfato 0,01 M (PBS, pH 7,4) para ajustar su ABS a 734 nm a un valor de $0,80 \pm 0,03$. Para la determinación de la actividad antioxidante, se añadieron 1,9 mL de solución de radical ABTS^+ a 0,1 mL de muestra y, tras 6 min de reacción en oscuridad a temperatura ambiente (25°C), se midió la ABS a 734 nm utilizando un espectrofotómetro (Jenway 7305, Reino Unido). Además, se realizó un control utilizando agua destilada en lugar de muestra. Los valores de ABS medidos se interpolaron en una curva estándar de Trolox de un rango de concentración comprendido entre 0 y 0,15 mg mL⁻¹, y la actividad de captación del radical ABTS^+ se expresó como mg Trolox mL⁻¹.

3.2.3.8. Actividad antioxidante por el método Poder Reductor

El poder reductor de los SMs-2 vacíos y cargados con AE (AEO y AET) se determinó siguiendo la metodología reportada por Finos y col. (2024), con escasas modificaciones. Inicialmente, se mezclaron 0,2 mL de muestra con 0,5 mL de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,6) y 0,5 mL de ferricianuro potásico al 1% (p/p). Esta mezcla se incubó a 50°C durante 20 min, y tras la adición de 0,5 mL de ácido tricloroacético al 10%, se sometió a centrifugación a 8.000 g durante 5 min a 25°C. Posteriormente, se recogió 1 mL del sobrenadante y se combinó con 1 mL de agua destilada y 0,2 mL de cloruro férrico al 0,1% (p/p). Tras dejar reaccionar esta mezcla a 50°C durante 10 min en oscuridad, se midió la ABS a 700 nm utilizando un espectrofotómetro (Jenway 7305, Reino Unido). Se realizó un blanco, utilizando agua destilada en lugar de muestra y cloruro

férrico, y un control negativo donde solo la muestra se substituyó por agua destilada. Los valores de ABS medidos se interpolaron en una curva estándar de ácido ascórbico de concentraciones comprendidas entre 0,01 y 0,19 mg mL⁻¹, y el poder reductor se expresó como mg EAA mL⁻¹.

3.2.3.9. Actividad antifúngica

La evaluación de la actividad antifúngica frente a *Candida spp.* se incorporó en el presente trabajo de tesis con el fin de explorar el potencial de los SMs-2 como nanoingredientes funcionales con capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos oportunistas a nivel intestinal.

La CIM de los AEs (AEO y AET) libres y encapsulados en SMs-2 contra *Candida albicans* (ATCC 10231), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 2219) y *C. glabrata* (ATCC 90030), se determinó mediante el ensayo de dilución en agar (Boukhatem y col., 2020). Brevemente, soluciones de AE (AEO y AET) en DMSO (5mg/mL) y SMs-2 cargados con AE (AEO y AET - 5mg/mL) se diluyeron a 40°C en medio de cultivo SBD suplementado con 1,5% de agar, para obtener las siguientes concentraciones finales de AE: 2; 1,5; 1; 0,5; 0,1 mg/mL. A continuación, 2µL de suspensiones de *Candida spp.* (10⁴ UFC/mL) se inocularon en tres puntos equidistantes de las placas de agar, las cuales se incubaron a 30°C durante 48 h. La CIM se determinó como la concentración más baja de AE libre y encapsulado en SMs-2 que inhibió el crecimiento visible de cada cepa en las placas de Petri. Se realizó un control con las máximas concentraciones utilizadas de DMSO, etanol y Tween 80.

La concentración fungicida mínima (CFM) de los AEs (AEO y AET) libres y encapsulados en SMs-2 se evaluó según Oshim y col. (2019), con algunas modificaciones. Para ello, las zonas del agar sin crecimiento fúngico observadas durante la determinación de CIM, se hisoparon y se repicaron en placas con medio SBD preparado sin agentes antifúngicos. A continuación, se incubaron a 30°C durante 48 h. La MFC se determinó como la concentración más baja de AE que produjo ausencia de crecimiento.

3.2.3.10. Digestión gastrointestinal *in vitro*

La simulación de la digestión gastrointestinal permite evaluar la estabilidad, liberación y potencial bioaccesibilidad de los AEs encapsulados, aspectos clave para su aplicación en alimentos funcionales.

Para evaluar la digestibilidad de los SMs-2 y la posterior liberación de AE, se empleó un modelo *in vitro* ampliamente aceptado que simula la digestión gástrica e intestinal secuencial con leves modificaciones (Brodkorb y col., 2019; Visentini y col., 2020).

Fase gástrica: Empleando tubos de vidrio, se mezclaron los SMs-2 vacíos y cargados con AE (AEO y AET), con un volumen igual de fluido gástrico simulado 1X (SGF 1X). La solución SGF 1,25X se preparó de la siguiente manera: 6,9 mM KCl, 0,9 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 47,2 mM NaCl, 0,1 mM MgCl₂ y 0,5 mM (NH₄)₂CO₃. Posteriormente, se añadió CaCl₂ 0,3 M para alcanzar una concentración final de CaCl₂ de 0,075 mM. El pH se ajustó a 3,0 utilizando HCl, seguido de la adición de una solución de pepsina (8 U/mg de sustrato) y el volumen adecuado de agua para formar SGF 1X. Los tubos se incubaron a 37°C durante 2 h con agitación orbital a 60 rpm (Rotator Multi Bio RS-24, BOECO).

Fase intestinal: Después de la fase gástrica, se añadió un volumen equivalente de fluido intestinal simulado 1X (SIF 1X) a los tubos de reacción gástrica. La solución SIF 1,25X se preparó como sigue: 6,8 mM KCl, 0,8 mM KH₂PO₄, 85 mM NaHCO₃, 38,4 mM NaCl y 0,33 mM MgCl₂. A continuación, se añadió CaCl₂ hasta alcanzar una concentración final de 0,3 mM y se introdujo una solución de sales biliares (SB) (8.10⁻⁴ mmol/mg de sustrato). El pH se ajustó a 7,0. Posteriormente, se añadió la solución de pancreatina, previamente disuelta en SIF 1,25X (0,8 U/mg de sustrato, según la actividad de la tripsina), con el volumen de agua necesario para obtener SIF 1X. Luego, los tubos se incubaron a 37°C durante 2 h con agitación orbital a 60 rpm (Rotator Multi Bio RS-24, BOECO). Una vez finalizada la reacción intestinal, se añadió un inhibidor de proteasas 2 mM.

➤ Distribución de tamaño de partículas

La PSDi y PSDv de los SMs-2 vacíos y cargados con AE (AEO y AET) se determinaron luego de la digestión gastrointestinal simulada mediante DLS, utilizando un equipo Zeta-Sizer (Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd, Reino Unido). Las mediciones de tamaño se realizaron antes de la digestión a pH 6,0 y después de la digestión gástrica e intestinal secuencial a pH 7,0 (pH SIF).

➤ Estabilidad y bioaccesibilidad *in vitro*

Se evaluó la estabilidad y bioaccesibilidad de los AEs tras el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* (Liu y col., 2018; Sorasitthyanukarn y col., 2022; Zhang y col., 2016). Para ello, se extrajeron los AEs de la fase de digestión total y micelar. Tras la fase de digestión intestinal, las muestras se centrifugaron a 10.000 g y 25°C durante 30 min para eliminar el material sólido insoluble. Se consideró que los sobrenadantes contenían AEs liberados de los SMs para producir la fracción micelar. Sólo los AEs presentes en la fase micelar se consideraron disponibles para la absorción, por lo que representaron la fracción bioaccesible. A continuación, se recogieron 0,3 mL de sobrenadantes (fracción micelar) y se mezclaron en vórtex durante 1 min con 3 mL de hexano. Luego, se realizó una segunda extracción con 3 mL de hexano. La capa total de hexano se analizó con un espectrofotómetro UV-vis (Jenway 7305, Reino Unido), utilizando una longitud de onda de 281 nm para AEO y 273 nm para AET. La concentración de AE se calculó a partir de la determinación de ABS utilizando una curva estándar. Para el digesto total se utilizó el mismo método de extracción.

La estabilidad de los AEs (E^*) se definió como la fracción que permaneció sin transformaciones en el intestino tras el proceso de digestión *in vitro*:

$$E^* = \frac{C_{\text{Digesto}}}{C_{\text{Inicial}}} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

donde, C_{Digesto} y C_{Inicial} son las concentraciones de AE en el digesto total recogido tras la fase intestinal y en la muestra inicial, respectivamente.

Por otra parte, la bioaccesibilidad de los AEs (B^*) se definió como la fracción que se liberó del sistema y se solubilizó en la fase de micelar tras la digestión:

$$B^* = \frac{C_{Micela}}{C_{Digesto}} * 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

donde, C_{Micela} es la concentración de AE en la fracción micelar.

Por último, la bioaccesibilidad efectiva (BE), definida como la fracción de AE presente en la fase micelar, depende de los valores de E^* y B^* y se calculó como:

$$BE = B^* * E^* = \frac{C_{Micela}}{C_{Inicial}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

➤ **Actividad antioxidante de los sistemas micelares digeridos**

La actividad antioxidante del medio SIF y de la fracción bioaccesible de los SMs-2 vacíos (Tween 80 1% p/p) y cargados con AEO (C_{sat} 0,17% p/p) y AET (C_{sat} 0,21 % p/p) se determinó mediante el método ABTS y el método de poder reductor, de la misma manera que para los SMs-2 sin digerir (Sección 3.2.3.7. y 3.2.3.8.).

3.2.4. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. A partir de estas mediciones se calcularon los valores medios y las desviaciones estándar. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional utilizando el programa Stat Graphics Plus 3.0. Para este análisis se utilizó la prueba LSD con un nivel de confianza del 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayos preliminares

4.1.1. Análisis de la composición de los aceites esenciales

En la [Tabla 1](#) se observa la composición de los AEs determinada por GC-FID/MS. El CR de los compuestos no identificados fue del 1% para el AEO, mientras que para el AET todos los componentes fueron identificados. Se detectaron 6 compuestos en el AEO, siendo el carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) el más abundante. Este resultado coincide con valores reportados en la bibliografía ([Rienth y col., 2019](#)). El carvacrol es un terpenoide fenólico, isómero del timol, que se caracteriza por sus propiedades biológicas, incluyendo actividades antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes ([Sharifi-Rad y col., 2018](#)).

Los principales componentes del AET fueron timol (2 isopropil-5-metilfenol) y o-cimeno, seguidos de 6 compuestos menores. Estos resultados concuerdan con los de [Hu y col., \(2018\)](#), quienes encontraron valores similares para estos dos compuestos en AET comercial. El o-cimeno, isómero del p-cimeno, ha sido asociado con propiedades antioxidantes ([Aebisher y col., 2021](#)). Por su parte, el timol, un terpenoide fenólico, ha sido ampliamente reconocido por su actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante ([Angelo y col., 2016](#); [Nikolić y col., 2014](#)).

Tabla 1. Composición relativa de los principales compuestos del aceite esencial de orégano (AEO) y tomillo (AET) determinada por GC-FID/MS.

Aceites esenciales	TR (min)	Constituyente	CR (%)
<i>Origanum vulgare</i> (AEO)	6,86	No identificado	1,0
	7,96	o-cimeno	9,1
	8,81	γ -terpineno	7,1
	9,92	α -linalool	1,9
	15,89	Carvacrol	78,6
	18,46	Cariofileno	1,8
	22,46	Óxido de cariofileno	0,5

<i>Thymus vulgaris</i>	5,6	α -ocimeno	2,9
(AET)	6,89	α -mirceno	1,4
	8,08	o-cimeno	35,5
	8,85	γ -terpineno	7,9
	10,01	α -linalool	5,8
	15,56	Timol	44,9
	18,47	Cariofileno	0,9
	22,49	Óxido de cariofileno	0,6

TR: Tiempo de retención. CR: Contenido relativo.

4.1.2. Determinación de la Concentración Micelar Crítica

Se analizó el efecto de la concentración de Tween 80 (% p/p) sobre la tensión superficial (mN/m) de soluciones acuosas de tensioactivo (Figura 9). Se observó que la tensión superficial en la interfase aire/agua disminuyó de manera lineal con el aumento del logaritmo natural (ln) de la concentración de Tween 80, lo que indica una adsorción progresiva de monómeros de Tween 80 sobre dicha interfase. La adsorción continúa hasta que la superficie se satura completamente de moléculas de tensioactivo. A partir de ese punto, un incremento adicional en la concentración de Tween 80 no produce ningún cambio en la tensión superficial, lo que genera una clara ruptura en la curva de tensión superficial. Esta ruptura ocurre a una concentración específica de Tween 80, correspondiente al valor de CMC. Por encima de la CMC, las moléculas de Tween 80 se autoensamblan para formar micelas junto con otras estructuras supramoleculares (especialmente a concentraciones de tensioactivo más elevadas, Figura 4) (Rehman y col., 2017).

La CMC, definida como la concentración mínima de Tween 80 que inicia la formación de micelas, se registró en $(38 \pm 4) \cdot 10^{-4}\%$ (p/p). A esta concentración, las micelas vacías de Tween 80 permiten la solubilización de compuestos lipofílicos al encapsularlos en su núcleo hidrofóbico (Narang y col., 2007). El valor de CMC obtenido fue consistente con valores reportados en la bibliografía (Rehman y col., 2017; Wang y Gao, 2018).

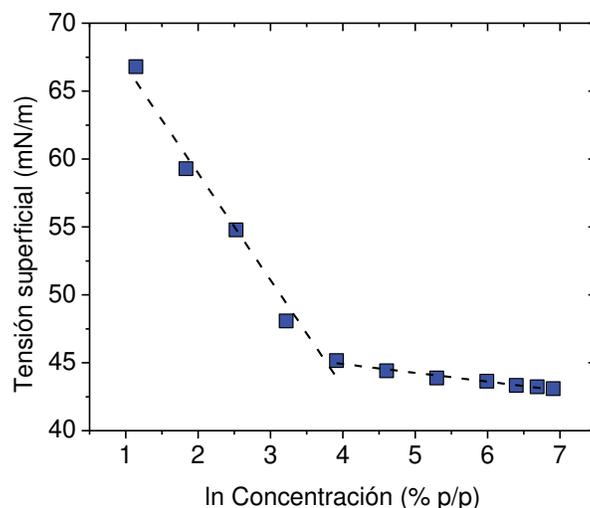


Figura 9. Efecto de la concentración de Tween 80 (% p/p) sobre la tensión superficial (mN/m) en la interfase aire-agua de una solución acuosa de tensioactivo. Condiciones: pH 6, temperatura: 25°C.

4.2. Evaluación de las características fisicoquímicas, propiedades antioxidantes, antimicrobianas y de la digestión gastrointestinal *in vitro* de los SMs bioactivos

4.2.1. Capacidad y cinética de solubilización

La solubilización de los AEs (AEO y AET) en SMs-2 se evaluó midiendo el cambio en la turbidez de una solución de Tween 80 al 1% (p/p) tras añadir diferentes alícuotas de emulsión madre (Figura 10). Esta determinación no pudo realizarse para los sistemas SMs-1 debido a la elevada turbidez y heterogeneidad de fases observada en todas las muestras (Figura 11A). Además, la Figura 11B muestra la apariencia visual de los sistemas SMs-2 a medida que varió la concentración de AE y el tiempo de almacenamiento. La turbidez se mantuvo constante en el intervalo de concentración de AE entre 0,0125 y 0,15% (p/p), y luego aumentó bruscamente de 0,2 a 0,5% (p/p), indicando que los SMs se saturaron completamente. El mismo comportamiento se observó en la apariencia visual de los sistemas, donde las soluciones fueron inicialmente transparentes y se volvieron turbias y opacas a una determinada concentración de AE. La C_{sat} , obtenida a partir de la intersección de ambas rectas de la Figura 10, fue $0,17 \pm 0,01\%$ (p/p) para

AEO y $0,21 \pm 0,01\%$ (p/p) para AET. Según la apariencia visual, estos valores se situaron en torno al 0,2-0,5% (p/p) para ambos AE (Figura 11B).

Por debajo de la C_{sat} , los AEs probablemente fueron solubilizados por los SMs, dando lugar a valores de turbidez bajos y un aspecto translúcido. Sin embargo, por encima de la C_{sat} , los SMs posiblemente se saturaron de AE, y el aceite remanente se dispersó como pequeñas gotas, evidenciando altos valores de turbidez y un aspecto turbio y opaco (Rao y McClements, 2012). Además, a altas concentraciones de AE ($> 0,5\%$ p/p), los sistemas se volvieron blancos y se observó separación de fases.

Los valores de C_{sat} obtenidos fueron comparables a los reportados por Deng y col. (2016), quienes desarrollaron micelas cargadas con timol mediante la titulación de una solución de Tween 80 al 2% (p/p) con una emulsión de timol al 10% (p/p), obteniendo un valor de C_{sat} de 0,2% (p/p). En otro trabajo, soluciones acuosas de Tween 80 al 1% (p/p) se titularon con alícuotas crecientes de una emulsión madre formulada con 10% (p/p) de aceite de limón y 1% (p/p) de Tween 80 (Ziani y col., 2012). Los autores hallaron un valor de C_{sat} para el aceite de limón de 0,3% (p/p). Además, analizaron el impacto del tipo de tensioactivo (Tween 20, 60 y 80) sobre la solubilización del aceite de limón y observaron que las micelas de Tween 80 y 60 solubilizaron más aceite que las micelas de Tween 20. Esta diferencia se atribuyó a la estructura química de los tensioactivos, especialmente a la mayor longitud de las cadenas hidrocarbonadas de Tween 80 y 60, lo que permitió la formación de núcleos hidrofóbicos de mayor tamaño capaces de solubilizar mayor cantidad de aceite en su interior.

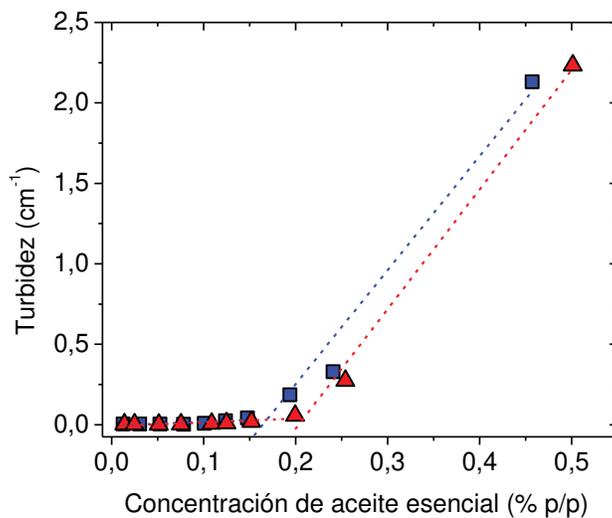


Figura 10. Variación de la turbidez de una solución de Tween 80 (1% p/p) titulada con alícuotas de emulsión de AEO (■) y AET (▲) con la concentración de AE (0,0125-0,5% p/p). Condiciones: pH 6, temperatura: 25°C.

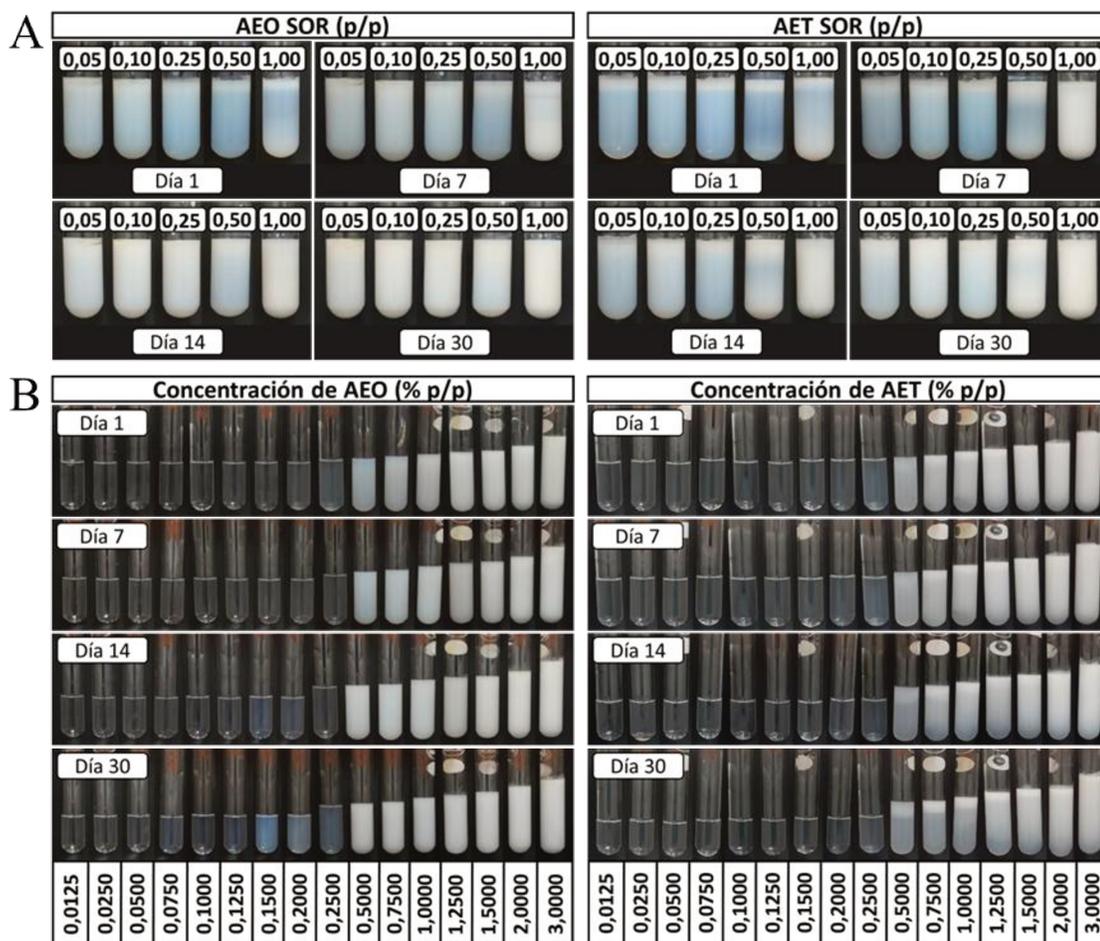


Figura 11. Apariencia visual de (A) SMs-1 a diferentes SOR (p/p) cargados con AEO y AET a 1, 7, 14 y 30 días de almacenamiento. (B) SMs-2 con diferentes concentraciones de AEO y AET (% p/p) a 1, 7, 14 y 30 días de almacenamiento. Condiciones: pH 6, temperatura: 25°C.

En la [Figura 12](#), se muestra la variación de la turbidez de la solución de Tween 80 al 1% (p/p) con el tiempo luego de la adición de alícuotas de emulsión madre de AE. Se observó que, en el caso de los SMs-2 cargados con AEO, por debajo de la C_{sat} , el AE se solubilizó en menos de 50 s, mientras que en el caso de los SMs-2 cargados con AET, este tiempo fue inferior a 25 s. Este comportamiento refuerza la idea de que, por debajo de la C_{sat} , se produjo una rápida disminución de la turbidez probablemente debido a una reducción del tamaño de partícula como consecuencia

de la transferencia de moléculas de AE desde las gotas de emulsión hacia el núcleo micelar o hidrofóbico. A concentraciones superiores a la C_{sat} , los valores de turbidez se mantuvieron elevados durante todo el tiempo de evaluación. Además, la solubilización micelar fue menos evidente a medida que aumentó la concentración de AE, indicando que las gotas de AE predominaron sobre las micelas.

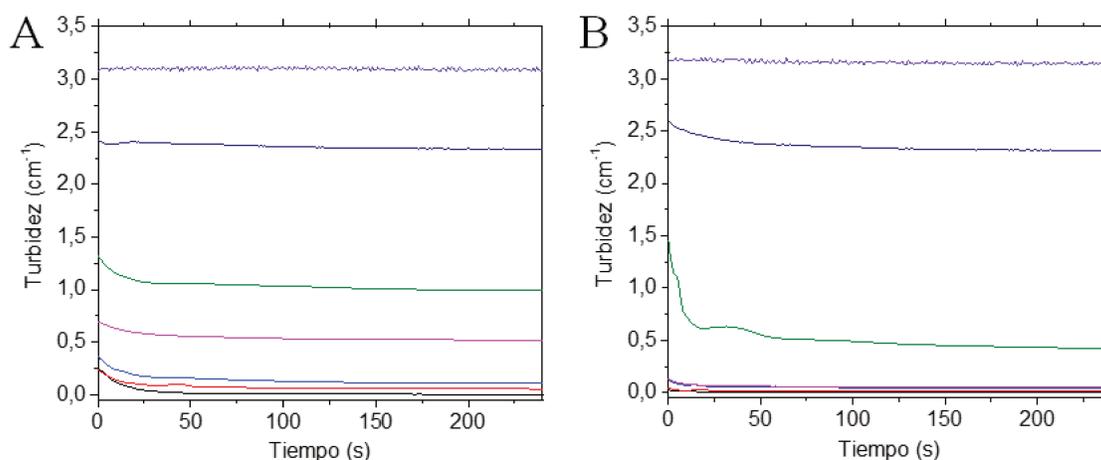


Figura 12. Efecto de la concentración de A) AEO y B) AET sobre la cinética de solubilización de gotas de emulsión madre en soluciones de Tween 80 al 1% (p/p). Concentraciones (% p/p): (—) 0,05; (—) 0,1; (—) 0,15; (—) 0,2; (—) 0,25; (—) 0,5; (—) 1. Condiciones: pH 6, temperatura: 25°C.

4.2.2. Distribución de tamaño de partículas

La distribución de tamaño de partículas se determinó para los sistemas SMs-1 y SMs-2 cargados con AEO y AET (Tablas 2 y 3). Los perfiles PSDi se presentan en la Figura 13. La PSDv fue monomodal (volumen de 100%) tanto para SMs-1 como para SMs-2. El análisis de tamaño de partícula se realizó para los sistemas SMs-1 cargados con AEO y AET a 1, 7, 14 y 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C) y diferentes SOR (Tabla 2 y Figura 13A). Para los sistemas SMs-1 cargados con AEO se obtuvieron valores de d_H entre 24 y 68 nm. Además, a 1 día de almacenamiento, se observó un incremento en el tamaño de partícula con el aumento del

SOR. En cuanto al tamaño de partícula de los SMs-1 cargados con AET, el d_H osciló entre 28 y 57 nm a 1 día de almacenamiento, sin que exista una clara tendencia entre el tamaño de partícula y el aumento del SOR. Del mismo modo, [Sedaghat Doost y col. \(2020\)](#) no encontraron una relación clara entre el tamaño de partícula y el SOR para los SMs cargados con AEO y *trans*-cinamaldehído. Asimismo, [Saberí y col. \(2013\)](#) no establecieron una correlación directa entre el tamaño de partícula y los valores de SOR para sistemas formulados con vitamina E y triglicéridos de cadena media como fase oleosa, y diferentes moléculas de Tween (20, 60, 80 y 85) como tensioactivos. Además, demostraron que las partículas más pequeñas ($d_H \sim 55$ nm) se obtuvieron utilizando Tween 80 como tensioactivo.

Por otra parte, se observó que, para ambos AEs y a cada SOR, se produjo un incremento significativo en el tamaño de partícula tras 30 días de almacenamiento. Este aumento fue muy variable para cada AE y SOR, pero estuvo comprendido entre 0,2 y 3 veces mayor en comparación con el tamaño observado a 1 día de almacenamiento. Este resultado fue similar a los hallazgos reportados por [Saberí y col. \(2013\)](#), quienes registraron un aumento significativo en el tamaño de partícula para el sistema vitamina E-Tween 80 después de 60 días de almacenamiento. Analizando la apariencia visual de los sistemas SMs-1 ([Figura 11A](#)), se observó que para ambos AEs y durante 1 y 7 días de almacenamiento, el aspecto de los mismos fue blanco y opaco, con regiones translúcidas, destacándose su heterogeneidad. Posteriormente, a los 14 y 30 días de almacenamiento, las muestras se volvieron más blancas y homogéneas, lo que concuerda con el aumento observado en el tamaño de partícula, especialmente a SOR 1 ([Tabla 2](#)).

Estos resultados sugerirían la presencia de SMs saturados con AE, incapaces de solubilizar todo el AE adicionado. Como consecuencia, es probable que parte del AE añadido se haya dispersado en forma de gotas, favoreciendo el aumento del d_H y la desestabilización (separación de fases) con el tiempo de almacenamiento, posiblemente debido a mecanismos como floculación, coalescencia y maduración de Ostwald ([Rao y McClements, 2012](#); [Saberí y col., 2013](#)).

Tabla 2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el d_H (nm) de los SMS-1 cargados con AEO y AET a diferentes SOR. Condiciones: pH 6, temperatura: 25°C. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). Se aplicó la prueba LSD para cada SOR.

Tamaño (d_H) de SMS-1 cargados con AEO (nm)				
SOR (p/p)	Tiempo de almacenamiento (días)			
	1	7	14	30
0,05	24,0 \pm 2,7 ^a	33,2 \pm 0,2 ^{a,b}	40,1 \pm 10,0 ^b	52,3 \pm 6,7 ^c
0,10	38,3 \pm 10,3 ^a	39,7 \pm 5,7 ^a	48,5 \pm 4,2 ^a	68,4 \pm 7,0 ^b
0,25	62,9 \pm 0,4 ^a	69,1 \pm 3,1 ^a	84,2 \pm 8,1 ^b	98,5 \pm 8,6 ^c
0,50	65,5 \pm 3,7 ^a	69,2 \pm 2,0 ^a	70,6 \pm 3,6 ^a	86,8 \pm 6,2 ^b
1,00	68,2 \pm 1,3 ^a	92,0 \pm 11,9 ^b	101 \pm 7,7 ^b	117,5 \pm 0,9 ^c
Tamaño (d_H) de SMS-1 cargados con AET (nm)				
0,05	28,1 \pm 3,9 ^a	35,5 \pm 11,2 ^{a,b}	44,4 \pm 1,7 ^b	70,7 \pm 12,4 ^c
0,10	56,8 \pm 4,4 ^b	46,1 \pm 0,4 ^a	50,2 \pm 9,5 ^{a,b}	70,1 \pm 2,1 ^c
0,25	50,3 \pm 1,9 ^a	52,1 \pm 4,0 ^{a,b}	56,2 \pm 0,2 ^{b,c}	58,5 \pm 0,0 ^c
0,50	41,3 \pm 8,9 ^a	47,0 \pm 2,4 ^{a,b}	52,7 \pm 3,6 ^{b,c}	56,4 \pm 0,4 ^c
1,00	44,3 \pm 1,7 ^a	96,2 \pm 3,1 ^b	124 \pm 31 ^{b,c}	134,5 \pm 10,1 ^c

d_H : diámetro hidrodinámico

Como se ha mencionado anteriormente, para los sistemas SMS-2, alícuotas de emulsión madre se titularon en una solución de Tween 80 (1% p/p), dando lugar a SMS con concentraciones finales de AEO y AET comprendidas entre 0,0125 y 3% (p/p). La [Figura 11B](#) muestra la apariencia visual de estos sistemas a 1, 7, 14 y 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C). El tamaño de partícula de los sistemas SMS-2 se determinó para concentraciones de AE comprendidas entre 0,0125 y 0,25% (p/p) a 1, 7, 14 y 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente ([Tabla 3](#) y [Figura 13B](#)). El tamaño de partícula de los sistemas SMS-2 con una concentración de AE superior a 0,5% (p/p) no se determinó debido a que los tubos carecían de regiones translúcidas luego de 1 día de almacenamiento. Además, se midió el d_H de los SMS vacíos (Tween 80 al 1%

p/p), siendo éste $10,1 \pm 0,5$ nm. En la [Tabla 3](#), se puede observar que la adición de AEO o AET a los SMs dio lugar a un ligero aumento del d_H . Estos resultados sugieren que los AEs fueron encapsulados con éxito en los SMs-2. El aumento del d_H de los SMs tras encapsular AE dentro de las estructuras micelares ha sido reportado previamente ([Deng y col., 2016](#); [Gaysinsky y col., 2008](#)).

Los sistemas SMs-2 cargados con AEO y AET a 1 día de almacenamiento, presentaron un valor de d_H comprendido entre 10,3 y 16,9 nm, y entre 8,5 y 12,4 nm, respectivamente ([Tabla 3](#)). Además, no se observó una relación directa entre el tamaño de partícula y la concentración de AE a 1 día de almacenamiento. Por otro lado, al estudiar la estabilidad en el tiempo de los SMs-2, la mayoría de los sistemas cargados con AEO no mostraron diferencias significativas en el tamaño de partícula durante los 14 días de almacenamiento ([Tabla 3](#) y [Figura 13B](#)). Sin embargo, a los 30 días de almacenamiento, se observó un aumento significativo del tamaño de partícula en la mayoría de estos sistemas, alcanzando valores entre 50 y 141 nm. Contrariamente, la mayoría de los SMs-2 cargados con AET permanecieron estables, ya que no hubo diferencias significativas en el tamaño de partícula a los 30 días de almacenamiento ([Tabla 3](#) y [Figura 13B](#)). No obstante, algunos SMs-2 cargados con AET mostraron un ligero aumento del tamaño de partícula durante el almacenamiento, pero todos los valores de d_H estuvieron próximos a los 10-14 nm, incluso a los 30 días de almacenamiento.

Tabla 3. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el d_H (nm) de los sistemas SMs-2 cargados con diferentes concentraciones de AEO y AET (% p/p). Condiciones: pH 6, temperatura: 25°C. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). Se aplicó la prueba LSD para cada concentración.

AE (% p/p)	Tamaño (d_H) de SMs-2 cargados con AEO (nm)			
	Tiempo de almacenamiento (días)			
	1	7	14	30
0,0125	$10,3 \pm 0,7^a$	$10 \pm 1,2^a$	$9,3 \pm 0,1^a$	$9,7 \pm 0,3^a$
0,0250	$11,2 \pm 1,2^{a,b}$	$10,4 \pm 0,3^a$	$10,3 \pm 0,5^a$	$11,8 \pm 0,6^b$

0,0500	11,1 ± 1,4 ^a	10,6 ± 0,6 ^a	12,9 ± 3,7 ^a	13,1 ± 3,3 ^a
0,0750	11,9 ± 0,3 ^a	13,8 ± 0,2 ^a	18,4 ± 4,5 ^b	20,5 ± 1,8 ^b
0,1000	16,9 ± 0,8 ^a	16,5 ± 0,9 ^a	19,7 ± 1,2 ^b	53,1 ± 3,6 ^c
0,1250	15,8 ± 2,5 ^a	20,1 ± 1,7 ^a	23,4 ± 4,4 ^a	85,3 ± 12,1 ^b
0,1500	14,8 ± 1,5 ^a	16,5 ± 1,5 ^a	14,3 ± 5,3 ^a	98,3 ± 6,6 ^b
0,2000	11,4 ± 0,7 ^a	12,4 ± 0,0 ^a	14,3 ± 0,2 ^a	140,9 ± 16,7 ^b
Tamaño (d _H) de SMs-2 cargados con AET (nm)				
0,0125	8,5 ± 0,0 ^a	9,7 ± 0,0 ^b	10,9 ± 0,2 ^c	10,8 ± 0,6 ^c
0,0250	10,4 ± 0,5 ^a	10,3 ± 0,7 ^a	10,9 ± 1,2 ^a	11,4 ± 0,2 ^a
0,0500	12,0 ± 1,2 ^a	11,3 ± 0,3 ^a	11,6 ± 0,5 ^a	11,7 ± 0,8 ^a
0,0750	11,7 ± 0,0 ^b	10,7 ± 0,1 ^a	11,9 ± 0,3 ^b	11,7 ± 0,3 ^b
0,1000	12,0 ± 0,1 ^a	11,4 ± 0,4 ^a	11,6 ± 0,4 ^a	11,5 ± 0,7 ^a
0,1250	12,4 ± 0,4 ^a	11,8 ± 0,2 ^a	12,1 ± 0,1 ^a	12,5 ± 0,6 ^a
0,1500	11,7 ± 0,0 ^a	11,6 ± 0,1 ^a	14,1 ± 0,2 ^c	13,7 ± 0,2 ^b
0,2000	11,5 ± 0,4 ^a	11,4 ± 0,4 ^a	13,9 ± 0,5 ^b	13,4 ± 0,1 ^b
0,2500	11,9 ± 0,1 ^a	11,9 ± 0,5 ^a	12,5 ± 0,7 ^a	13,9 ± 0,2 ^b

d_H: diámetro hidrodinámico

Los resultados de tamaño de partícula concordaron con la apariencia visual de los SMs-2 (Figura 11B), detectándose un aumento de la turbidez de los SMs-2 cargados con AEO durante el tiempo de almacenamiento, particularmente a los 30 días. Por el contrario, los SMs-2 cargados con AET no mostraron cambios en la turbidez durante el tiempo de almacenamiento evaluado.

El aumento en la magnitud de d_H y en la turbidez de los SMs-2 cargados con AEO observado particularmente a los 30 días, podría estar relacionado con la ubicación del AE dentro de los SMs. Algunos compuestos, en función de su estructura química, pueden orientarse próximos a la interfase, desplazando de la superficie a los tensioactivos/cosurfactantes y promoviendo un aumento del tamaño de partícula (Bergonzi y col., 2014). Rao y McClements (2012) obtuvieron SMs cargados con AE de limón y sugirieron que, por debajo de la C_{sat}, el tamaño de partícula aumentó debido a que el AE se localizó entre las moléculas de surfactante en lugar de orientarse

en el núcleo micelar. Teniendo en cuenta lo propuesto por estos autores, es probable que el AEO se haya ubicado próximo a la interfase, favoreciendo procesos como la difusión de aceite o la atracción entre micelas durante el almacenamiento. En este sentido, el modo de unión, la estructura, composición química y la orientación de los principales componentes de los AEs dentro de las micelas de tensioactivo pueden ser diferentes, y todos estos factores podrían influir en el tamaño de partícula de los sistemas SMs-2.

En resumen, los sistemas SMs-2 fueron más pequeños (próximos a 10 nm) y estables a lo largo del tiempo en comparación con los sistemas SMs-1. Tras 30 días de almacenamiento, el tamaño de los sistemas SMs-1 fue superior a 50-60 nm, mientras que el tamaño de la mayoría de los SMs-2 estuvo comprendido entre 10 y 15 nm, revelando una considerable estabilidad coloidal. Las diferencias en el tamaño de partícula y la estabilidad coloidal de los SMs cargados con AE podrían atribuirse a los distintos aportes de energía mecánica aplicados durante sus procesos de obtención. El método SMs-2 implicó una primera homogeneización usando alta velocidad y elevada intensidad de fuerzas de cizallamiento para crear gotas de AE pequeñas y dispersas uniformemente, seguida de un proceso de titulación, lo que dio lugar a micelas pequeñas coloidalmente estables. Por su parte, el método SMs-1 involucró un proceso de autoensamblaje que no proporcionó suficiente energía para dispersar eficientemente los AEs, dando lugar a sistemas compuestos por SMs saturados con AE y gotas de AE dispersas.

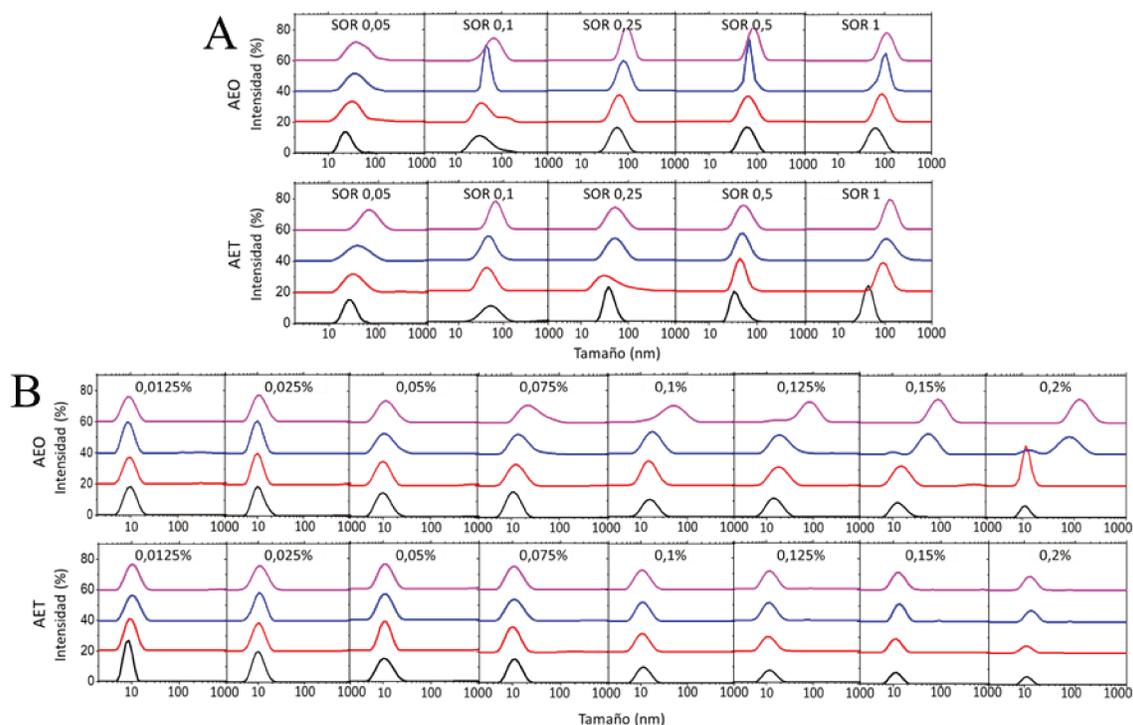


Figura 13. PSDi (%) de (A) SMs-1 cargados con AEO y AET a diferentes SOR y (B) SMs-2 cargados con diferentes concentraciones de AEO y AET (% p/p), en el día 1 (—), día 7 (—), día 14 (—) y día 30 (—) de almacenamiento. Condiciones: pH 6, temperatura 25°C.

4.2.3. Eficiencia de encapsulación

La EE se determinó a 1, 7, 14 y 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C) para los sistemas SMs-1 y SMs-2 cargados con AEO y AET (Tabla 4 y Tabla 5, respectivamente). A pesar de que numerosos autores han estudiado la EE de SMs en función de la concentración de aceite, tensioactivos, cosurfactantes y agua, aún no se ha realizado un estudio exhaustivo de la EE de los SMs a lo largo del tiempo (Ponce Ponte y col., 2022; Sedaghat Doost y col., 2020; Wang y Gao, 2018).

Se determinó la EE de los SMs-1 cargados con AEO y AET a diferentes SOR (Tabla 4). Para ambos AEs, los valores de EE dependieron de la magnitud de SOR y no mostraron una relación clara entre ellos a 1 día de almacenamiento. En el caso de los SMs-1 cargados con AEO,

los valores de EE encontrados fueron superiores a los de los SMs-1 cargados con AET, oscilando entre el 68% y el 86%. En el caso de los SMs-1 cargados con AET, el valor más bajo de EE fue de 20% para SOR 0,5, y el más alto de 66% para SOR 0,05. Si bien algunos autores han reportado que un aumento en SOR puede favorecer una mayor EE, debido a la mayor disponibilidad de micelas para incorporar AE, en este estudio no se evidenció tal comportamiento (Sedaghat Doost y col., 2020). De forma similar, Wang y Gao (2018) evaluaron diferentes proporciones de tensioactivo/cosurfactante/aceite y no encontraron una correlación clara entre el parámetro EE y los valores de SOR. El análisis de la EE para cada SOR después de 30 días de almacenamiento reveló que, para ambos AEs, se mantuvo igual o disminuyó. Este comportamiento podría ser una consecuencia de la separación de fases, promovida por mecanismos de desestabilización como la maduración de Ostwald y/o coalescencia (Walker y col., 2015).

Tabla 4. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la eficiencia de encapsulación (%) de SMs-1 cargados con AEO y AET de diferentes SOR. Condiciones: pH 6, temperatura: 25°C. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). Se aplicó la prueba LSD para cada SOR.

EE de SMs-1 cargados con AEO (%)				
SOR (p/p)	Tiempo de almacenamiento (días)			
	1	7	14	30
0,05	86,0 \pm 1,3 ^c	77,2 \pm 0,6 ^b	72,7 \pm 1,8 ^b	76,7 \pm 1,0 ^a
0,1	77,5 \pm 6,2 ^{a,b}	83,2 \pm 1,4 ^b	80,0 \pm 2,5 ^b	70,0 \pm 6,0 ^a
0,25	77,7 \pm 1,4 ^b	81,2 \pm 0,4 ^c	76,2 \pm 2,0 ^{a,b}	74,4 \pm 1,9 ^a
0,5	73,0 \pm 0,5 ^a	77,8 \pm 2,5 ^a	73,8 \pm 3,2 ^a	76,1 \pm 3,6 ^a
1	68,6 \pm 7,6 ^a	77,0 \pm 2,0 ^a	74,4 \pm 1,1 ^a	67,9 \pm 12,4 ^a
EE de SMs-1 cargados con AET (%)				
0,05	65,9 \pm 26,6 ^b	57,7 \pm 5,1 ^b	57,9 \pm 14,8 ^b	20,5 \pm 15,8 ^a
0,1	50,2 \pm 5,9 ^a	63,3 \pm 5,2 ^a	49,1 \pm 27,5 ^a	44,5 \pm 22,5 ^a
0,25	27,3 \pm 20,5 ^a	43,7 \pm 0,2 ^a	23,0 \pm 19,6 ^a	24,2 \pm 12,6 ^a
0,5	19,9 \pm 0,8 ^c	11,5 \pm 0,2 ^a	24,9 \pm 2,3 ^d	14,7 \pm 0,5 ^b

1	30,6 ± 11,0 ^a	29,5 ± 9,2 ^a	18,6 ± 1,4 ^a	20,4 ± 9,5 ^a
---	--------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

EE: eficiencia de encapsulación

Por otro lado, se determinó la EE de los SMS-2 cargados con AEO y AET (Tabla 5), obteniéndose valores de EE elevados, en torno al 88% para ambos AEs y para todas las concentraciones evaluadas a 1 día de almacenamiento. Además, los valores de EE de los sistemas SMS-2 fueron superiores a los de SMS-1 desde el primer día de almacenamiento. De forma similar, Chen y Chen (2018) obtuvieron micelas de Tween 80/etanol para encapsular curcuminoide, obteniendo un d_H de 11 nm y una EE de 86%.

A los 30 días de almacenamiento, la mayoría de los sistemas SMS-2 cargados con AEO no mostraron diferencias significativas en los valores de EE. En el caso de los SMS-2 cargados con AET, la EE aumentó o permaneció sin diferencias significativas. El distinto comportamiento observado para los SMS-2 cargados con AEO y AET podría deberse a diferencias en la estructura molecular de los componentes de los AEs, lo que influiría en su localización dentro de la estructura micelar (Deng y col., 2016). En este contexto, es probable que el AET requiera más tiempo para reorganizarse dentro del SMS-2 en comparación con el AEO. Además, cabe destacar que es termodinámicamente favorable que los SMS incorporen y solubilicen AE dentro de su estructura hasta que se saturan. Esta fuerza impulsora de origen termodinámico resulta de la reducción de la energía libre del sistema, atribuida a la optimización de la curvatura de la monocapa de tensioactivo y a la disminución del área de contacto entre las fases hidrofóbica e hidrofílica (Deng y col., 2016; Rao y McClements, 2012).

Tabla 5. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la eficiencia de encapsulación (%) de SMS-2 cargados con diferentes concentraciones de AEO y AET (% p/p). Condiciones: pH 6, temperatura: 25°C. Los valores se muestran como media ± desviación estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). Se aplicó la prueba LSD para cada concentración.

EE de SMS-2 cargados con AEO (%)

AE (% p/p)	Tiempo de almacenamiento (días)			
	1	7	14	30
0,0125	86,2 ± 1,3 ^a	88,1 ± 1,4 ^a	88,3 ± 2,9 ^a	87,3 ± 0,8 ^a
0,0250	87,5 ± 1,3 ^a	87,9 ± 0,7 ^a	88,2 ± 1,0 ^a	88,1 ± 1,1 ^a
0,0500	87,9 ± 1,1 ^a	87,7 ± 1,6 ^a	88,0 ± 1,6 ^a	88,3 ± 1,3 ^a
0,0750	87,9 ± 0,4 ^a	87,8 ± 0,3 ^a	88,1 ± 0,2 ^{a,b}	88,6 ± 0,4 ^b
0,1000	88,4 ± 0,5 ^a	88,3 ± 0,7 ^a	88,7 ± 0,5 ^a	88,9 ± 0,6 ^a
0,1250	87,4 ± 0,3 ^a	87,3 ± 0,1 ^a	87,7 ± 0,3 ^a	87,9 ± 0,5 ^a
0,1500	88,6 ± 0,3 ^a	88,7 ± 0,2 ^{a,b}	89,0 ± 0,1 ^b	88,9 ± 0,2 ^b
0,2000	88,8 ± 0,3 ^a	88,8 ± 0,5 ^a	88,9 ± 0,5 ^a	89,0 ± 0,5 ^a
EE de SMs-2 cargados con AET (%)				
0,0125	77,0 ± 1,0 ^a	90,6 ± 0,3 ^b	91,0 ± 2,0 ^{b,c}	92,8 ± 0,2 ^c
0,0250	82,7 ± 0,4 ^a	90,3 ± 0,6 ^b	91,2 ± 0,4 ^c	91,0 ± 0,1 ^{b,c}
0,0500	86,1 ± 0,2 ^a	89,7 ± 0,1 ^b	90,7 ± 0,0 ^c	90,6 ± 0,3 ^c
0,0750	87,8 ± 0,3 ^a	90,3 ± 0,1 ^b	90,7 ± 0,2 ^{b,c}	91,0 ± 0,6 ^c
0,1000	88,5 ± 0,2 ^a	90,3 ± 0,4 ^b	90,9 ± 0,0 ^c	90,7 ± 0,4 ^{b,c}
0,1250	89,0 ± 1,0 ^a	90,4 ± 0,1 ^a	90,7 ± 0,1 ^a	90,7 ± 0,1 ^a
0,1500	90,4 ± 0,1 ^a	90,5 ± 0,1 ^a	90,7 ± 0,4 ^a	90,4 ± 0,0 ^a
0,2000	88,0 ± 5,0 ^a	90,6 ± 0,0 ^a	91,2 ± 0,0 ^a	91,0 ± 0,0 ^a
0,2500	90,9 ± 0,0 ^a	90,8 ± 0,1 ^a	90,9 ± 0,2 ^a	91,3 ± 0,1 ^b

EE: eficiencia de encapsulación

En conclusión, la EE para SMs-1 fue inferior a la de los sistemas SMs-2. Además, en los SMs-1 (principalmente los SMs-1 cargados con AET) no se pudo encapsular una gran cantidad de AE, esto refuerza la hipótesis de que los SMs-1 están constituidos tanto por SMs como por gotas de AE dispersas. Por el contrario, los sistemas SMs-2 fueron más eficientes porque la mayor parte de los AEs añadidos se incorporaron en la estructura micelar y la EE no disminuyó durante los 30 días de almacenamiento. El paso de homogeneización de alta energía implicado en el método SMs-2 dispersó eficazmente los AEs y facilitó su incorporación en las micelas de surfactante

durante el proceso de titulación. Como resultado, los sistemas SMs-2 presentaron valores de EE más elevados, ya que una mayor proporción de los AEs fue efectivamente encapsulada dentro de la estructura micelar.

4.2.4. Microscopía de fuerza atómica

Las características morfológicas y ultraestructurales de los SMs vacíos, SMs-1 y SMs-2 cargados con AEO y AET se determinaron mediante AFM (Figura 14). Las imágenes topográficas de AFM de los SMs vacíos mostraron partículas de forma esférica (Figura 14A). Por otro lado, los sistemas SMs-1 cargados con AEO (Figura 14B) y AET (Figura 14C) dieron como resultado imágenes topográficas de partículas redondeadas con alta heterogeneidad, aglomeración y tamaño variable. Por el contrario, las imágenes de los sistemas SMs-2 cargados con AEO (Figura 14D) y AET (Figura 14E) exhibieron partículas esféricas, de menor tamaño y distribución homogénea.

Por otra parte, los tamaños de partícula de los distintos sistemas medidos por AFM no se correspondieron totalmente con las mediciones de DLS. Estas diferencias fueron esperables considerando que las muestras se secaron al vacío, lo que podría haber aplastado a las partículas sobre la superficie de mica (Arzeni y col., 2015).

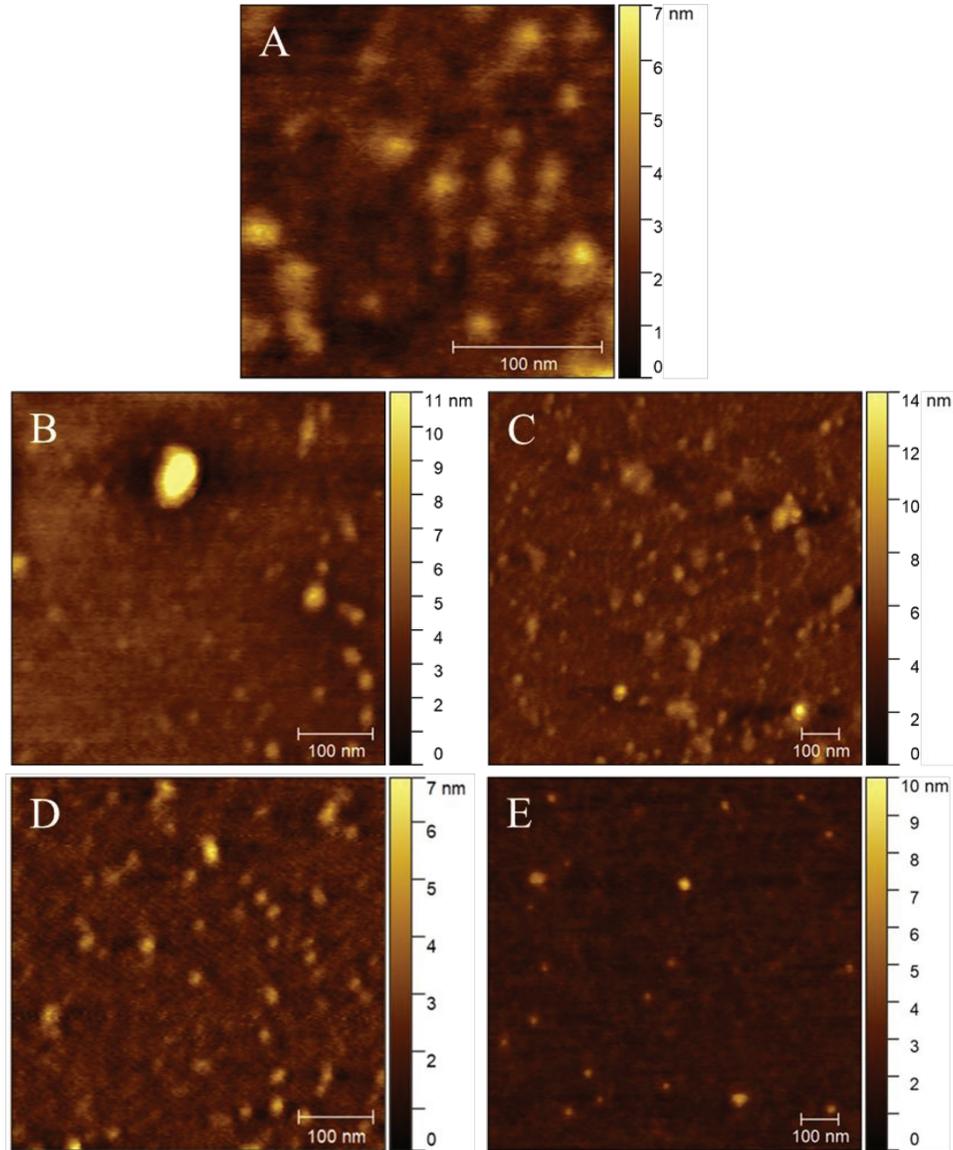


Figura 14. Imágenes topográficas de AFM de (A) SMs vacíos, (B) sistema SMs-1 cargado con AEO a SOR 0,1, (C) sistema SMs-1 cargado con AET a SOR 0,1, (D) sistema SMs-2 cargado con AEO a C_{sat} (0,17% p/p) y (E) sistema SMs-2 cargado con AET a C_{sat} (0,21% p/p). Condiciones: pH 6, temperatura: 25°C.

Los resultados obtenidos de los ensayos de apariencia visual, tamaño de partícula, EE, estabilidad frente al almacenamiento y morfología (AFM) permitieron seleccionar al método SMs-2 como el más eficiente. Este método produjo SMs de pequeño d_H , alta EE, morfología

esférica y homogénea, y de una destacada estabilidad durante el almacenamiento. Por estos resultados, se seleccionaron los SMs-2 para su evaluación en los ensayos posteriores de la presente tesis.

4.2.5. Microscopía electrónica de transmisión

Los SMs vacíos y los sistemas SMs-2 cargados con AEO y AET se analizaron mediante TEM, lo que permitió obtener imágenes de alta resolución y confirmar la formación de estructuras micelares (Figura 15). Al igual que en las imágenes de AFM, se observó que los sistemas presentaron una morfología esférica y distribución homogénea. Además, el tamaño de partícula tanto de los SMs vacíos como de los SMs-2 cargados con AEO y AET, no se correspondieron con las mediciones DLS. Es importante destacar que en TEM la etapa de secado durante la preparación de las muestras comprende un paso crítico donde puede modificarse el tamaño de partícula. Por lo tanto, el tamaño de partícula obtenido de las imágenes TEM podría no ser representativo (Dieckmann y col., 2009).

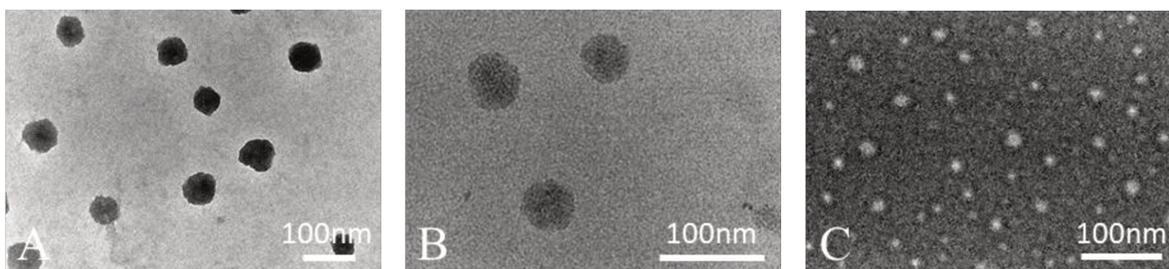


Figura 15. Micrografías TEM de (A) micelas de Tween 80 vacías, (B) SMs-2 cargados con AEO a la C_{sat} (0,17% p/p) y (C) SMs-2 cargados con AET a la C_{sat} (0,21% p/p).

4.2.6. Estabilidad fisicoquímica

Se evaluó la estabilidad de los SMs-2 cargados con AEO y AET frente a la temperatura, fuerza iónica, pH, dilución acuosa y centrifugación (Figura 16).

En relación a la evaluación de la estabilidad frente a la temperatura (Figura 16A), se observó que los SMS-2 cargados con AET permanecieron estables al ser expuestos a temperaturas de 4, 50 y 80°C durante 30 min, dado que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el tamaño de partícula antes y después del tratamiento. Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el tamaño de partícula de los SMS-2 cargados con AEO tras ser sometidos a tratamientos térmicos de 50 y 80°C durante 30 min. Sin embargo, se produjo una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en el tamaño de partícula de dichos sistemas luego de ser mantenidos a 4°C durante 30 min, disminuyendo de $11,4 \pm 0,7$ nm (muestra sin tratamiento) a $9,1 \pm 0,7$ nm. Esta ligera variación podría atribuirse a la disminución de la solubilidad y difusividad del AEO como consecuencia del descenso de temperatura, lo que posiblemente haya provocado un mayor empaquetamiento del aceite y la contracción micelar (Sedaghat Doost y col., 2017).

Respecto a la estabilidad frente a la fuerza iónica (Figura 16B), se observó un incremento significativo ($p \leq 0,05$) en el tamaño de partícula tanto para los SMS-2 cargados con AEO, que pasaron de $11,4 \pm 0,7$ nm a $14,3 \pm 2,0$ nm, como para los SMS-2 cargados con AET, que aumentaron de $11,47 \pm 0,36$ nm a $15,1 \pm 0,7$ nm, tras ser diluidos con una solución de NaCl 500 mM. Este aumento podría atribuirse a los efectos de la fuerza iónica sobre el equilibrio de las interacciones interfaciales: el incremento en la salinidad favorece las interacciones agua-electrolito, debilitando las interacciones agua-tensioactivo. Esta modificación conduciría a un aumento en la lipofilidad relativa del tensioactivo y a una disminución de la curvatura interfacial, lo que se traduce en un incremento del tamaño de partícula. A pesar de esta variación, no se observaron fenómenos de separación de fases, lo que podría explicarse por el elevado grado de etoxilación del Tween 80. Esta característica confiere al tensioactivo una alta hidrofiliidad y un elevado valor de HLB, otorgándole una mayor tolerancia frente a condiciones de alta salinidad en comparación con otros tensioactivos no iónicos de menor grado de etoxilación (Mahboob y col., 2022).

El estudio de la estabilidad frente a variaciones en el pH (Figura 16C) reveló una relación inversa entre el tamaño de partícula de los SMS-2 y el pH del medio acuoso. Específicamente, se observó un incremento significativo ($p \leq 0,05$) en el tamaño de partícula tanto para los SMS-2 cargados con AEO como para los cargados con AET, al disminuir el pH. El tamaño de los SMS-2

cargados con AEO aumentó de $7,0 \pm 0,1$ nm a $18,8 \pm 0,2$ nm, mientras que para los cargados con AET pasó de $8,7 \pm 0,2$ a $17,6 \pm 0,3$, tras el descenso del pH de 9 a 3. Este fenómeno puede explicarse considerando que en medio ácido se produce una mayor hidratación micelar. Es decir, la cantidad de agua ligada por unidad de masa de tensioactivo no iónico es mayor a medida que el pH disminuye. Por lo tanto, es probable que en medio ácido la película interfacial haya presentado una estructura más abierta, flexible y menos ordenada, que pudo haber resultado en la formación de micelas de mayor tamaño en comparación con las obtenidas en medio alcalino (H. Zhang y Kim, 2015).

En cuanto a la estabilidad frente a la dilución acuosa (Figura 16D), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el tamaño de partícula de los SMs-2 cargados con AET luego de ser diluidos 1, 10 y 20 veces (% v/v) con agua destilada, manteniéndose éste en 11 nm aproximadamente. Por otro lado, se produjo un leve pero significativo aumento ($p \leq 0,05$) en el tamaño de partícula de los SMs-2 cargados con AEO al diluir los sistemas 10 veces (v/v), pasando de $11,4 \pm 0,7$ nm en la muestra sin diluir a $12,8 \pm 0,2$ nm en la dilución 1/10 (v/v). Este comportamiento fue consistente con el hallazgo de Sedaghat Doost y col. (2020), quienes también observaron un aumento en la distribución de tamaño de partícula después de diluir SMs cargados con AEO, independientemente de la relación de dilución. Sin embargo, es importante destacar que, mientras ellos observaron incrementos cercanos a los 100 nm, en este estudio el aumento del tamaño de partícula fue mínimo, de apenas 1,4 nm.

Por último, tanto los SMs-2 cargados con AEO como aquellos cargados con AET demostraron estabilidad frente a la centrifugación a 1.000 y 3.000 rpm (Figura 16E). En el caso de los SMs-2 cargados con AEO no se observaron diferencias significativas en el tamaño de partícula ($p > 0,05$) luego de los tratamientos, mientras que para los SMs-2 cargados con AET se observó una disminución significativa en el tamaño de partícula ($p \leq 0,05$) luego de 15 min de centrifugación a 3.000 rpm. Sin embargo, cabe destacar que dicha disminución fue inferior a 1 nm respecto de la muestra sin centrifugar. Estos resultados evidencian la notable estabilidad coloidal de los SMs-2 obtenidos, considerando que la centrifugación suele inducir fenómenos de desestabilización como precipitación, cremado, floculación o separación de fases, que normalmente se reflejan en un aumento considerable del tamaño de partícula (Kang y col., 2022).

A modo de resumen, los SMs-2 exhibieron una notable estabilidad fisicoquímica, ya que en la mayoría de los casos no se observaron diferencias significativas en el tamaño de partícula luego de ser sometidos a diferentes tratamientos. El aumento más importante en el tamaño de partícula ocurrió al acidificar los sistemas (pH 3), alcanzando valores de 18,8 nm y 17,6 nm para los SMs-2 cargados con AEO y AET, respectivamente. Sin embargo, cabe señalar que estos tamaños siguen siendo característicos de sistemas coloidales estables, lo que pone de manifiesto la estabilidad estructural de los SMs-2 incluso bajo condiciones ácidas.

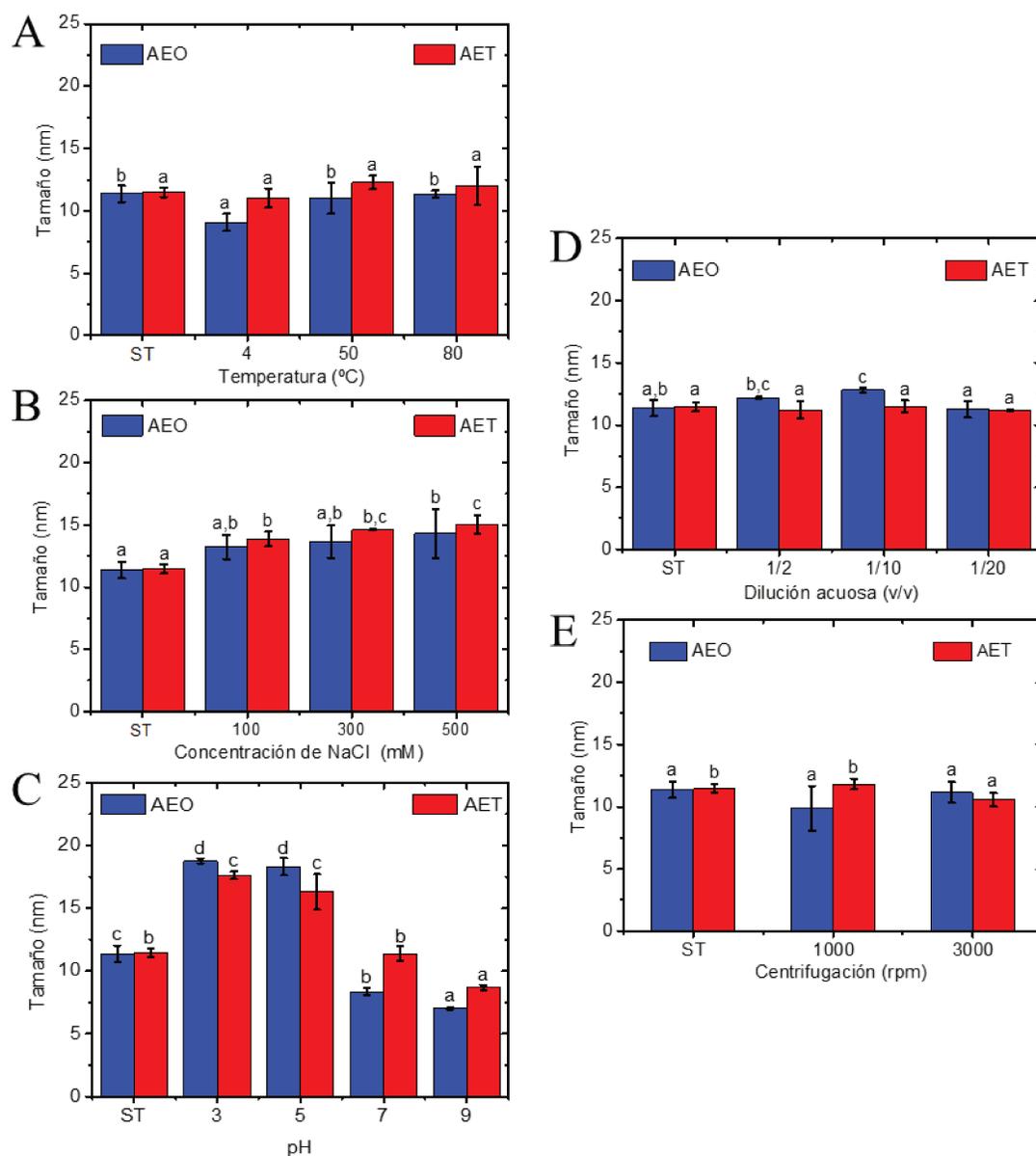


Figura 16. Estabilidad de los SMs-2 cargados con AEO y AET frente a la (A) Temperatura, (B) Fuerza iónica, (C) pH, (D) Dilución acuosa y (E) Centrifugación. ST: muestra sin tratamiento. Las barras representan la media \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$).

4.2.7. Actividad antioxidante por los métodos ABTS y Poder Reductor

La actividad antioxidante de los SMS-2 vacíos (Tween 80 1% p/p) y cargados con AEO (C_{sat} 0,17% p/p) y AET (C_{sat} 0,21% p/p) se determinó mediante los métodos ABTS y poder reductor. En primer lugar, la actividad de captación del radical ABTS⁺ fue mayor para los SMS-2 cargados con AEO que para los SMS-2 cargados con AET, registrando valores de $1,8 \pm 0,1$ y $1,5 \pm 0,0$ mg Trolox mL⁻¹, respectivamente ($p \leq 0,05$). Por el contrario, los SMS-2 cargados con AET mostraron un mayor poder reductor que los SMS-2 cargados con AEO, con valores de $0,16 \pm 0,00$ y $0,15 \pm 0,00$ mg EAA mL⁻¹, respectivamente ($p \leq 0,05$). Además, se observó que para los SMS vacíos (1% p/p), la actividad de captación del radical ABTS⁺ y el poder reductor fueron cercanos a 0 ($0,10 \pm 0,00$ mg Trolox mL⁻¹ y $0,04 \pm 0,00$ mg EAA mL⁻¹). Por lo tanto, la actividad antioxidante de los SMS-2 podría atribuirse únicamente a los AEs encapsulados.

Numerosas investigaciones han atribuido las propiedades antioxidantes de los AEs a sus componentes principales (Al-Mansori y col., 2020; Aljabeili y col., 2018; Boskovic y col., 2019). En este contexto, Al-Mansori y col. (2020) demostraron que el carvacrol (principal componente del AEO) presenta una mayor actividad de captación del radical ABTS⁺ que el timol (principal componente del AET). Este comportamiento podría atribuirse a las diferencias entre las estructuras químicas de estos compuestos, principalmente a la posición del grupo hidroxilo (Boskovic y col., 2019; Vuolo y col., 2019). Por otro lado, Yildiz y col. (2021) evaluaron la actividad antioxidante del carvacrol y el timol utilizando diferentes metodologías y demostraron que el timol presenta mayor poder reductor que el carvacrol, por lo tanto, comparativamente presenta mayor capacidad para formar complejos con iones de hierro y reducir la oxidación (Aljabeili y col., 2018).

Por último, en la bibliografía se observó una gran variabilidad en cuanto a la actividad antioxidante de los AEs debido a diferencias composicionales entre ellos y al hecho de que la misma es proporcional a la concentración de compuesto bioactivo (Rúa y col., 2019). En este sentido, se han reportado valores de captación de radical ABTS⁺ para AEO y AET puros de $176,4 \pm 0,2$ y $48,0 \pm 0,0$ mg Trolox g⁻¹, respectivamente (Aljabeili y col., 2018; Sarikurkcü y col., 2015). En cuanto al poder reductor, se encontraron valores para AEO y AET puros de $13,1 \pm 0,0$ y $25,0 \pm 0,0$ mg EAA g⁻¹, respectivamente (Aljabeili y col., 2018; Pezzani y col., 2017). Estas actividades son superiores a las obtenidas para los SMS-2 cargados con AEO y AET posiblemente porque

corresponden a AEs puros. Sin embargo, cabe destacar que, incluso a bajas concentraciones (C_{sat}) y encapsulados, los AEs presentan una considerable actividad antioxidante.

4.2.8. Actividad antifúngica

Se determinó la CIM y CFM del AEO y AET tanto libres como encapsulados en SMs-2 para *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (Tabla 6).

En el caso de los AEs libres, la CIM de AEO y AET fue de 0,5 mg/mL para todas las especies de *Candida* evaluadas. Sin embargo, este comportamiento se modificó al encapsular los AEs en SMs-2 ya que, para la mayoría de las especies de *Candida*, los SMs-2 cargados con AEO presentaron una CIM menor que los SMs-2 cargados con AET. Probablemente, dicha diferencia se deba a lo explicado anteriormente en relación a la composición química y ubicación de los AEs dentro de la estructura micelar, lo que podría influir en la disponibilidad del AE para ejercer su acción antifúngica (Bergonzi y col., 2014).

En cuanto al análisis de CFM, se observó que el AEO, tanto en su forma libre como encapsulada, presentó valores más bajos que el AET, ya que, para la mayoría de las cepas evaluadas, produjo la pérdida total de viabilidad a menor concentración que el AET. Estos resultados coinciden con los hallazgos de Soares y col. (2015), quienes obtuvieron una mayor actividad fungicida para el AEO en comparación con el AET.

Por otra parte, se observó que para ambos AEs y para la mayoría de las cepas de *Candida* evaluadas, se produjo un incremento en la CIM y CFM luego de la encapsulación de los AEs en los SMs-2. Este comportamiento podría explicarse considerando que los AEs se encuentran atrapados dentro de la estructura micelar, por lo que se hallan menos disponibles para interactuar con las células de levadura en comparación con los AEs en su forma libre.

Por último, es importante destacar que, a pesar del aumento en los valores de CIM observados, los SMs-2 cargados con AEO y AET presentaron una notable actividad antifúngica al inhibir el desarrollo de todas las cepas de *Candida* evaluadas.

Tabla 6. Valores de CIM y CFM de AEO y AET libres y encapsulados en SMs-2 para *Candida albicans* (ATCC 10231), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. glabrata* (ATCC 90030) y *C. parapsilosis* (ATCC 2219).

<i>Candida spp.</i>	AEO		SMs-2 AEO	
	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>C. albicans</i>	0,5	0,5	0,5	1
<i>C. krusei</i>	0,5	1	1	>2
<i>C. glabrata</i>	0,5	0,5	0,5	1
<i>C. parapsilosis</i>	0,5	1,5	1	>2
<i>Candida spp.</i>	AET		SMs-2 AET	
	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>C. albicans</i>	0,5	1	1	>2
<i>C. krusei</i>	0,5	1,5	2	>2
<i>C. glabrata</i>	0,5	1	0,5	>2
<i>C. parapsilosis</i>	0,5	1,5	2	>2

CIM: Concentración inhibitoria mínima. CFM: Concentración fungicida mínima.

4.2.9. Digestión gastrointestinal *in vitro*

Dado que los SMs-2 presentan un gran potencial para su incorporación en un producto alimenticio, es pertinente dilucidar el comportamiento y la liberación de AEs a nivel intestinal. Por este motivo, los SMs-2 cargados con AEO y AET se sometieron a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, que incluyó una fase gástrica seguida de una fase intestinal (Brodkorb y col., 2019; Visentini y col., 2020). Tras la digestión, se evaluaron: tamaño de partícula, estabilidad, bioaccesibilidad y actividad antioxidante de los AEs encapsulados.

➤ Distribución de tamaño de partículas

Se determinaron los perfiles PSDi de los SMs-2 vacíos y cargados con AEO (C_{sat} 0,17% p/p) y AET (C_{sat} 0,21% p/p) antes y después de la fase gástrica e intestinal (Figura 17). Como se expuso en la sección 4.2.2, previo a la digestión, el d_H de los SMs vacíos y cargados con AEO y

AET fue de $10,1 \pm 0,5$ nm (100% PSDv); $11,4 \pm 0,7$ (100% PSDv) y $11,5 \pm 0,4$ nm (100% PSDv), respectivamente. Tras la digestión secuencial gástrica (pH 3,0) e intestinal (pH 7,0), los SMS vacíos no modificaron su tamaño en comparación con su estado inicial ($10,9 \pm 0,2$ nm; 100% PSDv; $p > 0,05$). Por el contrario, tras la digestión gastrointestinal se observó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) en el tamaño de los SMS-2 cargados con AEO y AET, obteniéndose valores de d_H de 69 ± 2 nm (100% PSDv) y 58 ± 3 nm (100% PSDv), respectivamente (Figura 17). El incremento en el tamaño de los sistemas SMS-2 cargados con AEO y AET, podría indicar que los AEs están conformando micelas mixtas con las SB. Es importante destacar que para el ensayo se utilizó un extracto biliar porcino crudo, lo que generó una mayor complejidad en el sistema ya que el extracto biliar contiene SB y concentraciones variables de fosfolípidos, ácidos grasos y colesterol.

Un paso crucial en la absorción de nutrientes por parte de los enterocitos es la formación previa de micelas mixtas entre los compuestos de interés y SB, fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos (Yao y col., 2015). En este contexto, distintos autores estudiaron la formación de micelas mixtas entre Tween 80 y SB, reportando que el Tween 80 favorece la solubilización de compuestos bioactivos hidrofóbicos (Naso y col., 2022; Poša y col., 2013).

En concordancia con los resultados obtenidos en este estudio, Naso y col. (2019) y Kruger y col. (2022) hallaron que las micelas de Tween 80 no modificaron su tamaño tras la digestión gastrointestinal, manteniéndose en el entorno de los 10 nm. Además, Kruger y col. (2022) y Li y col. (2019) observaron un aumento del tamaño de las micelas cargadas con compuestos bioactivos tras la digestión gastrointestinal. Así, las micelas de Tween 80 y etanol cargadas con AE de limón, aumentaron su tamaño de 10 a 100 nm tras la digestión gastrointestinal (Li y col., 2019). Del mismo modo, las micelas de Tween 80 que encapsularon diferentes compuestos, como curcumina, quercetina y naringenina, experimentaron un aumento significativo de tamaño tras un proceso de digestión simulado (Kruger y col., 2022). Estos resultados podrían explicarse considerando que durante el proceso de digestión sería posible que se produzcan modificaciones en los SMS-2 como, por ejemplo, la incorporación de SB y/o fosfolípidos en la estructura micelar o la disociación de micelas para formar micelas fisiológicas mixtas que incluyan Tween 80 y AE.

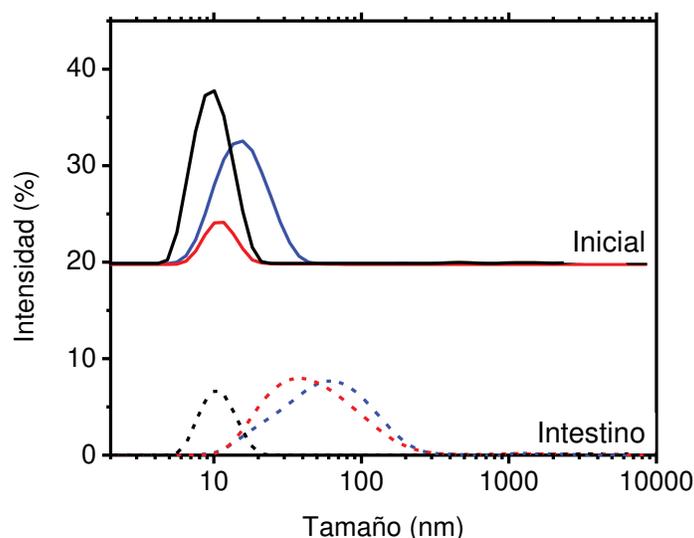


Figura 17. Distribución de tamaño de partícula basada en la intensidad (PSDi, %) de los SMs vacíos (—), SMs-2 cargados con AEO (—) y SMs-2 cargados con AET (—), antes (inicial) y después (intestino) de la digestión secuencial gástrica e intestinal *in vitro*.

➤ Estabilidad y bioaccesibilidad *in vitro*

La bioaccesibilidad *in vitro* de los AEO y AET encapsulados en SMs-2 de Tween 80 se determinó a través de un modelo de digestión gastrointestinal simulado (INFOGEST), midiendo la cantidad de AE remanente en la fase total y micelar. A partir de dichos resultados se calculó la estabilidad (E^*), bioaccesibilidad (B^*) y bioaccesibilidad efectiva (BE) (Figura 18).

Tras la digestión gastrointestinal, la concentración de AE que permaneció en forma bioactiva (E^*) fue del $93 \pm 3\%$ en el caso del AEO y del $61 \pm 3\%$ en el caso del AET. Estos resultados demuestran que prácticamente todo el AEO encapsulado en SMs-2 no se degradó en condiciones gastrointestinales. En el caso del AET, el 60% del AE encapsulado en SMs-2 permaneció estable tras la digestión, indicando que los SMs fueron capaces de proteger de manera considerable al AET de las condiciones gastrointestinales. La reducción de la estabilidad podría significar que los compuestos bioactivos del AE se liberaron de la micela o que la micela se disoció. En ambos casos, el AE habría estado expuesto al medio digestivo acuoso, donde podría haberse degradado o precipitado. La degradación de los AEs en condiciones gastrointestinales

simuladas podría ocurrir debido a los cambios de pH y a las posibles interacciones entre los compuestos bioactivos de los AEs y los componentes de los jugos digestivos, como enzimas y electrolitos (Espinosa-Sandoval y col., 2021; Gutiérrez-Grijalva y col., 2017). Por lo tanto, las diferencias entre la E* de AEO y AET podrían deberse a que algunos de los compuestos bioactivos del AET fueron más sensibles a los cambios de pH y a los componentes de los fluidos simulados. De manera similar, Kruger y col. (2022) obtuvieron micelas de Tween 80 capaces de encapsular diferentes compuestos bioactivos y observaron que la estabilidad varió considerablemente con el tipo de compuesto, obteniendo los siguientes valores: 100% para curcumina, 94% para catequina, 97% para naringenina, 75% para quercetina y 0% para palmitato de retinol. Estos resultados indican que la E* podría depender de la naturaleza química del compuesto bioactivo estudiado y sería muy variable cuando se encapsulan en SMs.

A continuación, se determinó la B* de los AEs midiendo la concentración de AEO y AET en la fase micelar después de la digestión intestinal simulada. Se asume que sólo aquellos AEs incorporados dentro de las micelas mixtas están disponibles para la absorción en el intestino delgado, es decir, son bioaccessibles (Sorasitthiyankarn y col., 2022). Como se observa en la Figura 18, los valores de B* obtenidos fueron del 100% para ambos AEs encapsulados en SMs-2, indicando que todo el AE que permaneció estable se solubilizó en la fase micelar, encontrándose disponible para su absorción.

Por último, la BE, es decir, la fracción del AE ingerido presente en la fase micelar y disponible para la absorción, fue del $94 \pm 8\%$ para el AEO y del $61 \pm 3\%$ para el AET (Figura 18). El mayor valor de BE para AEO estaría relacionado con su mayor E* en comparación con el AET.

Estos resultados evidencian que todos los compuestos de los AEs que permanecieron estables (E*) se solubilizaron posiblemente formando micelas mixtas y, por lo tanto, están disponibles para la absorción (B*). Sin embargo, la estabilidad del AET fue limitada, lo que condujo a una BE inferior en comparación al AEO. Por lo tanto, el sistema SMs-2 demostró una solubilización eficaz de los AEs, pero mostró limitaciones a la hora de proteger al AET de factores injuriantes del tracto gastrointestinal, manifestándose con un valor de estabilidad del 60%.

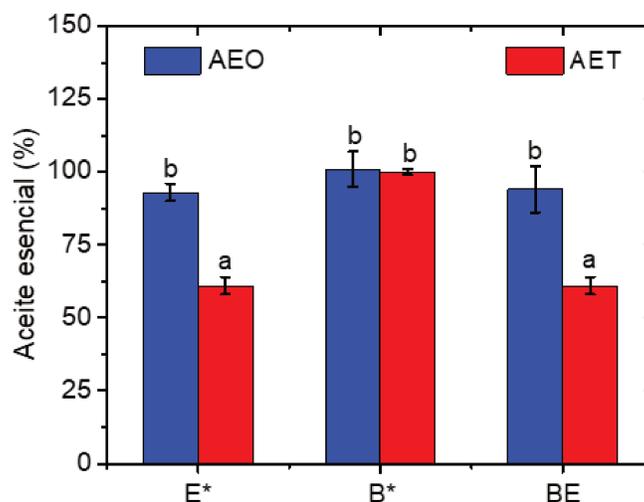


Figura 18. Valores de Estabilidad (E*), bioaccesibilidad (B*) y bioaccesibilidad efectiva (BE) de los SMS-2 cargados con AEO y AET después de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Las barras representan la media \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

➤ Actividad antioxidante de los sistemas micelares digeridos

Se determinó la actividad antioxidante del medio SIF y los SMS-2 vacíos (Tween 80 al 1% p/p), y cargados con AEO (C_{sat} 0,17% p/p) y AET (C_{sat} 0,21 % p/p) mediante los métodos ABTS⁺ y poder reductor (Figura 19). Al respecto, se observó que los SMS-2 cargados con AEO exhibieron una mayor actividad de captación del radical ABTS⁺ en comparación con los SMS-2 cargados con AET, con valores de $0,446 \pm 0,038$ y $0,343 \pm 0,032$, respectivamente ($p \leq 0,05$). Además, se obtuvieron valores de $0,027 \pm 0,005$ y $0,029 \pm 0,000$ para los SMS-2 vacíos y el medio SIF (controles), respectivamente (Figura 19A). Esto sugiere que la actividad de captación de radicales ABTS⁺ de los SMS-2, luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*, se atribuye a los AEs.

Por otro lado, los SMS-2 cargados con AEO exhibieron un mayor poder reductor que los SMS-2 cargados con AET, con valores de $0,086 \pm 0,001$ y $0,082 \pm 0,001$ mg EAA mL⁻¹, respectivamente ($p < 0,05$). En el caso de los SMS-2 vacíos y del medio SIF, el poder reductor fue de $0,038 \pm 0,001$ y $0,042 \pm 0,001$ mg EAA mL⁻¹, respectivamente ($p \leq 0,05$) (Figura 19B). La

notable actividad de los SMs vacíos y del medio SIF (controles) podría atribuirse a la presencia de SB. En este contexto, se han publicado trabajos que demuestran la actividad antioxidante de las SB. Por ejemplo, se ha comprobado que el ácido ursodesoxicólico posee propiedades antioxidantes, particularmente en presencia de iones férricos (Fe^{3+}), lo que podría contribuir al efecto observado tras la digestión de los SMs (Lapenna y col., 2002). Resultados similares se encontraron para los ácidos taurocólico y glicocólico (Sabat y col., 2021).

En la sección 4.2.7. se informaron valores de captación del radical ABTS^+ de 1,5 y 1,8 mg Trolox mL^{-1} y de poder reductor de 0,16 y 0,14 mg EAA mL^{-1} para los SMs-2 cargados con AEO y AET, respectivamente. Al comparar estos valores con los obtenidos luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*, se observó que tanto la actividad de captación del radical ABTS^+ como el poder reductor, disminuyeron después de la digestión. No obstante, es importante señalar que durante la digestión los sistemas fueron diluidos cuatro veces con los fluidos digestivos, por lo que los valores obtenidos son comparables con los iniciales (sección 4.2.7), lo que sugiere que no habría una degradación significativa de los compuestos bioactivos a lo largo de la digestión.

Numerosas investigaciones han demostrado la actividad antioxidante de los AEs, ya sea en forma libre (Aebisher y col., 2021; Radünz y col., 2021; Sidiropoulou y col., 2022) o encapsulados en diferentes sistemas como nanoemulsiones (Sampaio y col., 2022; Tan y col., 2023), complejos de inclusión (Jo y col., 2021), nanocápsulas (Gonçalves da Rosa y col., 2020), entre otros. Sin embargo, los estudios acerca de la actividad antioxidante de los AEs tras la digestión gastrointestinal *in vitro* son escasos. Diab y col. (2022) y Gayoso y col. (2018) reportaron una ligera disminución o la ausencia de modificaciones en la actividad de captación del radical ABTS^+ de los AEs de *Melissa officinalis*, *Lavandula latifolia*, *Origanum vulgare* y *Thymbra Spicata* después de la digestión gastrointestinal *in vitro* (Diab y col., 2022; Gayoso y col., 2018).

En resumen, los resultados obtenidos demostraron que, luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*, los SMs-2 cargados con AEO y AET mantienen una elevada actividad antioxidante a nivel intestinal, principalmente por el mecanismo que involucra transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).

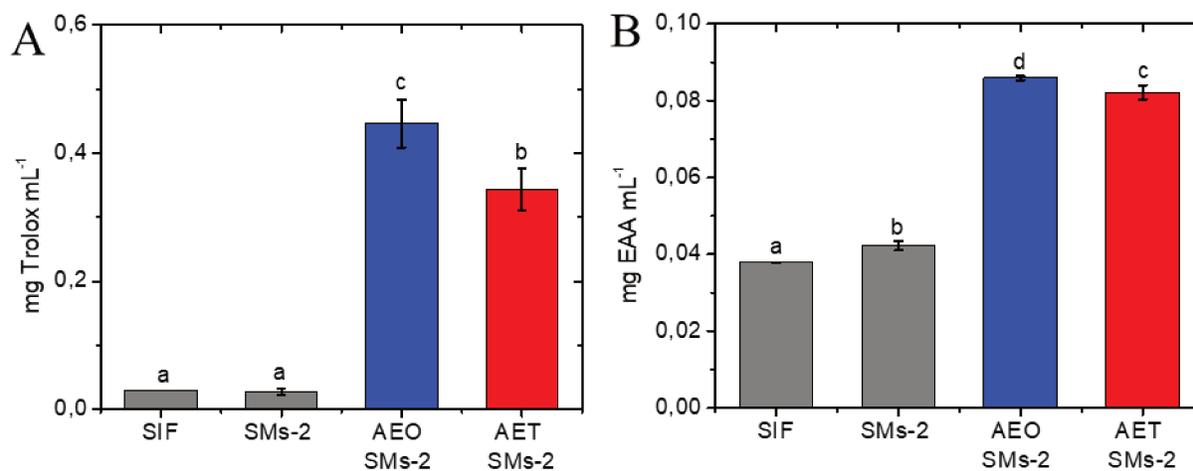


Figura 19. (A) Actividad de captación del radical ABTS⁺ (mg Trolox mL⁻¹) y (B) poder reductor (g EAA mL⁻¹) del SIF, SMs-2 vacíos y SMs-2 cargados con AEO y AET, después de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Las barras representan la media \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y discutidos en la presente tesis, se concluye que el método de obtención basado en el proceso de titulación (SMs-2) permitió desarrollar nanotransportadores estables capaces de encapsular AEO y AET. Por el contrario, el proceso de autoensamblaje (SMs-1) condujo a la formación de sistemas mixtos compuestos por SMs saturados de AE y gotas de AE dispersas. Los SMs-2 solubilizaron los AEs en menos de 50 s y presentaron una apariencia translúcida y homogénea por debajo de la C_{sat} . Además, exhibieron tamaños de partícula pequeños y uniformes, manteniendo constante o incrementando la EE durante el almacenamiento. En contraste, los SMs-1 presentaron signos visibles de inestabilidad, evidenciados por la separación de fases y la aparición de zonas blancas, opacas o turbias. Consistieron en partículas de tamaño variable, con una eficiencia de encapsulación que disminuyó en el tiempo. Las imágenes de AFM y TEM confirmaron estas diferencias, destacando la homogeneidad de los SMs-2 a nivel de nanoescala. Asimismo, los SMs-2 demostraron ser estables frente a distintas condiciones de temperatura, fuerza iónica, dilución acuosa, fuerza centrífuga y pH, lo que destaca su potencial para ser utilizados en una gran variedad de productos. Por lo tanto, el aporte de energía mecánica en los SMs-2 influyó notablemente en la formación, estabilidad coloidal y eficiencia de encapsulación de los SMs cargados con AE.

Por otro lado, los AEs encapsulados en SMs-2 exhibieron considerables propiedades biológicas. Los SMs-2 cargados tanto con AEO como con AET, presentaron actividad antifúngica contra distintas especies del género *Candida*, lo que sugiere su potencial aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales capaces de controlar el crecimiento excesivo de estas levaduras a nivel intestinal. Además, estos sistemas mostraron una marcada actividad antioxidante, incluso luego del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, tornándose prometedores para la reducción del estrés oxidativo, conocido por su incidencia en el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles. Es importante destacar, que el sistema SMs-2 protegió a los AEs de las condiciones gastrointestinales simuladas, observándose un efecto protector más eficaz con el AEO. Además, dicho sistema permitió la completa solubilización de los AEs que permanecieron estables formando micelas fisiológicas mixtas, lo que es fundamental para su absorción a nivel intestinal.

Como conclusión general, los SMS-2 demostraron ser sistemas nanométricos eficaces para la encapsulación y vehiculización de AEO y AET, presentando una notable estabilidad frente a diversas condiciones fisicoquímicas. Estas características, junto con las propiedades biológicas comprobadas, los posicionan como nanoingredientes prometedores para el desarrollo de alimentos funcionales.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebisher, D., Cichonski, J., Szpyrka, E., Masjonis, S., & Chrzanowski, G. (2021). Essential oils of seven lamiaceae plants and their antioxidant capacity. *Molecules*, 26(13), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules26133793>
- Ahmad, A., Khan, A., & Manzoor, N. (2013). Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1–2), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.09.016>
- Al-Abdaly, Y. Z., Al-Hamdany, E. K., & Al-Kennany, E. R. (2021). Toxic effects of butylated hydroxytoluene in rats. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35(1), 121–128. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2020.126435.1322>
- Al-Mansori, B., El-Ageeli, W. H., Alsagheer, S. H., & Ben-Khayal, F. A. F. (2020). Antioxidant Activity- Synergistic Effects of Thymol and Carvacrol. *Al-Mukhtar Journal of Sciences*, 35(3), 185–194. <https://doi.org/10.54172/mjsc.v35i3.271>
- Aljabeili, H. S., Barakat, H., & Abdel-Rahman, H. A. (2018). Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Thyme Essential Oil (<i>Thymus vulgaris</i>). *Food and Nutrition Sciences*, 09(05), 433–446. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.95034>
- Alshaikh, N. A., & Perveen, K. (2021). Susceptibility of fluconazole-resistant candida albicans to thyme essential oil. *Microorganisms*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122454>
- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*, 49(5), 633–649. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.996146>
- Angelo, T., Pires, F. Q., Gelfuso, G. M., da Silva, J. K. R., Gratieri, T., & Cunha-Filho, M. S. S. (2016). Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1022, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.011>

- Arzeni, C., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2015). Power Ultrasound Assisted Design of Egg Albumin Nanoparticles. *Food Biophysics*, *10*(4), 439–446. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9407-2>
- Baschieri, A., Ajvazi, M. D., Tonfack, J. L. F., Valgimigli, L., & Amorati, R. (2017). Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. *Food Chemistry*, *232*, 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.036>
- Bergonzi, M. C., Hamdouch, R., Mazzacuva, F., Isacchi, B., & Bilia, A. R. (2014). Optimization, characterization and invitro evaluation of curcumin microemulsions. *Lwt*, *59*(1), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.009>
- Berker, K. I., Demirata, B., & Apak, R. (2012). Determination of Total Antioxidant Capacity of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants In the Same Solution by Using Ferric-Ferricyanide Assay. *Food Analytical Methods*, *5*(5), 1150–1158. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9358-2>
- Bhagatwala, J., & Rao, S. S. C. (2019). Small intestinal bacterial and fungal overgrowth. In *Clinical and Basic Neurogastroenterology and Motility*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813037-7.00024-8>
- Boskovic, M., Glisic, M., Djordjevic, J., Starcevic, M., Glamoclija, N., Djordjevic, V., & Baltic, M. Z. (2019). Antioxidative Activity of Thyme (*Thymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils and Their Effect on Oxidative Stability of Minced Pork Packaged Under Vacuum and Modified Atmosphere. *Journal of Food Science*, *84*(9), 2467–2474. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14788>
- Boukhatem, M. N., Darwish, N. H. E., Sudha, T., Bahlouli, S., Kellou, D., Benelmouffok, A. B., Chader, H., Rajabi, M., Benali, Y., & Mousa, S. A. (2020). In vitro antifungal and topical anti-inflammatory properties of essential oil from wild-growing thymus vulgaris (Lamiaceae) used for medicinal purposes in algeria: A new source of carvacrol. *Scientia Pharmaceutica*, *88*(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/scipharm88030033>

- Brandt, C. C. M., Lobo, V. S., Fiametti, K. G., Wancura, J. H. C., Oro, C. E. D., & Oliveira, J. V. (2023). Rosemary essential oil microemulsions as antimicrobial and antioxidant agent in tomato paste. *Food Chemistry Advances*, 2(December 2022). <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100295>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Callender, S. P., Mathews, J. A., Kobernyk, K., & Wettig, S. D. (2017). Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 526(1–2), 425–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.005>
- Calligaris, S., Manzocco, L., Valoppi, F., Comuzzo, P., & Nicoli, M. C. (2019). Microemulsions as delivery systems of lemon oil and β -carotene into beverages: stability test under different light conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(15), 7016–7020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9973>
- Chen, Y. C., & Chen, B. H. (2018). Preparation of curcuminoid microemulsions from: *Curcuma longa* L. to enhance inhibition effects on growth of colon cancer cells HT-29. *RSC Advances*, 8(5), 2323–2337. <https://doi.org/10.1039/c7ra12297g>
- Chen, Y., Zeng, H., Tian, J., Ban, X., Ma, B., & Wang, Y. (2013). Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART8), 1175–1183. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.055467-0>
- Coimbra, A., Ferreira, S., & Duarte, A. P. (2022). Biological properties of *Thymus zygis* essential oil with emphasis on antimicrobial activity and food application. *Food Chemistry*, 393(January), 133370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133370>
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). *Candida*

- albicans - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117(December 2017), 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>
- Dávila-Rodríguez, M., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez-Corona, N., & Jiménez-Munguía, M. T. (2019). Antimicrobial activity of nanoemulsions of cinnamon, rosemary, and oregano essential oils on fresh celery. *Lwt*, 112(May), 108247. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.06.014>
- de Castro Santana, R., Fasolin, L. H., & da Cunha, R. L. (2012). Effects of a cosurfactant on the shear-dependent structures of systems composed of biocompatible ingredients. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 398, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.02.009>
- Delshadi, R., Bahrami, A., Tafti, A. G., Barba, F. J., & Williams, L. L. (2020). Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. *Trends in Food Science and Technology*, 104(July), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.004>
- Deng, L. L., Taxipalati, M., Que, F., & Zhang, H. (2016). Physical characterization and antioxidant activity of thymol solubilized Tween 80 micelles. *Scientific Reports*, 6(December), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep38160>
- Deng, L., Taxipalati, M., Sun, P., Que, F., & Zhang, H. (2015). Phase behavior, microstructural transition, antimicrobial and antioxidant activities of a water-dilutable thymol microemulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 859–866. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.031>
- Deseta, M. L. G. (2022). *DESARROLLO Y APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS NANOCOMPUESTOS PARA LA PRESERVACIÓN DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS PANIFICADOS*. Universidad Nacional del Litoral.
- Diab, F., Khalil, M., Lupidi, G., Zbeeb, H., Salis, A., Damonte, G., Bramucci, M., Portincasa, P.,

- & Vergani, L. (2022). Influence of Simulated In Vitro Gastrointestinal Digestion on the Phenolic Profile, Antioxidant, and Biological Activity of *Thymbra spicata* L. Extracts. *Antioxidants*, *11*(9). <https://doi.org/10.3390/antiox11091778>
- Dieckmann, Y., Cölfen, H., Hofmann, H., & Petri-Fink, A. (2009). Particle size distribution measurements of manganese-doped ZnS nanoparticles. *Analytical Chemistry*, *81*(10), 3889–3895. <https://doi.org/10.1021/ac900043y>
- Dontha, S. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *9*(2), 14–32. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13092>
- Esazadeh, K., Ezzati Nazhad Dolatabadi, J., Andishmand, H., Mohammadzadeh-Aghdash, H., Mahmoudpour, M., Naemi Kermanshahi, M., & Roosta, Y. (2024). Cytotoxic and genotoxic effects of tert-butylhydroquinone, butylated hydroxyanisole and propyl gallate as synthetic food antioxidants. *Food Science and Nutrition*, *July*, 7004–7016. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4373>
- Espinosa-Sandoval, L., Ochoa-Martínez, C., Ayala-Aponte, A., Pastrana, L., Gonçalves, C., & Cerqueira, M. A. (2021). Polysaccharide-based multilayer nano-emulsions loaded with oregano oil: Production, characterization, and in vitro digestion assessment. *Nanomaterials*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/nano11040878>
- Fani, M., & Kohanteb, J. (2017). In Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *22*(4), 660–666. <https://doi.org/10.1177/2156587217700772>
- Finos, M. B., Visentini, F. F., Cian, R., Fernández, J. L., Santiago, L. G., & Perez, A. A. (2024a). Nanosupplements based on protein-polysaccharide coacervates loaded with essential oils: Evaluation of antioxidant and antidiabetic properties. *Food Hydrocolloids*, *155*(December 2023). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110248>
- Finos, M. B., Visentini, F. F., Cian, R., Fernández, J. L., Santiago, L. G., & Perez, A. A. (2024b). Nanosupplements based on protein-polysaccharide coacervates loaded with essential oils:

- Evaluation of antioxidant and antidiabetic properties. *Food Hydrocolloids*, 155, 110248. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2024.110248>
- Flanagan, J., & Singh, H. (2006). Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(3), 221–237. <https://doi.org/10.1080/10408690590956710>
- Freitas, I. R., & Cattelan, M. G. (2018). Antimicrobial and Antioxidant Properties of Essential Oils in Food Systems—An Overview. In *Microbial Contamination and Food Degradation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811515-2.00015-9>
- Gayoso, L., Roxo, M., Cavero, R. Y., Calvo, M. I., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Wink, M. (2018). Bioaccessibility and biological activity of *Melissa officinalis*, *Lavandula latifolia* and *Origanum vulgare* extracts: Influence of an in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 44(January), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.003>
- Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005). Stability and antimicrobial efficiency of eugenol encapsulated in surfactant micelles as affected by temperature and pH. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1359–1366. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1359>
- Gaysinsky, S., Davidson, P. M., McClements, D. J., & Weiss, J. (2008). Formulation and characterization of phyto-phenol-carrying antimicrobial microemulsions. *Food Biophysics*, 3(1), 54–65. <https://doi.org/10.1007/s11483-007-9048-1>
- Golwala, P., Rathod, S., Patil, R., Joshi, A., Ray, D., Aswal, V. K., Bahadur, P., & Tiwari, S. (2020). Effect of cosurfactant addition on phase behavior and microstructure of a water dilutable microemulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 186(December 2019), 110736. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110736>
- Gonçalves da Rosa, C., Zapelini de Melo, A. P., Sganzerla, W. G., Machado, M. H., Nunes, M. R., Vinicius de Oliveira Brisola Maciel, M., Bertoldi, F. C., & Manique Barreto, P. L. (2020). Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus*

- vulgaris as a preservative in bread. *Food Hydrocolloids*, 99(March 2019), 105339. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105339>
- Guo, L., Fang, Y. qian, Liang, X. rui, Xu, Y. yan, Chen, J., Li, Y. hua, Fang, S., & Meng, Y. cheng. (2020). Influence of polysorbates (Tweens) on structural and antimicrobial properties for microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 590(18), 119939. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119939>
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Angulo-Escalante, M. A., León-Félix, J., & Heredia, J. B. (2017). Effect of In Vitro Digestion on the Total Antioxidant Capacity and Phenolic Content of 3 Species of Oregano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*). *Journal of Food Science*, 82(12), 2832–2839. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13954>
- Haque, E., Irfan, S., Kamil, M., Sheikh, S., Hasan, A., Ahmad, A., Lakshmi, V., Nazir, A., & Mir, S. S. (2016). Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Russian Federation)*, 85(4), 436–443. <https://doi.org/10.1134/S0026261716040093>
- He, S., Ren, X., Lu, Y., Zhang, Y., Wang, Y., & Sun, L. (2016). Microemulsification of clove essential oil improves its in vitro and in vivo control of *Penicillium digitatum*. *Food Control*, 65, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.020>
- Hu, J., Zhang, Y., Xiao, Z., & Wang, X. (2018). Preparation and properties of cinnamon-thyme-ginger composite essential oil nanocapsules. *Industrial Crops and Products*, 122(May), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.058>
- Işcan, G., Işcan, A., & Demirci, F. (2016). Anticandidal effects of thymoquinone: Mode of action determined by transmission electron microscopy (TEM). *Natural Product Communications*, 11(7), 977–978. <https://doi.org/10.1177/1934578x1601100726>
- Jahagirdar, V. L., Davane, M. S., Aradhya, S. C., & Nagoba, B. S. (2018). *Candida* species as potential nosocomial pathogens – A review. *Electronic Journal of General Medicine*, 15(2), 0–4. <https://doi.org/10.29333/ejgm/82346>

- Jalali-Jivan, M., Garavand, F., & Jafari, S. M. (2020). Microemulsions as nano-reactors for the solubilization, separation, purification and encapsulation of bioactive compounds. *Advances in Colloid and Interface Science*, 283, 102227. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102227>
- Jo, Y. J., Cho, H. S., & Chun, J. Y. (2021). Antioxidant activity of β -cyclodextrin inclusion complexes containing trans-cinnamaldehyde by DPPH, ABTS and FRAP. *Food Science and Biotechnology*, 30(6), 807–814. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00914-y>
- Kalaitzaki, A., Pouloupoulou, M., Xenakis, A., & Papadimitriou, V. (2014). Surfactant-rich biocompatible microemulsions as effective carriers of methylxanthine drugs. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.05.055>
- Kang, Z., Chen, S., Zhou, Y., Ullah, S., & Liang, H. (2022). Rational construction of citrus essential oil nanoemulsion with robust stability and high antimicrobial activity based on combination of emulsifiers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 80(November 2021), 103110. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103110>
- Kruger, J., Fink, Q., & Sus, N. (2022). Effectiveness of micellization with polysorbate 80 on the in vitro bioaccessibility of various bioactives. *Journal of Food Bioactives*, 17, 18–26. <https://doi.org/10.31665/jfb.2022.17300>
- Kumamoto, C. A., Gresnigt, M. S., & Hube, B. (2020). The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. *Current Opinion in Microbiology*, 56, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.05.006>
- Labiad, M. H., Belmaghraoui, W., Ghanimi, A., El-Guezzane, C., Chahboun, N., Harhar, H., Egea-Gilabert, C., Zarrouk, A., & Tabyaoui, M. (2022). Biological properties and chemical profiling of essential oils of *Thymus* (*vulgaris*, *algeriensis* and *broussonettii*) grown in Morocco. *Chemical Data Collections*, 37(November 2021), 100797. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2021.100797>
- Lacour, M., Zunder, T., Huber, R., Sander, A., Daschner, F., & Frank, U. (2002). The pathogenetic

- significance of intestinal *Candida* colonization - A systematic review from an interdisciplinary and environmental medical point of view. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205(4), 257–268. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00159>
- Lapenna, D., Ciofani, G., Festi, D., Neri, M., Pierdomenico, S. D., Giamberardino, M. A., & Cuccurullo, F. (2002). Antioxidant properties of ursodeoxycholic acid. *Biochemical Pharmacology*, 64(11), 1661–1667. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01391-6](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01391-6)
- Lesmes, U., & McClements, D. J. (2009). Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 20(10), 448–457. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.006>
- Li, Z. hua, Cai, M., Yang, K., & Sun, P. long. (2019). Kinetic study of d-limonene release from finger citron essential oil loaded nanoemulsions during simulated digestion in vitro. *Journal of Functional Foods*, 58(May), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.056>
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules*, 19(11), 19180–19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
- Lieu, M. D., & Dang, T. K. T. (2021). Improvement of shelf-life of mangoes by chitosan coating enriched with cinnamon oil dissolved in Tween 80 combined with ethanol. *Food Bioscience*, 44(PB), 101341. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101341>
- Lima, I. O., De Oliveira Pereira, F., De Oliveira, W. A., De Oliveira Lima, E., Menezes, E. A., Cunha, F. A., & De Fátima Formiga Melo Diniz, M. (2013). Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of Essential Oil Research*, 25(2), 138–142. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.754728>
- Liu, W., Wang, J., McClements, D. J., & Zou, L. (2018). Encapsulation of β -carotene-loaded oil droplets in caseinate/alginate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. *Journal of Functional Foods*, 40(September 2017), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.046>

- Ma, Q., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2016). Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. *International Journal of Food Microbiology*, 226, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.011>
- Mahboob, A., Kalam, S., Kamal, M. S., Hussain, S. M. S., & Solling, T. (2022). EOR Perspective of microemulsions: A review. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 208(PA), 109312. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2021.109312>
- Marlete, B. C., Isabel, M., Ana, R. M., Maacute rio, C. A. jo M., Joatilde o, R. B. de M., Maria, R. R., & Jesuacute s, J. H. (2013). Essential oils against *Candida* spp: in vitro antifungal activity of *Origanum vulgare*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(20), 2245–2250. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.1149>
- Martins, N., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Silva, S., & Henriques, M. (2014). Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia*, 177(5–6), 223–240. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9749-1>
- Masyita, A., Mustika Sari, R., Dwi Astuti, A., Yasir, B., Rahma Rumata, N., Emran, T. Bin, Nainu, F., & Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*, 13(October 2021), 100217. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719–1729. <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>
- Merenkova, S., Zinina, O., & Potoroko, I. (2022). Fermented Plant Beverages Stabilized with Microemulsion: Confirmation of Probiotic Properties and Antioxidant Activity. *Fermentation*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/fermentation8120723>
- Mori Cortés, N., Califano, A. N., & Lorenzo, G. (2019). Physical and chemical stability under environmental stress of microemulsions formulated with fish oil. *Food Research International*, 119(December 2018), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.067>

- Narang, A. S., Delmarre, D., & Gao, D. (2007). Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 345(1–2), 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.057>
- Naso, J. N., Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., & M. R. Pilosof, A. (2022). Solubilization of lipolysis products in mixed micelles is enhanced in presence of bile salts and Tween 80 as revealed by a model study (oleic acid) and emulsified chia-oil. *Food Research International*, 161(August). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111804>
- Naso, J. N., Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., & Pilosof, A. M. R. (2019). Studies on the interactions between bile salts and food emulsifiers under in vitro duodenal digestion conditions to evaluate their bile salt binding potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.024>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhella, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.006>
- Oshim, I. O., Urama, E. U., Odeyemi, O., Olise, A. N., & Odeyemi, S. (2019). In-vitro Screening of Antimicrobial Activities of *Ocimum gratissimum* on Clinical Isolates. *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.9734/sajrm/2019/v4i130095>
- Pezzani, R., Vitalini, S., & Iriti, M. (2017). Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1253–1268. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9535-z>
- Ponce Ponte, M., Bianco, M., Longhi, M., & Aloisio, C. (2022). Study and development of microemulsion formulations to increase the permeability of acyclovir. *Journal of Molecular Liquids*, 348, 118408. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118408>

- Poša, M., Ćirin, D., & Krstonošić, V. (2013). Physico-chemical properties of bile salt-Tween 80 mixed micelles in the viewpoint of regular solution theory. *Chemical Engineering Science*, 98, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.05.042>
- Pozzatti, P., Scheid, L. A., Spader, T. B., Atayde, M. L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2008). In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(11), 950–956. <https://doi.org/10.1139/W08-097>
- Pradebon Brondani, L., Alves da Silva Neto, T., Antonio Freitag, R., & Guerra Lund, R. (2018). Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Medicale*, 28(1), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.001>
- Radünz, M., Mota Camargo, T., Santos Hackbart, H. C. dos, Inchauspe Correa Alves, P., Radünz, A. L., Avila Gandra, E., & da Rosa Zavareze, E. (2021). Chemical composition and in vitro antioxidant and antihyperglycemic activities of clove, thyme, oregano, and sweet orange essential oils. *Lwt*, 138(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110632>
- Rao, J., & McClements, D. J. (2012). Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.002>
- Rehman, N., Ullah, H., Alam, S., Jan, A. K., Khan, S. W., & Tariq, M. (2017). Surface and thermodynamic study of micellization of non ionic surfactant/diblock copolymer system as revealed by surface tension and conductivity. *Journal of Materials and Environmental Science*, 8(4), 1161–1167.
- Reyes-Jurado, F., Cervantes-Rincón, T., Bach, H., López-Malo, A., & Palou, E. (2019). Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. *Industrial Crops and Products*, 131(January), 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.036>

- Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews*, 7(3), 275–297. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>
- Rienth, M., Crovadore, J., Ghaffari, S., & Lefort, F. (2019). Oregano essential oil vapour prevents *Plasmopara viticola* infection in grapevine (*Vitis Vinifera*) and primes plant immunity mechanisms. *PLoS ONE*, 14(9), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222854>
- Rúa, J., Del Valle, P., De Arriaga, D., Fernández-Álvarez, L., & García-Armesto, M. R. (2019). Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(9), 622–629. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2594>
- Sabat, M. J., Wiśniewska-Becker, A. M., Markiewicz, M., Marzec, K. M., Dybas, J., Furso, J., Pabisz, P., Duda, M., & Pawlak, A. M. (2021). Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)-lipid interactions and antioxidant properties of TUDCA studied in model of photoreceptor membranes. *Membranes*, 11(5), 1–18. <https://doi.org/10.3390/membranes11050327>
- Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 391(1), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.08.069>
- Sampaio, C. I., Bourbon, A. I., Gonçalves, C., Pastrana, L. M., Dias, A. M., & Cerqueira, M. A. (2022). Low energy nanoemulsions as carriers of thyme and lemon balm essential oils. *Lwt*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112748>
- Sarikurkcu, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., & Aktumsek, A. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.030>
- Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J. J. C., & Habibovic, P. (2018). In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models.

- European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37(2), 187–208.
<https://doi.org/10.1007/s10096-017-3089-2>
- Sedaghat Doost, A., Devlieghere, F., Stevens, C. V., Claeys, M., & Van der Meeren, P. (2020). Self-assembly of Tween 80 micelles as nanocargos for oregano and trans-cinnamaldehyde plant-derived compounds. *Food Chemistry*, 327(October 2019), 126970.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126970>
- Sedaghat Doost, A., Sinnaeve, D., De Neve, L., & Van der Meeren, P. (2017). Influence of non-ionic surfactant type on the salt sensitivity of oregano oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 525(January), 38–48.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.066>
- Shalaby, E. (2019). *Antioxidants*. IntechOpen.
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., & Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1675–1687.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6103>
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of Aspergillus niger (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>
- Sidiropoulou, E., Marugán-Hernández, V., Skoufos, I., Giannenas, I., Bonos, E., Aguiar-Martins, K., Lazari, D., Papagrigoriou, T., Fotou, K., Grigoriadou, K., Blake, D. P., & Tzora, A. (2022). In Vitro Antioxidant, Antimicrobial, Anticoccidial, and Anti-Inflammatory Study of Essential Oils of Oregano, Thyme, and Sage from Epirus, Greece. *Life*, 12(11).
<https://doi.org/10.3390/life12111783>
- Silva, V., & Pórfido, J. L. (2023). *Capítulo 8 Interacción De Lípidos Con El Agua Y Formación De Estructuras Empaquetadas*. 193–196.
- Soares, I. H., Loreto, S., Rossato, L., Mario, D. N., Venturini, T. P., Baldissera, F., Santurio, J. M.,

- & Alves, S. H. (2015). In vitro activity of essential oils extracted from condiments against fluconazole-resistant and -sensitive *Candida glabrata*. *Journal de Mycologie Medicale*, 25(3), 213–217. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.06.003>
- Sorasitthyanukarn, F. N., Muangnoi, C., Rojsitthisak, P., & Rojsitthisak, P. (2022). Chitosan oligosaccharide/alginate nanoparticles as an effective carrier for astaxanthin with improving stability, in vitro oral bioaccessibility, and bioavailability. *Food Hydrocolloids*, 124(PA), 107246. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107246>
- Sun, S., Zhang, H., Wang, X., He, S., & Zhai, G. (2018). Development and evaluation of ibuprofen loaded mixed micelles preparations for topical delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 48(September), 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.012>
- Tan, T. N., Mnocaran, Y. P. A., Ramli, M. E., Utra, U., Ariffin, F., & Yussof, N. S. (2023). Physical Properties, Antioxidant Activity, and In Vitro Digestibility of Essential Oil Nanoemulsions of Betel and Pandan Leaves. *ACS Food Science and Technology*, 3(1), 150–160. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.2c00296>
- Visentini, F. F., Perez, A. A., Baravalle, M. E., Renna, M. S., Ortega, H. H., & Santiago, L. G. (2020). In vitro gastrointestinal digestion and cytotoxic effect of ovalbumin-conjugated linoleic acid nanocomplexes. *Food Research International*, 137(April), 109381. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109381>
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>
- Walker, R. M., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING*, 164, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.04.028>
- Wang, X., & Gao, Y. (2018). Effects of length and unsaturation of the alkyl chain on the

- hydrophobic binding of curcumin with Tween micelles. *Food Chemistry*, 246(October 2017), 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.024>
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1(1), 60–69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>
- Yammine, J., Chihib, N. E., Gharsallaoui, A., Dumas, E., Ismail, A., & Karam, L. (2022). Essential oils and their active components applied as: free, encapsulated and in hurdle technology to fight microbial contaminations. A review. *Heliyon*, 8(12), e12472. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12472>
- Yao, M., McClements, D. J., & Xiao, H. (2015). Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems. *Current Opinion in Food Science*, 2, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.005>
- Yildiz, S., Turan, S., Kiralan, M., & Ramadan, M. F. (2021). Antioxidant properties of thymol, carvacrol, and thymoquinone and its efficiencies on the stabilization of refined and stripped corn oils. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 621–632. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00665-0>
- Yutani, M., Hashimoto, Y., Ogita, A., Kubo, I., Tanaka, T., & Fujita, K. I. (2011). Morphological changes of the filamentous fungus *Mucor Mucedo* and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. *Phytotherapy Research*, 25(11), 1707–1713. <https://doi.org/10.1002/ptr.3579>
- Zhang, H., & Kim, J. C. (2015). Effect of cinnamic acid on phase transition and pH-dependent release property of monoolein cubic phase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 32, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.09.014>
- Zhang, Z., Zhang, R., & McClements, D. J. (2016). Encapsulation of β -carotene in alginate-based hydrogel beads: Impact on physicochemical stability and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, 61, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.036>
- Ziani, K., Fang, Y., & McClements, D. J. (2012). Encapsulation of functional lipophilic

components in surfactant-based colloidal delivery systems: Vitamin E, vitamin D, and lemon oil. *Food Chemistry*, 134(2), 1106–1112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.027>