

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

Escuela de Ciencias

Departamento de Ciencias Químico-Biológicas

UDLAP®

Complejos de inclusión de β -ciclodextrina con aceite esencial de tomillo: Preparación, caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta la estudiante

Paulina Isabel Comett Figueroa

162333

Nanotecnología e Ingeniería Molecular

Dr. Ricardo Navarro Amador

San Andrés Cholula, Puebla.

Otoño 2022

Hoja de firmas

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta el estudiante
Paulina Isabel Comett Figueroa, 162333

Director de Tesis

Dr. Ricardo Navarro Amador

Presidente de Tesis

Dr. Aurelio López Malo Vigil

Secretario de Tesis

Dr. Sergio Alberto Bernal Chávez

**Complejos de inclusión de β -ciclodextrina con aceite esencial de tomillo: Preparación,
caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana**

Índice

1. Introducción.....	3
2. Justificación.....	4
3. Objetivos.....	5
4. Marco teórico.....	5
4.1. Aceites esenciales.....	5
4.1.1. Actividad antimicrobiana.....	7
4.1.2. Aceite esencial de tomillo.....	9
4.1.3. Aplicación en la industria alimentaria.....	10
4.2. Encapsulación y complejos de inclusión.....	12
4.3. Ciclodextrinas.....	16
4.3.1. Solubilidad.....	22
4.3.2. Propiedades termodinámicas y mecanismos en los complejos de inclusión.....	23
4.3.3. Eficiencia de encapsulación.....	25
4.3.4. Formación del complejo de inclusión.....	27
4.3.5. Beta-ciclodextrina (β -CD)	28
4.4. Métodos de encapsulación.....	29
4.5. Efecto de la encapsulación en las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales.....	41

4.6. Caracterización de los complejos de inclusión.....	43
5. Metodología.....	53
5.1. Materiales y métodos.....	53
5.2. Caracterización fisicoquímica.....	56
5.3. Estudios de actividad antimicrobiana.....	58
6. Resultados y discusión.....	60
7. Conclusiones y recomendaciones.....	76
8. Bibliografía.....	78
9. Anexos.....	126

1. Introducción

Desde el reconocimiento de la manipulación de materiales a escala atómica y molecular, el desarrollo de la nanotecnología ha abarcado diversas áreas como la medicina, la industria farmacéutica, textil y cosmética, así como la industria alimentaria y la agricultura, entre otras. Algunas aplicaciones existen desde hace muchos años, sin embargo, otros campos permanecen en procesos de investigación y desarrollo. Si bien estas tecnologías novedosas podrían ofrecer una ventaja e impacto sustanciales, aún existen algunos riesgos y seguridad para la salud y el medio ambiente que se deben considerar.

Centrándonos en la industria alimentaria, en los últimos años se ha conocido que el control del deterioro de los alimentos y las bacterias patógenas se logra principalmente mediante el control químico. No obstante, el empleo de químicos sintéticos está limitado debido a algunos aspectos no deseables que éstos abarcan, que incluyen genotoxicidad, carcinogenicidad, toxicidad aguda, teratogenicidad y lentos períodos de degradación, lo que podría generar problemas ambientales, como la contaminación (Faleiro, 2011; Arruda et al., 2022), así como una baja aceptación por parte de los consumidores. De esta forma, se ha producido una creciente demanda por parte de los clientes de alimentos frescos, duraderos, de calidad, seguros y con pocos conservantes o aditivos (Kuswandi, 2017). A raíz de esta percepción negativa sobre el uso de conservadores artificiales, recientemente, ha aumentado el interés en la industria alimentaria por utilizar antimicrobianos naturales como alternativa.

Los agentes antimicrobianos naturales se definen como sustancias naturales activas extraídas de plantas, animales o microorganismos, tales como polifenoles, flavonoides, taninos, alcaloides, terpenoides, isotiocianatos, polipéptidos y derivados oxidados de los mismos. Existen diversos factores que influyen en los diferentes efectos bacteriostáticos de

las sustancias bioactivas, como sus propiedades químicas (constante de disociación ácida, proporción hidrófoba/hidrófila, solubilidad y volatilidad), microorganismos objetivo (especies, cepas y genes), factores ambientales (pH, fuerza iónica, actividad del agua, temperatura y composición atmosférica) y propiedades de los alimentos (ingredientes y cantidad inicial de bacterias) (Gould, 1989). De esta manera, los aceites esenciales (AEs), específicamente, han surgido como candidatos a conservadores naturales debido a su fuerte y amplio espectro de actividad antimicrobiana (Burt, 2004).

2. Justificación

En los últimos años, en la industria alimentaria ha surgido el interés en la búsqueda y utilización de antimicrobianos naturales, resultado de una percepción negativa en el uso de conservadores artificiales. Los aceites esenciales (EOs) son candidatos como conservadores naturales debido a su fuerte y amplio espectro de actividades antimicrobianas. Sin embargo, existen limitaciones en su aplicación, y diversos estudios han sugerido que su encapsulación en otros compuestos, como las ciclodextrinas (CDs), podría brindar mejoras en su actividad biológica a partir de los cambios estructurales y químicos producidos en el compuesto, así como sus interacciones con el medio. Con este estudio, se esperan resultados acerca de la actividad antimicrobiana de los complejos de ciclodextrina y aceite esencial de tomillo, específicamente, con el objetivo de seguir con la aplicación de productos naturales como alternativa a aditivos artificiales no beneficios para la salud, contribuyendo al desarrollo de la seguridad alimentaria en la población.

3. Objetivos

Con base en la aplicación de productos naturales como alternativa a conservadores artificiales en los sistemas alimentarios, en este trabajo se brinda una descripción general sobre los complejos de aceites esenciales, su actividad antimicrobiana y su aplicación en la industria alimentaria, propiedades físicas y químicas de las ciclodextrinas, así como métodos de encapsulación y de caracterización. Así, los objetivos del presente estudio fueron: i) preparar complejos de inclusión de beta-ciclodextrina (β -CD) y aceite esencial de tomillo (TEO) utilizando métodos de amasado (KN), liofilización (FD) y fluidos supercríticos ($scCO_2$); ii) caracterizar y determinar las propiedades fisicoquímicas de dichos sistemas; iii) analizar su actividad antimicrobiana contra patógenos transmitidos por los alimentos; iv) comprobar la efectividad del complejo de inclusión como conservante natural.

4. Marco teórico

4.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas naturales complejas de metabolitos secundarios volátiles extraídos de múltiples partes de las plantas aromáticas como cortezas, semillas, flores, cáscaras, frutas, raíces, hojas, madera y frutas (El Sawi et al., 2019; Khorshidian et al., 2018; Ríos, 2016). Éstos son aislados de plantas por hidrodestilación o vapor, por expresión, hidrodifusión y extracción por solventes (Kalemba & Kunicka, 2003; Aziz et al., 2018). Dichas sustancias volátiles suelen ser incoloras y líquidas a temperatura ambiente, distinguiéndose por su olor característico (Dhifi et al., 2016).

Dichas sustancias se clasifican según la estructura química del hidrocarburo como terpenos (mono, sesqui- y diterpenos), sus derivados oxigenados, terpenoides (compuestos

fenólicos, aldehídos alifáticos, cetonas, aminas, lactonas, alcoholes y ésteres) y compuestos aromáticos, todos presentes en concentraciones muy diferentes (Van de Braak & Leijten, 1999). Por otra parte, Bakkali et al. (2008), los han clasificado en cuatro tipos: terpenoides, compuestos aromáticos, compuestos alifáticos y compuestos nitrogenados que contienen azufre.

Los principales compuestos asociados con la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales son los aldehídos, fenoles y terpenoides oxigenados (Arruda et al., 2022), y sus principales constituyentes químicos son cimeno, geraniol, carvacrol, timol, vainillina, gingerol, Ar -turmerona, mentol, α -pineno, 1,8-cineol, eugenol, linalol, trans-anetol y limoneno, entre los principales (Osorio-Tobón et al., 2016). Es importante tener en cuenta que la composición de los aceites esenciales de una especie de planta en particular puede diferir entre las temporadas de cosecha y las fuentes geográficas (Burt, 2004).

Los aceites esenciales han demostrado, desde la antigüedad, ser uno de los productos naturales bioactivos más importantes derivados de las plantas, debido a su uso en la medicina tradicional con un amplio campo de actividades biológicas como antimicrobiano, antioxidante, antibacteriano, antifúngico, insecticida, antiinflamatorio, analgésico, antiparasitario y antiviral, entre otros. Estas propiedades están correlacionadas con la concentración y proporción de sus componentes, donde dos o tres constituyentes bioactivos principales están presentes en concentraciones más altas o en sinergismo, siendo responsables de un papel distinto en la actividad biológica de los AE's (De Oliveira-Filhoa et al., 2018).

4.1.1. Actividad antimicrobiana

La presencia de microorganismos deterioradores puede producir una serie de cambios en las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos. Esto, asociado con muchas enfermedades causadas por patógenos transmitidos por los alimentos, representan una amenaza para la salud pública (Arruda et al., 2022).

Con respecto a los aceites esenciales, su acción antimicrobiana puede atribuirse a su naturaleza fenólica, su capacidad para penetrar a través de las membranas celulares bacterianas e inhibir las propiedades funcionales de las células, así como a sus propiedades lipofílicas. La oxidación es uno de los procesos más importantes involucrados en la degradación de los alimentos (Viuda-Martos et al., 2011). Ocurre durante la cadena de suministro y puede afectar las propiedades nutricionales y sensoriales (olores y sabores rancios). La oxidación de lípidos puede conducir a compuestos potencialmente tóxicos (Kubow, 1992). En general, los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes al donar hidrógeno a compuestos altamente reactivos, evitando así la formación de más radicales (Iversen, 1999). Además, alteran la membrana celular, lo que da como resultado la inhibición de las propiedades funcionales de la célula y, finalmente, provocan la fuga del contenido interno de la célula (Bajpai et al., 2012). Por lo tanto, la hidrofobicidad del aceite esencial permite la separación de los lípidos de la membrana celular bacteriana y mitocondria, haciendo que la pared celular bacteriana sea más permeable y vulnerable a la acción de los otros compuestos y permitiendo la salida de iones y otros contenidos celulares (Reis et al., 2022; Calo et al., 2015; Arruda et al., 2022).

De esta manera, varios estudios han evidenciado que la interacción de los AE's con las membranas celulares microbianas resulta en la inhibición del crecimiento de un amplio

espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo algunas de las principales bacterias patógenas transmitidas por los alimentos como la *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* y *Staphylococcus aureus* (Burt, 2004; Calo et al., 2015; Cox et al., 2000, Callaway et al., 2011). Además, las bacterias gram-positivas son más susceptibles a los aceites esenciales que las bacterias gram-negativas, debido a la interacción directa de la membrana celular con los componentes hidrofóbicos de los AE's. Por el contrario, siguiendo esta premisa, las células gram-negativas son más resistentes a los AE's de las plantas ya que poseen una pared celular hidrófila. Esta capa exterior ayuda a evitar la penetración de compuestos hidrofóbicos (Calo et al., 2015).

Generalmente, los AE's que poseen las propiedades antibacterianas más potentes contra los patógenos transmitidos por los alimentos contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como carvacrol, eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil)fenol) y timol. Sin embargo, existe evidencia de que los aceites esenciales tienen una mayor fuerza antimicrobiana a causa del efecto aditivo de sus principales componentes antimicrobianos, lo que puede indicar que los componentes menores también juegan un papel y/o que puede existir sinergia entre los compuestos (Burt, 2004).

La investigación relacionada con la actividad biológica de sustancias vegetales naturales incluye el aceite esencial de tomillo. Diversos estudios han demostrado sus propiedades antifúngicas, antivirales y anticancerígenas, sugiriendo que su aplicación en la industria alimentaria posee gran potencial, pero se requieren más estudios y análisis (Kowalczyk et al., 2020).

4.1.2. Aceite esencial de tomillo

El aceite esencial de tomillo (TEO, por sus siglas en inglés) se extrae de las hojas de *Thymus vulgaris* L., y posee compuestos pertenecientes a varios grupos químicos, incluidos monoterpenos, alcoholes monoterpenos, derivados de fenol, cetonas, aldehídos, éteres y ésteres. Los compuestos fenólicos dominantes del TEO son los monoterpenos fenólicos isoméricos timol (2-isopropil-5-metilfenol) y carvacrol (2-metil-5-(propan-2-il)fenol), con un contenido mínimo del 40%. Ambos monoterpenos se biosintetizan primero por la aromatización de γ -terpineno a p -cimeno, siguiendo por la hidroxilación del último. También se encuentran algunos otros componentes como γ -terpineno, linalol, p -cimeno, β -mirreno y terpineno-4-ol (Kowalczyk et al., 2020).

El TEO tiene muchas aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica debido a sus propiedades antioxidantes, antifúngicas, antivirales (contra el virus del herpes simple tipo I, rinovirus humano y virus de la influenza), actividad antiinflamatoria y espasmolítica, entre otras (Kowalczyk et al., 2020). Además, el tomillo se puede utilizar para el tratamiento y prevención del cáncer y de muchas enfermedades crónicas (Salehi et al., 2019), ejerciendo un efecto antibacteriano sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas. Adicionalmente, se ha utilizado como inhibidor de *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.* y *Penicillium spp.*, algunos de los agentes más importantes de enfermedades transmitidas por alimentos y/o mohos de deterioro (Sokmen et al., 2004, Viuda-Martos et al., 2007). Aunque el TEO tiene propiedades citotóxicas en altas concentraciones y puede causar daño a las células intestinales cuando se administra por vía oral, no se ha evidenciado toxicidad a las dosis comúnmente utilizadas y puede considerarse un fármaco seguro (Kowalczyk et al., 2020). Sin embargo, su aplicación se enfrenta a desafíos importantes, como su baja

solubilidad en agua, alta volatilidad, reactividad, fuerte olor aromático y su sensibilidad a la luz, el aire y el calor, que dificultan enormemente sus actividades biológicas (Sun et al., 2021).

La aplicación de TEO para el control de bacterias que deterioran los alimentos requiere la evaluación de diversos aspectos tales como los efectos sobre las propiedades organolépticas, la evaluación del rango de actividad contra los patógenos de interés para un producto en particular y los efectos de la composición de los alimentos sobre la actividad biológica (Gutierrez, 2008).

4.1.3. Aplicación en la industria alimentaria

En la actualidad, se han descrito más de 3000 aceites esenciales, de los cuales alrededor de una décima parte son relevantes para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Sharifi-Rad et al., 2017). No obstante, la aplicación de AE's, especialmente en el ámbito alimenticio es limitada y enfrenta desafíos críticos que dificultan su proceso como conservador natural debido a su baja solubilidad en agua y medios acuosos, inestabilidad térmica y alta volatilidad, oxidación y reactividad química con la matriz del alimento y del envase que podría afectar significativamente la composición funcional de los compuestos activos y las propiedades sensoriales. Además, las reacciones con lípidos, proteínas, carbohidratos y otros aditivos podrían provocar una disminución de la bioactividad del compuesto antimicrobiano (Ayala-Zavala, et al., 2008a; Liao et al., 2021).

De esta manera, la capacidad de la mayoría de los antimicrobianos, incluidos los aceites esenciales para inhibir los microorganismos puede perderse con el almacenamiento prolongado. Según el tiempo y la temperatura de almacenamiento, estas sustancias pueden

volatilizarse o volverse inactivas. Además, la mayoría de los aceites esenciales tienen un aroma fuerte incluso en dosis bajas, y debido a que se necesitan altas concentraciones para lograr una buena actividad antimicrobiana contra los microorganismos objetivo en los alimentos, a menudo causan cambios organolépticos negativos, lo que afecta la aceptabilidad del sabor y el olor (Emiroğlu et al., 2010; Ayala-Zavala et al., 2008b; Tripathi & Dubey, 2003; Zhaveh et al., 2015).

Los principales retos al utilizar aceites esenciales como agentes conservadores de nutraceuticos se pueden superar en cierta medida mediante el uso de la micro o nano-encapsulación, en lugar de aplicar los AE's directamente a los productos alimenticios. Varios estudios han demostrado que los complejos formados de AE's y sus componentes volátiles (VCs) en sistemas de encapsulación representa un enfoque viable y eficaz para protegerlos de la degradación por exposición al aire, la luz, el oxígeno, el pH, la humedad y el calor durante el procesamiento y el almacenamiento, mejorando la solubilidad de los compuestos lipofílicos en medios acuosos además de conservar su actividad biológica (Venturini et al., 2008; Seo et al., 2010; Turasan et al., 2015; Calo et al., 2015; Bazana et al., 2019). Más aún, podría potenciar sus propiedades y vida útil al minimizar su volatilidad. Además, estos sistemas pueden mejorar la estabilidad física y química y reducir los olores y sabores desagradables de algunos compuestos contenidos en los AE's. Específicamente, en alimentos con una gran cantidad de agua, pueden aumentar la dispersabilidad del aceite en las zonas del alimento donde crecen los microorganismos. Así, se puede mejorar la actividad antimicrobiana al mismo tiempo que se reduce el impacto sobre las propiedades organolépticas de los alimentos (Reis et al., 2022).

4.2. Encapsulación y complejos de inclusión

La encapsulación es el proceso en el que se construye una barrera funcional entre agentes activos y un material de recubrimiento para evitar reacciones químicas y físicas con el medio y para mantener las propiedades biológicas, funcionales y fisicoquímicas de los componentes internos, formándose así un complejo de inclusión. El material de recubrimiento determina la estabilidad de las partículas, la eficiencia del proceso y el grado de protección de la sustancia encapsulada (Bakry et al., 2016). Las interacciones entre el material de la pared y el núcleo pueden afectar la tasa de liberación, así como la volatilidad del núcleo y el tamaño de las partículas (Capelezzo et al., 2018).

Los sistemas de encapsulación en los que los diámetros de las partículas (al menos en una dimensión) son inferiores a 100 nm pueden clasificarse como sistemas de nanoencapsulación. Los diferentes tipos de estos sistemas deben servir como un medio para entregar y proteger el compuesto bioactivo en una forma física que pueda incorporarse fácilmente en alimentos o bebidas (Singh, 2016). La incorporación de AE's a los sistemas de encapsulación puede mejorar significativamente sus propiedades físicas como la dispersabilidad y su estabilidad, la turbidez y la viscosidad, y así promover sus actividades funcionales (Blanco-Padilla et al., 2014).

Los objetivos del uso de sistemas de encapsulación en las industrias alimentarias incluyen: (1) estabilizar los agentes antimicrobianos volátiles, como los aceites esenciales, para evitar la evaporación y la transferencia de masa al ambiente durante el procesamiento; (2) reducir la interacción de los compuestos activos con los sustratos alimentarios; (3) controlar la tasa de liberación de los EO's en las matrices alimentarias para extender la exposición de los microorganismos a los agentes antimicrobianos; (4) mejorar su solubilidad

(Liao et al., 2021). Este proceso también cambia las propiedades físicas de los compuestos, facilitando su aplicación al convertir una fase líquida en una sólida, brindando control y una liberación dirigida de los ingredientes activos, mejorando la vida útil y minimizando sabores y olores de los aceites esenciales (Mishra, 2015).

El proceso de liberación puede ser a una velocidad controlada que se puede lograr a través de la disolución o desintegración gradual de las estructuras de las partículas, o por difusión, ocurriendo como resultado a un gradiente de concentración desde el interior de la partícula hacia su superficie y otro gradiente de concentración desde la superficie de la partícula a la fase *bulk* (Siepmann & Siepmann, 2012), donde el compuesto activo se libera lentamente al penetrar la pared de la capa de recubrimiento sin comprometer su integridad física (Capelezzo et al., 2018). Asimismo, existe un mecanismo de liberación de rompimiento, donde un agente desencadenante de liberación como el pH, el estrés mecánico, la temperatura, la actividad enzimática, el tiempo, la fuerza osmótica o la luz promueve la ruptura de la cápsula y libera instantáneamente el compuesto activo (Fathi et al., 2012). Dicho proceso de encapsulación y entrega permite controlar la liberación de propiedades bioactivas, sabores y olores en el momento deseado y protege contra la degradación de éstos durante el procesamiento y almacenamiento (Yu et al., 2018).

De acuerdo con Axelos & Van de Voorde (2017), los sistemas de nano-encapsulación pueden servir como nano-cápsulas para mejorar la dispersión, la biodisponibilidad, la absorción de nutrientes, la entrega específica de nutraceuticos y potenciadores de sabor. Algunos de los sistemas nano y micro-estructurados más estudiados incluyen liposomas, microemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) y derivados de polisacáridos, entre otros (Wang et al., 2014; Liu et al., 2008). La elección adecuada de la técnica de

encapsulación depende del uso final del producto y de las condiciones de procesamiento involucradas (Bakry et al., 2016). En la Tabla 1 se pueden observar algunas ventajas y desventajas de cada sistema.

Tabla 1. Sistemas de encapsulación para compuestos activos y sus ventajas y desventajas.

Sistema	Ventajas	Desventajas	
Liposomas	Biocompatibles y biodegradables		Wang et al., (2014)
	Capaz de encapsular moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas	Baja estabilidad	Kahraman et al., (2017)
	Liberación controlada	Difícil preparación	Singh (2016)
	Protege a la molécula activa de degradación	Costo alto	Singh et al., (2012) Gratieri et al., (2010)
Microemulsiones	Alta solubilidad del fármaco	Gran cantidad de surfactante	Wang et al., (2014)
	Tamaño de gota pequeño	Solubilidad del fármaco afectada	Singh et al., (2013)
	Fácil preparación	Toxicidad potencial del surfactante	Singh (2016)
	Larga vida útil		Gratieri et al., (2010)
Nanopartículas lipídicas (SLNs)	Fácil preparación y producción a gran escala	Carga limitada de principios activos	Wang et al., (2014)
	Liberación controlada	Riesgo de gelificación	Severino et al., (2012)
Derivados de polisacáridos	Alta estabilidad		
	No tóxico	Dependen de la compatibilidad de la carga	Wang et al., (2014)
	Biodegradable		Liu et al., (2008)
	Bajo costo en su procesamiento	Datos <i>in vivo</i> escasos	Fathi et al., (2014)

Los liposomas tienen una estructura de capa esférica que consiste en una bicapa de fosfolípidos que encierra un núcleo líquido y su tamaño varía de 50 nm a 1 μ m de diámetro. Con su aplicación como sistemas de suministro de compuestos bioactivos, se pueden

incorporar compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos dentro de una única estructura. Varios estudios han demostrado que los liposomas se pueden usar para encapsular vitaminas, antioxidantes, proteínas, péptidos, minerales y ácidos grasos (Singh, 2016). Aunque estas vesículas muestran un gran potencial para la encapsulación y la liberación controlada de compuestos importantes desde el punto de vista nutricional, se sintetizan mediante métodos y técnicas de producción que no son seguros para los alimentos y que requieren muchos recursos (Singh et al., 2012).

Las microemulsiones son mezclas termodinámicamente estables de agua, aceite y una o más moléculas anfifílicas, que se ensamblan espontáneamente en nanogotas. Su aplicación en la industria alimentaria está limitada por el tipo de tensioactivos que se utilizan para facilitar su formación, ya que la mayoría de ellos no son permisibles en los alimentos y solo se pueden añadir en niveles muy bajos (Singh, 2016).

Las nanopartículas lipídicas (SLN) se utilizan principalmente como sistemas de administración oral para diversos fármacos y otras sustancias activas, protegiendo los fármacos cargados de diferentes degradaciones (químicas y enzimáticas) y liberando compuestos farmacológicos desde el núcleo lipídico gradualmente al torrente sanguíneo, lo que da como resultado perfiles terapéuticos mejorados como en comparación con la droga libre (Severino et al., 2012).

Los sistemas de administración basados en polisacáridos, específicamente, son adecuados para muchas aplicaciones industriales ya que son biocompatibles, biodegradables y tienen un alto potencial para ser modificados logrando las propiedades requeridas. Estos complejos pueden interactuar con una amplia gama de compuestos bioactivos a través de sus grupos funcionales, lo que los convierte en vehículos versátiles para unirse y atrapar una gran

cantidad de ingredientes alimentarios hidrofílicos e hidrofóbicos. Se utilizan diferentes tipos de carbohidratos para ensamblar sistemas de liberación, incluidos almidón, celulosa, entre otros (Fathi et al., 2014). Dentro de esta familia, uno de los compuestos que están siendo ampliamente estudiados son las ciclodextrinas que han probado ser un buen medio para poder encapsular una gran variedad de sustancias.

4.3. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos en forma de anillo con una cavidad central hidrofóbica y una superficie hidrofílica, producidos a partir de la modificación enzimática del almidón. Poseen una forma de cono truncado debido a la presencia de unidades de glucopiranososa en forma de silla. Normalmente, se dividen en dos categorías: de origen natural y modificados químicamente (Wadhwa et al., 2017).

Las CDs naturales más comunes son las moléculas α -(alfa), β -(beta) y γ -(gamma) que comprenden seis, siete y ocho unidades de glucopiranososa, respectivamente, unidas por un enlace glucosídico α -(1-4) (Fig. 1). Cada una de las tres ciclodextrinas principales son moléculas cristalinas, no higroscópicas y homogéneas (Voncina & Vivod, 2013). No existen CDs con menos de seis unidades de glucosa por razones estéricas, sin embargo, se han identificado algunas de mayor tamaño pero que no tienen propiedades tan efectivas como las mencionadas anteriormente. La profundidad de la cavidad para los diferentes tipos es la misma (8 Å), pero los tamaños de la cavidad son diferentes para α -CD, β -CD y γ -CD (6, 8 y 10 Å, respectivamente) (Szejtli, 1998).

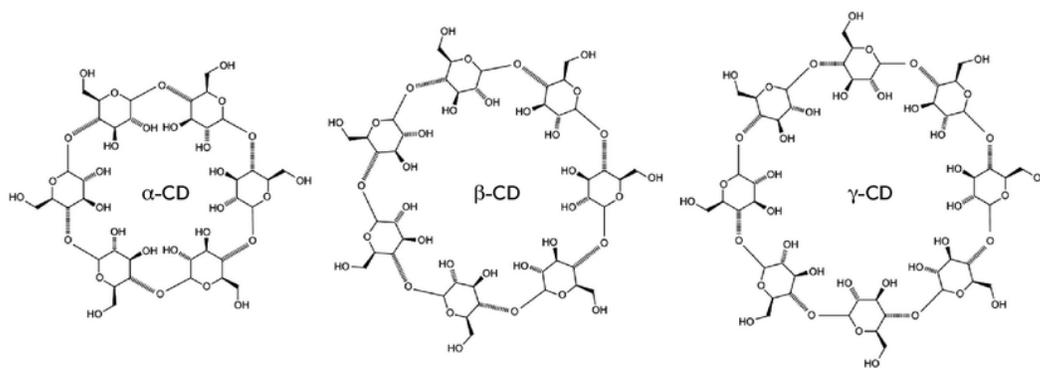


Fig. 1. Estructura química de las ciclodextrinas. De izquierda a derecha: α -CD, β -CD y γ -CD (Nikitenko & Prassolov, 2013).

Las ciclodextrinas se producen como resultado de la reacción de transglucosilación intramolecular a partir de la degradación del almidón por la enzima ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa) (Abbasi et al., 2021). Muchas bacterias, tales como *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, entre otras, generan enzimas para la producción de ciclodextrinas. Las enzimas obtenidas de estas bacterias difieren en las cantidades relativas de α -, β - y γ -ciclodextrinas producidas (Hedges, 2009).

De esta forma, el proceso de preparación de las CDs consta de cuatro fases principales: (i) cultivo del microorganismo productor de la enzima ciclodextrina glucosil transferasa (CGT-asa); (ii) separación, concentración y purificación de la enzima del medio de fermentación; (iii) conversión enzimática de almidón prehidrolizado en una mezcla de dextrinas cíclicas y acíclicas; y (iv) separación de CDs de la mezcla, su purificación y cristalización. Las enzimas CGT-asa degradan el almidón y producen reacciones intramoleculares sin la participación del agua. En el proceso, se originan dextrinas cíclicas y acíclicas, que son oligosacáridos de tamaño intermedio. Los productos cíclicos resultantes, que son las ciclodextrinas, están compuestos por el enlace entre unidades de glucopiranosas,

constituyentes de las dextrinas. La unión se realiza a través de puentes de oxígeno glucosídico por enlaces α -(1,4) (Astray et al., 2009). A medida que continúa la reacción, también comienza a acumularse una segunda o tercera ciclodextrina. Si bien la α -CD tiene más probabilidades de ser la molécula producida inicialmente, la β -CD puede acumularse en mayores cantidades a medida que pasa el tiempo y la reacción finaliza (Hedges, 2009).

En la estructura cónica cilíndrica de las CDs (Fig. 2), la cavidad interna está alineada con los átomos de hidrógeno y el enlace O-glucosídico. Las ciclodextrinas son moléculas anfipáticas donde los grupos hidroxilo secundarios (2-OH y 3-OH) están en el borde ancho, los grupos hidroxilo primarios (6-OH) están ubicados en el borde delgado y los hidrógenos apolares C3 y C5 y éter- como el oxígeno se localizan en el interior de las moléculas toroidales (Vikas et al., 2018). El exterior de la molécula es polar, contrario a la cavidad interna que es apolar (Connors, 1997; Linde et al., 2011). Algunas otras propiedades de las ciclodextrinas se enumeran en la Tabla 2.

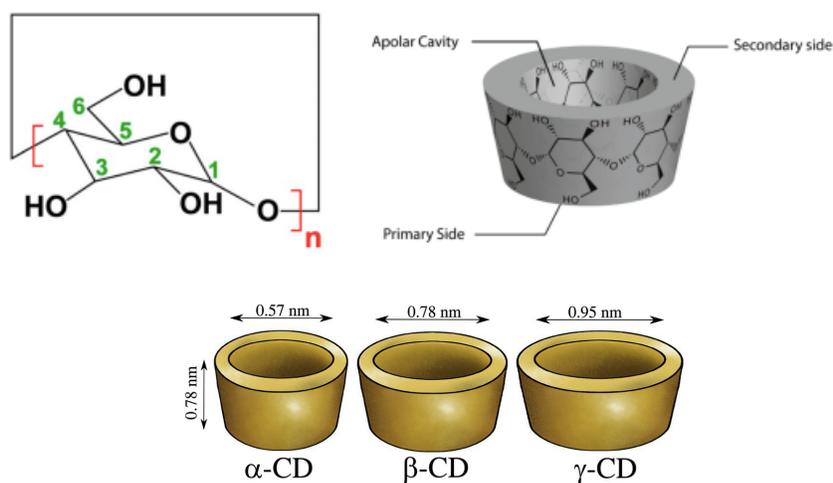


Fig. 2. Arriba: esquema de estructura funcional de α -CD ($n = 6$), β -CD ($n = 7$) y γ -CD ($n = 8$), abajo: dimensiones de α -CD, β -CD y γ -CD (Crini, 2014).

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de las CDs (Szejtli, 1998; Del Valle, 2004; Mura, 2014).

Propiedad	α -CD	β -CD	γ -CD
Forma cristalina	Cuchillas hexagonales	Paralelogramos monoclinicos	Prismas cuadráticos
Unidades de glucopiranos	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25 °C (% w/v)	14,5	1,85	23,2
Diámetro exterior (Å)	14,6	15,4	17,5
Diámetro de la cavidad (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura del cono (Å)	7,9	7,0	7,9
Volumen de la cavidad (Å ³)	174	262	427
Punto de fusión (°C)	275	280	275
Tensión superficial (nM/m)	73	73	73
Contenido de agua cristalina (wt%)	10,2	13,2-14,5	8,13-17,7
Moléculas de agua en la cavidad	6	11	17

Las estructuras de CDs también pueden modificarse químicamente y transformarse en sus derivados mediante diferentes manipulaciones moleculares, teniendo distintas propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, se han empleado ciclodextrinas metiladas, etiladas, hidroxipropiladas, hidroxietiladas, etiladas, acetiladas y β -CD poliméricas en el diseño racional de sistemas portadores solubles o insolubles en agua (Marques, 2010).

Adicionalmente, la cavidad hidrofóbica de las ciclodextrinas les permite establecer interacciones tales como la encapsulación molecular con una diversidad de moléculas hidrofóbicas a través de interacciones no covalentes, formando compuestos de inclusión *host/guest* en fase sólida o en solución acuosa (Marques, 2010). Esto resulta en la mejora de la estabilidad fisicoquímica de los solutos y reducción de pérdidas por evaporación cuando se trata de compuestos volátiles (Burt, 2004). La compatibilidad geométrica entre la cavidad

del hospedador y el huésped, la estructura, la carga y la polaridad del huésped, el efecto del medio de reacción (disolvente) y la temperatura son importantes para la formación del complejo de inclusión. Es importante que las dimensiones geométricas de las moléculas del huésped sean bastante cercanas a las del anillo de benceno sustituido o sus homólogos condensados (Astray et al., 2009).

Otra propiedad presente en estos compuestos, es que son moléculas inertes que no interfieren con las propiedades biológicas de los huéspedes. Además, dado que son grandes oligosacáridos hidrofílicos con numerosos donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno, no atraviesan las membranas hidrofóbicas a través de la difusión pasiva, por lo que actúan como potenciadores de penetración y aumentan la solubilidad y la concentración del agente activo en la membrana biológica, brindando la oportunidad de entregar compuestos insolubles en agua con absorción reproducible y mejorar la biodisponibilidad (Nieddu et al., 2014; Pinho et al., 2014; Kfoury et al., 2019). Por lo tanto, las CDs son útiles para atrapar sustancias bioactivas alimentarias poco solubles, sensibles a la temperatura o químicamente lábiles, contrario a las CDs, las cuales son estables y comienzan a descomponerse a temperaturas superiores a 270 °C. La encapsulación con ciclodextrinas es un método para controlar el olor y la reactividad de los compuestos activos durante la liberación de una variedad de componentes bioactivos, incluidos antimicrobianos, antioxidantes, aceites esenciales y sabores (Fathi et al., 2014a).

El numeroso uso de las ciclodextrinas se refleja en industrias como la farmacéutica, cosmética, agroquímica, alimentaria y de protección al medio ambiente. Específicamente, las CDs se han recomendado para aplicaciones en el procesamiento de alimentos y como aditivos alimentarios con una variedad de objetivos: (i) proteger los componentes lipofílicos de los

alimentos que son sensibles al oxígeno y a la degradación inducida por la luz o el calor; (ii) solubilizar colorantes alimentarios y vitaminas; (iii) estabilizar fragancias, sabores y vitaminas frente a cambios no deseados y en condiciones bióticas o abióticas: los procesos de fabricación y almacenamiento, los materiales de envasado y los ingredientes de los alimentos a menudo provocan modificaciones en el sabor general al reducir la intensidad del compuesto aromático o producir componentes de sabor desagradable. Para limitar la degradación o pérdida del aroma durante estos procesos, se puede encapsular a los ingredientes volátiles antes de usarlos en alimentos y bebidas; (iv) eliminar olores o sabores desagradables: cuando se agregan CDs en la fabricación, los componentes indeseables pueden llegar a formar complejos de inclusión que desodorizan el producto resultante; (v) eliminar el colesterol de los productos animales mejorando sus características nutricionales; (vi) lograr una liberación controlada de ciertos componentes de los alimentos; y (vii) controlar las reacciones químicas (Astray et al., 2009; Matencio et al., 2020).

4.3.1. Solubilidad

Debido al enlace de hidrógeno intramolecular que se establece entre los grupos hidroxilo en los carbonos C2 y C3, se explica la menor solubilidad en agua de β -CD en comparación con las demás ciclodextrinas. El cinturón de enlaces de hidrógeno está incompleto en la molécula de α -CD ya que una unidad de glucopiranososa se encuentra en una posición distorsionada. En consecuencia, en lugar de los seis enlaces hidrógeno posibles, solo cuatro pueden establecerse completamente. Por otro lado, la γ -CD es un no coplanario y posee una estructura más flexible, siendo así la más soluble de las tres CDs principales (Astray et al., 2009).

De esta forma, se ha reportado que la β -CD es al menos nueve veces menos soluble (1,85 g/100 mL a temperatura ambiente) que las demás CDs (14,5 g/100 mL y 23,2 g/100 mL para α - y γ -CD, respectivamente). La solubilidad de dichas moléculas depende en gran medida de la temperatura (Astray et al., 2009).

Por otro lado, la solubilidad disminuida de la β -CD en agua parece deberse a la marcada estructura del agua que surge de las interacciones del agua con la molécula de β -CD, lo que provoca una compensación favorable en la entalpía por la entropía desfavorable de la solución (Linert et al., 1992). Además, las CDs son insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos, pero son solubles en mezclas de agua y solventes orgánicos miscibles en agua. En general, a medida que aumenta la concentración del disolvente orgánico, disminuye la solubilidad de la ciclodextrina. Éstas pueden ser hidrolizadas por ácidos fuertes a una velocidad que depende de la temperatura y la concentración de ácido, sin embargo, los ácidos orgánicos débiles no hidrolizan las ciclodextrinas. Además, las ciclodextrinas son estables en presencia de bases (Hedges, 2009).

4.3.2. Propiedades termodinámicas y mecanismos en los complejos de inclusión

En soluciones acuosas, la cavidad no polar de las CDs está ocupada por moléculas de agua. Por lo tanto, la principal fuerza formadora de complejos es la liberación de moléculas de agua ricas en entalpía desde esta cavidad. Estas moléculas son sustituidas por huéspedes menos polares, favoreciendo una asociación apolar-apolar y una disminución en la tensión del anillo de ciclodextrina (Mazzobre et al., 2010). El proceso se ve favorecido energéticamente por las interacciones de la molécula huésped con la cavidad hidrofóbica solvatada del hospedador. La unión de moléculas huésped dentro de la ciclodextrina no es fija ni

permanente, sino un equilibrio dinámico. Por lo tanto, la formación de un complejo de inclusión es el resultado de un equilibrio entre el huésped libre, las moléculas de CD y el complejo *host/guest* (Cevallos et al., 2010). En este proceso, los cambios de entropía y entalpía asumen un papel importante como resultado de varios efectos y hay algunas interacciones energéticamente favorables involucradas, dentro de las que destacan:

- A) sustitución de las interacciones polares-apolares energéticamente desfavorecidas (entre el agua incluida y la cavidad de la CD, y entre el agua y el huésped) por la interacción apolar-apolar más favorecida (entre el huésped y la cavidad), y la interacción polar-polar (entre las moléculas *bulk* de agua y el agua liberada de la cavidad);
- B) liberación de la tensión del anillo de la CD en la formación del complejo;
- C) un mayor número de interacciones de Van der Waals y enlaces de hidrógeno entre el huésped y el hospedador (Astray et al., 2009) y
- D) una disminución en las interacciones repulsivas entre el huésped hidrofóbico y el ambiente acuoso (Abarca et al., 2016).

Con respecto a los complejos de inclusión, éstos pueden alcanzar una estabilidad proporcional al enlace covalente debido al arreglo espacial que se genera en su formación. Las fuerzas de Van der Waals, las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno mantienen unidos a la CD y a las moléculas huéspedes. La energía de las fuerzas de Van der Waals es proporcional a la polarizabilidad molecular y a la refracción molecular. La adicional fuerza estabilizadora dominante es la hidrófoba o solvofóbica. La hidratación del complejo se ve favorecida energéticamente en comparación con la hidratación separada de los componentes (Astray et al., 2009).

Complementando, la estabilidad del complejo se incrementa con el crecimiento del carácter donador de electrones de los sustituyentes de la molécula incluida. Se debe tener en cuenta la naturaleza de la molécula huésped (Takagi & Maeda, 1984), aunque los parámetros termodinámicos no presentan variaciones. Los parámetros termodinámicos como la entalpía (ΔH) y la entropía (ΔS), se pueden obtener a partir de la dependencia de la temperatura de la constante de disociación (Cramer et al., 1967). Los valores de ΔH y ΔS se pueden calcular a partir de datos espectrofotométricos (Dodziuk, 2006), pero los datos más fiables se obtienen mediante determinaciones calorimétricas.

4.3.3. Eficiencia de encapsulación

Diversos estudios han documentado que las ciclodextrinas podrían bloquear los grupos funcionales de los aceites esenciales, que se vuelven menos disponibles para reducir las especies radicales (Kamimura et al. 2014; Rakmai et al. 2017). Por el contrario, la conservación y mejora de la actividad antioxidante tras la encapsulación se explica por la formación de complejos de inclusión (Lu et al. 2009). Si bien los complejos de inclusión pueden garantizar una excelente protección de los aceites esenciales contra la degradación o la evaporación, no interfieren con los grupos funcionales de los compuestos activos (Kfoury et al. 2014; Rakmai et al. 2017). Se puede observar un aumento en la actividad antioxidante cuando se forman enlaces de hidrógeno intermoleculares entre la ciclodextrina y el huésped, lo que resulta en una formación de radicales estables al reaccionar con los radicales libres (Lucas-Abellán et al., 2008). Asimismo, las ciclodextrinas podrían actuar como antioxidantes secundarios que mejoran la eficacia antirradicalaria de los huéspedes (López-Nicolas et al., 2007; Núñez-Delicado et al., 1997).

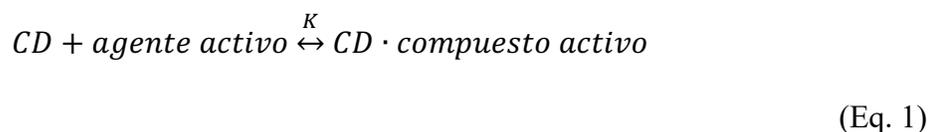
La eficiencia de la encapsulación depende de varios parámetros. La retención del agente activo dentro de la cavidad está regulada por factores relacionados con la naturaleza química del huésped, incluido su peso molecular, funcionalidad química, polaridad y volatilidad, y por las propiedades del material de recubrimiento y la técnica de encapsulación elegida (Martins et al., 2014).

Por otra parte, se podría utilizar una concentración más baja del compuesto volátil para lograr una concentración efectiva y todos los sitios objetivo del nutraceutico potenciales a tener un crecimiento bacteriano o fúngico. Varios estudios han evaluado el efecto de la encapsulación sobre las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los aceites esenciales. En primer lugar, la encapsulación mejoró la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales al disminuir la concentración activa (MIC, MBC, IC50 y LD50) o aumentar la inhibición del crecimiento. Esta mejora en las propiedades antimicrobianas podría deberse a la mayor solubilidad en agua de los AEs tras la encapsulación, lo que a su vez mejoró el área de superficie de contacto con el patógeno (Fenyvesi et al., 2014). Los aceites esenciales también podrían unirse a los componentes hidrófobos, como los lípidos y las proteínas, lo que reduce su actividad (Burt et al., 2005; Tao et al., 2014), pero las ciclodextrinas reducen estas interacciones y preservan las propiedades inhibitorias (Budryn et al., 2015). Además, el tamaño molecular del complejo de inclusión puede aumentar los mecanismos de absorción celular y, por lo tanto, aumentar la actividad antimicrobiana (Rakmai et al., 2017).

En general, estos resultados aportan evidencia de la eficacia de los aceites esenciales encapsulados en ciclodextrinas para ser utilizados como agentes antimicrobianos y antioxidantes naturales (Kfoury et al., 2019).

4.3.4. Formación del complejo de inclusión

La formación del complejo de inclusión de una ciclodextrina y un agente activo en solución es un proceso de equilibrio entre la formación del complejo y la disociación, definido por el siguiente mecanismo:



donde K es la constante de equilibrio, CD es la ciclodextrina libre, el compuesto activo se refiere a la molécula huésped libre y $CD \cdot$ compuesto activo es el complejo formado. De esta forma, la constante K refleja la estabilidad del complejo y se define para un complejo de relación molar 1:1 mediante la siguiente ecuación:

$$K_{1:1} = \frac{[CD \cdot compuesto\ activo]}{[CD][compuesto\ activo]} \quad (\text{Eq. 2})$$

La capacidad del huésped para formar un complejo de inclusión con una ciclodextrina está limitada por el tamaño del huésped en relación con el tamaño de la cavidad de la CD, así como por la termodinámica del sistema (Stella, 1997). Cada CD es capaz de alojar diferentes tipos de moléculas en función del diámetro de la cavidad (Fakayode et al., 2007). La α -CD generalmente forma complejos con moléculas alifáticas de bajo peso molecular, la β -CD puede formar complejos con compuestos aromáticos y la γ -CD puede albergar macrociclos y otras moléculas más grandes (Del Valle, 2004). Los complejos de inclusión se forman con mayor frecuencia en una proporción molar de 1:1, aunque también se han observado proporciones molares *guest/host* de 1:2, 2:1, 1:3, 3:1 y 2:3 (Fakayode et al., 2007). En la Fig.

3 se pueden observar algunos ejemplos de cómo la estequiometría del complejo varía según la combinación CD/compuesto activo.

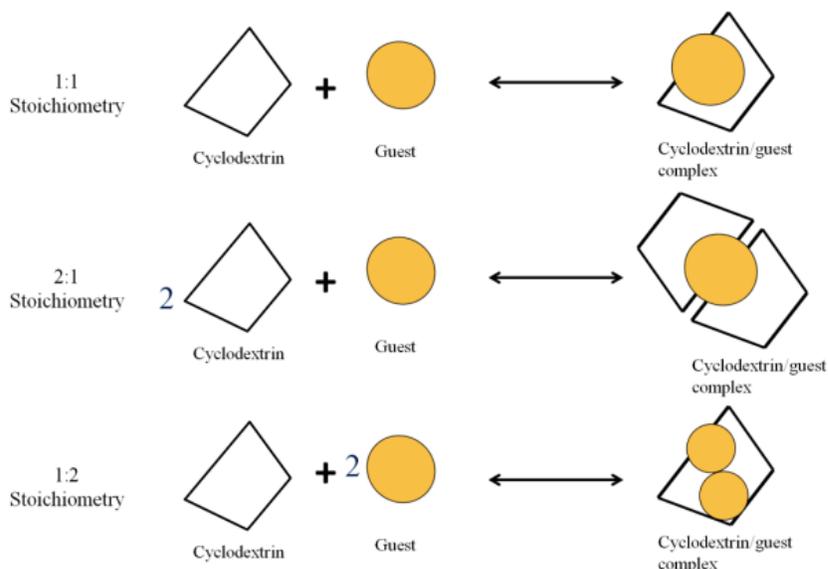


Fig. 3. Complejos de inclusión de ciclodextrinas y su estequiometría (Fakayode et al., 2007).

4.3.5. Beta-ciclodextrina (β -CD)

La β -CD es un oligosacárido con una forma cristalina de paralelogramo monoclinico, posee 7 unidades de glucopiranososa y un peso molecular de 1135 g/mol. En dicha molécula, el grupo C2-OH de una unidad de glucopiranososa puede formar un enlace de hidrógeno con el grupo C3-OH de la unidad de glucopiranososa adyacente (Bender & Komiyama, 1978). En la molécula, estos enlaces de hidrógeno forman un anillo secundario completo. Esto provoca que la β -CD posea una estructura rígida y una baja solubilidad en agua (1,85%, w/v) (Voncina & Vivod, 2013). Entre las CDs, la β -CD ha sido la más utilizada debido a que su cavidad apolar puede albergar moléculas de masa molecular de entre 100 y 400 g/mol, que es el rango

de peso molecular de la mayoría de las moléculas de interés. Un ejemplo son los complejos estables que la β -CD forma con mono y sesquiterpenos (Szente et al., 1988).

Los estudios que han evaluado el nivel de inclusión de sustancias de sabor o aroma de un peso molecular promedio de 120 a 160 g/mol dentro de la β -CD han demostrado que la proporción molar de moléculas host/guest suele ser de 1:1 para los complejos de inclusión formados en solución (Chen & Ji, 2010; Szente y Szejtli, 2004).

Adicionalmente, la β -CD es fácil de recuperar industrialmente a través del proceso de cristalización (Wang et al., 2011). Su producción es la más viable económicamente, con un costo industrial por kilogramo aproximadamente 20 veces menor que el de los otros tipos de CDs. Además, las ciclodextrinas han sido reconocidas como ingredientes no tóxicos y la β -CD ha estado en la lista de Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) desde 1998 como encapsulante y protector del sabor, a un nivel del 2% en numerosos productos alimenticios (Szente & Szejtli, 2004; Thombre & Kanekar, 2013).

4.4. Métodos de encapsulación

La encapsulación es un fenómeno molecular que consiste en poner en contacto una o más moléculas de ciclodextrinas con una o más moléculas del compuesto activo, que será el huésped. Se puede formar un complejo de inclusión sólido con una amplia gama de compuestos sólidos, líquidos y gaseosos (Del Valle, 2004).

En el proceso de encapsulación, están involucrados muchos factores y fuerzas, como las fuerzas de Van der Waals, las interacciones dipolo-dipolo, los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de dispersión de London, así como la liberación de agua (de alta energía) y la tensión conformacional (Hedges, 2009). El método de preparación para obtener complejos de

inclusión tiene un papel importante en el desempeño y las características morfométricas del producto (Cid-Samamed et al., 2022).

El papel del medio en donde se lleva a cabo la complejación juega un papel muy importante, ya que influye en el proceso de equilibrio de inclusión en ambas direcciones (Astray et al., 2009). Los métodos convencionales para preparar compuestos de inclusión de ciclodextrinas normalmente involucran al agua como solvente, la cual disuelve a la CD y a la molécula huésped. No obstante, se han reportado algunos métodos que incluyen solventes orgánicos como etanol, acetona o metanol. En ciertos casos, para aumentar la solubilidad, se agrega una pequeña cantidad de estos solventes al agua, lo que permite la formación de complejos sin afectar la naturaleza de la solución. Estos métodos bien conocidos incluyen la co-precipitación, la suspensión, y la mezcla en seco. Más recientemente, la liofilización y el secado por aspersión o atomización se han convertido en las técnicas más comunes para preparar complejos de inclusión, siendo el secado por aspersión el más preferente a escala industrial (Grandelli, 2013).

Además, un parámetro que también influye en la tasa de encapsulación es la temperatura. A medida que aumenta la temperatura, aumenta la solubilidad de la ciclodextrina y del huésped, incrementándose la velocidad de formación de complejos. Sin embargo, la temperatura óptima varía según el huésped ya que es probable que a altas temperaturas, algunos complejos se pueden desestabilizar. Existen diferentes enfoques para obtener complejos de inclusión dependiendo de las propiedades del huésped y la naturaleza de la ciclodextrina elegida. Como se mencionó anteriormente, la encapsulación modifica las propiedades físicas y químicas de los huéspedes, como la solubilidad y la estabilidad. Por ello, la selección de la técnica de encapsulación depende de la aplicación final del producto,

considerando la estabilidad física y química, la concentración de los compuestos en el proceso de encapsulación, la compatibilidad entre la CD y la molécula bioactiva, el tamaño de partícula requerido, el mecanismo de liberación y los costos de fabricación (Capelezzo et al, 2018; Kringel et al., 2017).

En esta sección se presentan algunos métodos para la complejación de ciclodextrinas y moléculas huésped, tomando en cuenta sus aplicaciones alimentarias.

4.4.1. Extrusión

Esta técnica se utiliza principalmente para encapsular compuestos volátiles y orgánicos, que pueden ser inestables, como los aceites esenciales. El proceso consiste básicamente en (i) inyección y (ii) extrusión en estado fundido, seguido de (iii) extrusión centrífuga (co-extrusión). De esta forma, el material a encapsular (núcleo) se dispersa en una masa fundida. Luego, la mezcla se pasa a través de una matriz, hacia un líquido deshidratante que endurece el recubrimiento. Es comúnmente aplicado en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, debido a que no requiere altas temperaturas y el uso de solventes orgánicos, aunado a las ventajas que ofrece como larga vida útil y estabilidad frente a la oxidación y menores tasas de evaporación del compuesto volátil. No obstante, es un proceso costoso y las partículas no presentan una distribución uniforme con partículas de gran diámetro (500 a 1000 μm) (Reis et al., 2022; Capelezzo et al., 2018; Silva et al., 2018).

4.4.2. Fluidización

Este proceso consiste en rociar una solución del material encapsulante en una capa fluidizada de partículas sólidas a una velocidad suficiente para suspenderlas sin que sean expulsadas de

la corriente de fluido. Las partículas a encapsular se fluidifican mediante aire caliente en una cámara de recubrimiento y, tras varios ciclos de humectación y secado, se forma una película. Este método es eficiente para partículas sólidas solubles en agua. A pesar de que es un proceso de bajo costo, es de un control complejo y normalmente las partículas producidas son de un tamaño superior ($>100 \mu\text{m}$) (Reis et al., 2022; Guignon et al., 2002).

4.4.3. Co-precipitación

Este es un método útil para sustancias no solubles en agua. Así, el huésped se disuelve en un disolvente orgánico (cloroformo, benceno, etanol o éter dietílico). Luego, se agrega una cantidad en exceso de la ciclodextrina disuelta en agua y se mantiene el sistema bajo agitación magnética y protegido de la luz. Cuando el huésped se agrega a una solución de ciclodextrina, el huésped insoluble desaparece a medida que se encapsula. La solución se enfría y se forman cristales del producto encapsulado. El polvo del complejo de inclusión del precipitado se separa por filtración o centrifugación, se lava con el disolvente orgánico para eliminar cualquier especie no encapsulada y luego se seca.

La co-precipitación se considera uno de los métodos más utilizados y destaca por su sencillez y eficiencia. Se usa comúnmente para investigaciones iniciales en laboratorio, pero debido a la gran cantidad de agua necesaria, no es adecuada para preparaciones a escala industrial (Grandelli, 2013; Rakmai et al., 2017; Cheirsilp & Rakmai, 2016; Patil et al., 2010).

4.4.4. Método de amasado

También conocido como método de pasta, esta técnica es conveniente para huéspedes poco solubles en agua. En primer lugar, las ciclodextrinas se impregnan con una pequeña cantidad

de agua destilada o con soluciones hidroalcohólicas, lo que las convierte en una pasta. El huésped líquido o sólido disuelto se agrega a la pasta y se amasa con la ayuda de un mortero, dejándolo secar. Luego, la mezcla se lava con solvente para eliminar las partículas adsorbidas en la superficie. Finalmente, el complejo de inclusión se seca al vacío (Cheirsilp & Rakmai, 2016; Patil et al., 2010).

El método de amasado es una de las técnicas más comunes y simples utilizadas para preparar complejos de inclusión que requiere una pequeña cantidad de solvente en la preparación y brinda un muy buen rendimiento de inclusión. En consecuencia, conduce a un proceso de escalamiento más fácil y costos de producción más bajos, adecuados para la producción a escala *bulk* (Hedges et al., 1995).

4.4.5. Liofilización

La liofilización, o secado en frío (*freeze-drying*) es muy recomendable para encapsular compuestos sensibles al calor, como aceites naturales, compuestos de sabor y productos farmacéuticos. Dicha técnica es un proceso que consta de etapas de congelación, sublimación, desorción y almacenamiento, lo que produce un producto seco. Así, en este método, la deshidratación del material congelado se produce bajo un proceso de sublimación al vacío y la eliminación del agua se produce sin someter la muestra a altas temperaturas. Al ser un proceso no térmico, las propiedades nutricionales y sensoriales de los nutraceuticos, sus características funcionales y su color y sabor natural se conservan por mucho tiempo. Se minimiza el deterioro y la pérdida de huéspedes volátiles debido a la oxidación o modificación química. Además, este método produce una muestra en polvo con muy buen rendimiento de inclusión (Del Valle, 2004). Sin embargo, su largo tiempo de procesamiento

(>20 h), así como los altos costos de inversión y operación reducen su aplicabilidad (Reis et al., 2022; Grandelli, 2013; Capelezzo et al., 2018).

Diversos aceites esenciales y sus compuestos activos, incluidos canela, clavo, estragol, pimienta negra, timol, tomillo y kamebakaurina, se han encapsulado en hidroxipropil- β -ciclodextrinas (HP- β CD). Kamimura et al., (2014), caracterizaron los complejos de inclusión de carvacrol con HP- β CD estableciendo las propiedades fisicoquímicas y evaluando sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Los complejos de inclusión se prepararon mediante los métodos de amasado (KN) y liofilización (FD), y la eficiencia de atrapamiento fue de $78,09 \pm 1,24$ % para KN y de $83,74 \pm 1,15$ % para FD.

4.4.6. Secado por aspersion/atomización (*spray-drying*)

Esta técnica es una de las más utilizadas para producir un complejo de inclusión altamente eficiente a partir de una solución. Se utiliza comúnmente en la industria farmacéutica para producir un polvo seco a partir de una fase líquida y también como método de conservación, aumentando la estabilidad de almacenamiento debido a la eliminación del agua. Recientemente, se ha aplicado para encapsular ácido fólico (Cheirsilp & Rakmai, 2016; Patil et al., 2010).

Este proceso consiste en preparar una emulsión acuosa con el material del núcleo y el recubrimiento. Para ello, la ciclodextrina se disuelve o suspende en agua desionizada y el principio activo se agrega a dicha suspensión como un sólido o se disuelve en un solvente. Posteriormente se realiza la homogeneización y como paso siguiente, se lleva a cabo la atomización en una cámara de secado, operado bajo condiciones específicas, como la temperatura de entrada (50–70 °C), el flujo de aire de atomización, el caudal de líquido, la

velocidad del aspirador de vacío y la concentración de sólidos, entre otros. Finalmente, las partículas atomizadas se deshidratan. La eficiencia de encapsulación usando este método depende en gran parte de la preparación de una emulsión/suspensión estable de aceite en agua y rociándola en pequeñas gotas en el lecho de secado (Reis et al., 2022; Grandelli, 2013; Cid-Samamed et al., 2022; Capelezzo et al., 2018).

Este enfoque se destaca por su costo relativamente, alto rendimiento, secado rápido y apropiado para la producción en masa dentro de la industria alimentaria. El uso del secado por aspersion para la producción de alimentos en polvo ha llamado la atención debido a la reducción del empaque, volumen de almacenamiento, costos de transporte y mayor estabilidad de los compuestos encapsulados. Además, es un proceso corto, flexible y continuo que se puede aplicar a una variedad de ingredientes alimentarios, incluidos sabores, vitaminas, minerales, carotenoides, aceites y grasas (Reis et al., 2022; Cid-Samamed et al., 2022).

Cabe destacar, que el secado por aspersion y el secado por congelación (liofilización) han proporcionado los rendimientos de inclusión más altos de los métodos convencionales de formación de complejos (Grandelli, 2013).

4.4.7. Método de evaporación de solución/disolvente

El método de evaporación del solvente se basa en la disolución del compuesto activo y el material encapsulante en un solvente adecuado. La solución se emulsiona o suspende y luego se calienta a una temperatura superior al punto de fusión del material encapsulante (Poncelet, 2006), lo que resulta en la evaporación de la fase interna de la emulsión (Capelezzo et al., 2018). Este proceso permite la encapsulación tanto de partículas hidrofílicas como

hidrofóbicas relacionadas con la fase continua por la cual las moléculas no tienen afinidad (Lee et al., 2007).

En el caso de las ciclodextrinas, específicamente, el huésped se disuelve al igual que las ciclodextrinas por separado en solventes miscibles: solución acuosa para CD y solución alcohólica para el compuesto volátil. Posteriormente, se realiza una mezcla de ambas soluciones para lograr la dispersión molecular de los agentes *host/guest* (agitación por 24 horas). Finalmente, el disolvente se evapora al vacío a 45 °C, aproximadamente, para obtener un compuesto de inclusión sólido en polvo. Este método se considera como una alternativa a la técnica de secado por aspersión debido a que es simple y económico en la producción a escala de laboratorio. Las ventajas que presenta dicha técnica son condiciones no extremas de temperatura y agitación, facilidad de uso y escalamiento industrial, menor uso de solvente residual y compuestos bioactivos sin cambios. No obstante, debido a la rápida evaporación del solvente, las cápsulas pueden verse afectadas por la formación de poros, además de posible evaporación de aceite (Reis et al., 2022).

Varios estudios de complejos de ciclodextrina producidos por este método han mostrado una mayor solubilidad y velocidad de disolución en comparación con otros métodos, como la trituración física y el método de amasado (Loh et al., 2016).

4.4.8. Técnica de molienda/co-molienda

Mediante este procedimiento, una mezcla del huésped y la ciclodextrina se somete a molienda por energía mecánica, de tal manera que los compuestos quedan atrapados entre los medios de molienda, y pueden recibir suficiente intensidad para resultar en una acumulación de energía quasi-adiabática que permite la formación de una estructura

metaestable. Este proceso de molienda da como resultado una rotura de cristales que provoca una reducción del tamaño de las partículas y un aumento de la superficie de contacto para la interacción entre el huésped y la ciclodextrina (Jug & Mura, 2018).

De esta forma, con la ayuda de dispositivos mecánicos, en este método se pueden preparar compuestos sólidos de inclusión binaria. En este caso, el aceite esencial y la ciclodextrina se mezclan en un molino oscilatorio y se muelen durante el tiempo adecuado. La molienda podría representar una técnica mejor que otros enfoques desde el punto de vista económico y ambiental, ya que no requiere solventes orgánicos tóxicos, lo que también ayuda en los problemas de solubilidad, además de su velocidad y alta eficiencia (Cheirsilp & Rakmai, 2016; Patil et al., 2010).

4.4.9. Método de irradiación de microondas

En este enfoque, utilizando un horno de microondas, es posible formar un complejo de inclusión a partir de una reacción de irradiación entre el aceite esencial y el agente complejante, los cuales se disuelven en una mezcla de agua y disolvente orgánico en una relación molar definida. La mezcla se deja reaccionar por un corto tiempo (1-2 minutos) a una temperatura aproximada de 60 °C en el horno microondas. Una vez completada la reacción, se añade una cantidad adecuada de etanol a la mezcla de reacción para eliminar el compuesto activo libre no encapsulado y las ciclodextrinas residuales. El precipitado obtenido se separa y se seca en estufa de vacío a 40 °C durante 48 horas. Esta técnica es novedosa para una preparación a escala industrial debido a los beneficios que ofrece de bajo costo, reducido tiempo de reacción, alto rendimiento del producto deseado y ausencia de

residuos derivados del uso de grandes volúmenes de solventes orgánicos (Cheirsilp & Rakmai, 2016; Patil et al., 2016; Cid-Samamed, 2022).

4.4.10. Fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico (SCF, por sus siglas en inglés) se define como una sustancia que se encuentra a condiciones de temperatura y presión por encima de sus valores críticos (T_c , P_c), en cuyo carácter ya no prevalece la distinción entre la fase gaseosa y la líquida (Kiran, 2012). En la región supercrítica, el volumen molar o la densidad se pueden alterar cambiando la presión sin pasar a la región de dos fases (Fig. 4). Esta característica permite que los SCFs funcionen como solventes ajustables, con una baja viscosidad, sin tensión superficial y alta difusividad (Grandelli, 2013). La principal ventaja de la tecnología de fluidos supercríticos radica en la posibilidad de lograr una separación perfecta del solvente supercrítico y los productos procesados, ya que un simple paso de expansión permite recuperar y reciclar el gas sin purificación adicional (Knez et al., 2014).

El dióxido de carbono, al ser una sustancia muy abundante, no inflamable, económica, no tóxica, con un alto poder solvatante que permite que diversos compuestos se solubilicen, una baja viscosidad similar a la de un gas que logra su penetración en muchos sustratos sólidos y un punto crítico bajo (31,2 °C, 7,4 MPa), determinan que se considere un fluido supercrítico (Banchero, 2020).

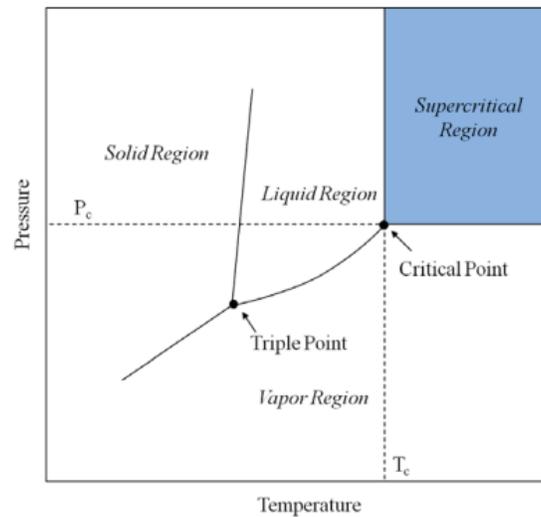


Fig. 4. Diagrama de fases para un componente fluido puro, con la región supercrítica sombreada (Kiran, 2012).

La técnica de impregnación con disolvente supercrítico se basa en la capacidad de solubilización del $scCO_2$ frente al compuesto activo o la ciclodextrina y tienen como objetivo lograr la formación de complejos *host/guest* en condiciones supercríticas antes de la despresurización (Banchero, 2021). Cabe mencionar, que su poder como solvente puede ajustarse fácilmente a través de la modulación de la densidad simplemente variando la presión o la temperatura. Así, en este proceso, el aceite esencial y la ciclodextrina se disuelven y la solución se introduce en un recipiente de impregnación bajo condiciones supercríticas. Luego, a través de esta solución se hace pasar el $scCO_2$ a temperatura y presión constantes durante un periodo fijo. De esta manera, el fluido supercrítico se difunde con una tasa alta en la solución preparada. El procedimiento termina con una rápida descompresión a presión atmosférica, que implica la gasificación del CO_2 y su separación del complejo

obtenido, ocurriendo la precipitación del soluto, como se puede observar en la Fig. 5 (Banchemo, 2020; Banchemo, 2021).

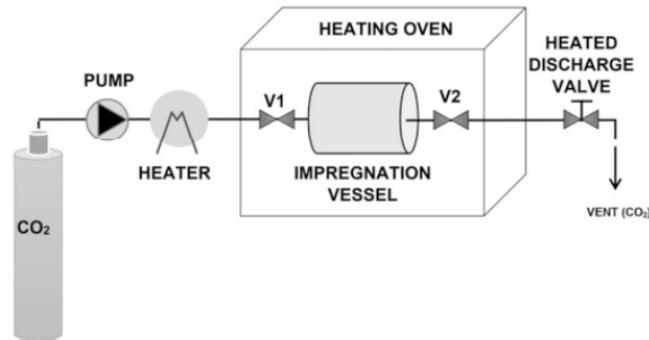


Fig. 5. Esquema simplificado de la técnica de impregnación por scCO₂. Obtenido de Banchemo (2021).

En este método, los rangos de temperatura y presión del proceso pueden variar entre 35 a 160 °C y de 10 a 45 Mpa, respectivamente, y la elección de las condiciones más adecuadas depende fuertemente de cada sistema de encapsulación. Algunos autores han relacionado un efecto positivo en el aumento de la temperatura con un cambio favorable en el equilibrio de complejación hacia el producto final (Van Hees et al., 2002; Sauceau et al., 2008).

Este enfoque es una ruta novedosa y eficiente para la mejora de la biodisponibilidad de compuestos farmacéuticamente activos, y constituye una técnica innovadora para preparar complejos en estado sólido con un buen tamaño de partícula y una oxidación o degradación térmica reducida del aceite esencial. Constituye una alternativa a las técnicas tradicionales de complejación como el amasado o la co-precipitación, que presentan algunas limitaciones que radican en el tiempo de proceso, la presencia de solvente orgánico residual o la eficiencia

de encapsulación (Banchero, 2021). Si bien este enfoque ofrece condiciones de operación versátiles como baja temperatura y atmósfera inerte, debido a su compleja combinación de dinámica de fluidos, fenómenos de transporte, termodinámica aplicada y cinética, es difícil controlar la formación de partículas (Reis et al., 2022).

4.5. Efecto de la encapsulación en las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales

4.5.1. Retención

Las ciclodextrinas muestran un efecto muy fuerte en la retención de aromas debido a la formación de complejos (Baránková & Dohnal, 2016). Varios estudios de liberación han revelado que las ciclodextrinas reducen la volatilidad, controlan y retrasan la liberación de aceites esenciales y sus componentes (Ciobanu et al., 2013). La encapsulación en β -ciclodextrina ha mejorado la retención de citral y mentol en pieles de frutas y caramelos duros, respectivamente (Reineccius et al., 2004). La retención de aceites esenciales puede ser de gran ventaja para sus componentes bioactivos que poseen un intenso olor y un alto impacto en el sabor de los alimentos en los cuales se aplican, como es el caso del aceite esencial de ajo (Wang et al., 2011).

4.5.2. Mejora de la estabilidad

Las ciclodextrinas pueden ofrecer a los aceites esenciales una vida media más larga en su cavidad apolar, asegurando un ambiente protegido y manteniendo sus propiedades, ya que las CDs no interfieren con la actividad de los compuestos volátiles. Asimismo, la encapsulación previene el desarrollo y la producción de isómeros tóxicos al reducir el

contacto entre los componentes del aceite esencial y componentes del exterior, como el oxígeno, los iones u otros ingredientes, evitando la exposición directa a la luz y preservando sus propiedades inhibitorias. Además, los complejos de inclusión pueden garantizar una buena protección a los AEs contra la degradación o evaporación, y no interfieren con los grupos funcionales de los compuestos activos (Budryn et al., 2015; Szejtli & Szente, 2005).

4.5.3. Incremento en la estabilidad química y física

Las CDs dirigen a una mejora de la estabilidad molecular, tales como la estabilidad física por el retraso del crecimiento cristalino y la estabilidad química por desaceleración o supresión de la reactividad química, como la volatilidad, la fotodegradación, la deshidratación, la hidrólisis, la sublimación, la oxidación y la descomposición térmica, así como transformaciones estereoquímicas e isomerizaciones (Marques, 1994).

Como se ha comentado, los compuestos volátiles se pueden estabilizar al ser encapsulados, reduciendo o eliminando cualquier pérdida por evaporación. La reducción de la volatilidad puede demostrarse por un aumento en el punto de ebullición de las soluciones o en la sublimación de los sólidos (Duchêne, 1986).

Los complejos de inclusión han demostrado una alta estabilidad cuando se calientan durante el procesamiento industrial de alimentos, se mantienen en equilibrio y duran más tiempo que la esencia líquida o los componentes mismos. Por ejemplo, muchas sustancias aromatizantes sufren sensibilidad a algún tipo de radiación, como el citral, que se cicla bajo irradiación UV, sufriendo, al igual que otros monoterpenos cíclicos, importantes modificaciones gustativas. Este tipo de alteración se evita mediante la encapsulación en β -CD. Dicho efecto se encuentra más acentuado en materiales en estado sólido que en

soluciones acuosas, donde una pequeña parte de la molécula huésped se libera del complejo (Astray et al., 2009).

El carvacrol, el timol y el eugenol, los cuales son componentes de los aceites esenciales de origen vegetal, se oxidan, descomponen o evaporan cuando se exponen al ambiente. Si se preparan como encapsulados en β -CD, se pueden estabilizar y su volatilidad, oxidación y descomposición por calor disminuye (Locci et al., 2004). Por lo tanto, los complejos de inclusión de CDs mejoran la vida útil de los productos alimenticios al protegerlos contra la descomposición inducida por parámetros externos no controlables como la luz, el aire y el calor.

4.5.4. Incremento en la solubilidad, la disolución y la tasa de liberación

La encapsulación puede resultar en una mayor humectabilidad y/o una marcada reducción en el tamaño del cristal (Marques, 1994). De acuerdo con Locci et al. (2004), los aceites esenciales de carvacrol, timol y eugenol han demostrado un incremento en su solubilidad en agua, cuando se encapsulan en β -CDs mediante la técnica de $scCO_2$ (fluidos supercríticos).

4.6. Caracterización de los complejos de inclusión

La estructura, propiedades y comportamiento de los complejos de ciclodextrina pueden caracterizarse y estudiarse mediante diversas técnicas. Se pueden evaluar el tipo de interacciones entre las moléculas *host/guest*, la capacidad de la CD para atrapar al huésped en su cavidad, la disolución, el análisis térmico, entre otros, al analizar cualquier variación de las propiedades físicas o químicas de la molécula huésped por la formación de complejos

de inclusión (Marques et al., 2019; Mura, 2014). Los compuestos de inclusión de CD se han caracterizado mediante técnicas térmicas y espectroscópicas. Los análisis espectroscópicos incluyen espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear (RMN), fluorescencia y ultravioleta-visible (UV-Vis). Por su parte, las técnicas analíticas térmicas comúnmente empleadas incluyen el análisis termogravimétrico (TGA) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Otras técnicas de caracterización incluyen la difracción de rayos X en polvo (DRX) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de huéspedes.

Por lo general, lo que se realiza es que los espectros o patrones de los compuestos puros (CD pura y compuesto activo puro, por ejemplo, aceite esencial) se comparan con los de sus mezclas físicas y las los complejos formados para determinar si se han producido cambios. La difracción de rayos X y la microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizan para identificar estructuras cristalinas e investigar cambios morfológicos de los materiales procesados, respectivamente, pero no brindan una evaluación sobre la verdadera formación del complejo. En su lugar, se utiliza la interpretación de los análisis FTIR, DSC y TGA para determinar la creación del encapsulado deseado (Banchero, 2021).

4.6.1. Técnicas espectroscópicas

Todos los métodos espectroscópicos se basan en la medida de una variación en una determinada propiedad (absorbancia, desplazamiento RMN, intensidad de fluorescencia, etc.) del sistema. Por lo tanto, es necesario que esta variación pueda ser detectable con suficiente precisión. Estos métodos suelen consistir en trabajar con una concentración de huésped fija y variar la concentración de la CD, lo que requiere la preparación de una gran

cantidad de soluciones de muestra. Esto implica una considerable inversión de tiempo y material, y podría ser una desventaja en las fases iniciales de desarrollo (Mura, 2014).

4.6.1.1. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

Este método es de gran utilidad para estudiar la formación de complejos host/guest en solución, cuando la complejación da lugar a una modificación significativa del espectro de absorción de la molécula huésped. Dependiendo de la posición del cromóforo del compuesto activo, la transferencia de la molécula huésped desde un medio acuoso a la cavidad del CD no polar puede modificar su espectro de absorción UV original, debido a las nuevas interacciones del entorno del huésped. Por lo general, se pueden observar desplazamientos batocrómicos y ensanchamiento de las bandas como consecuencia de la formación del complejo de inclusión (Mura, 2014). Esto se puede explicar por un blindaje parcial de los electrones excitables en la cavidad CyD. La alta densidad de electrones dentro de la cavidad de CD moviliza los electrones de la molécula huésped atrapada (Marques, 2010). A pesar de que la espectroscopía UV-Vis es sencillo, económico y rápido, este método no es específico y puede registrar la presencia de sustancias que interfieren y no proporciona una evidencia directa de la formación real del complejo de inclusión (Mura, 2014).

Rakmai et al. (2017), realizaron un estudio donde el aceite de milenrama se encapsuló en hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) mediante la técnica de liofilización. Cuando los compuestos activos en aceite de milenrama o carvacrol se atraparon con HP- β CD, los picos de absorción de cada compuesto del aceite esencial también desaparecieron en el espectro de los complejos de inclusión.

4.6.1.2. Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

Los espectros de esta técnica indican el tipo de interacción intramolecular y/o intermolecular entre el principio activo y la ciclodextrina. La formulación se puede evaluar en el rango de 4000–400 cm^{-1} . En la comparación entre el compuesto volátil, la CD pura, la mezcla física de compuesto volátil/CD y el complejo de inclusión, el espectro de la mezcla física es una superposición de los espectros de cada componente puro. El cambio en los picos hacia un número de onda más alto o más bajo en los complejos de inclusión indica la formación de enlaces de hidrógeno entre los aceites esenciales y la ciclodextrina (Menezes et al., 2012). Además, las intensidades de los picos pueden cambiar y algunos de ellos pueden desaparecer debido a la interacción de la CD y el compuesto activo (Grandelli, 2013).

Sin embargo, esta técnica no se ha considerado la más adecuada para confirmar la encapsulación ya que los espectros de los complejos de inclusión no presentan bandas representativas y esclarecedoras, sino solo diferencias muy sutiles en los espectros, desfavoreciendo la interpretación de los resultados (Marques et al., 2019).

4.6.1.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopia de RMN es considerada una de las técnicas más efectivas, completas y directas para evidenciar la formación de un complejo de inclusión en solución (Mura, 2014). Se emplea ampliamente para elucidar la estructura, el alojamiento geométrico y orientación del huésped dentro de la cavidad apolar de la CD, así como la determinación de la estequiometría, la estabilidad y el mecanismo del complejo de inclusión, así como su valor constante de formación (K_f) en una solución acuosa (Schneider et al., 1998; Mura, 2014).

Esta técnica se basa en los desplazamientos químicos de protones (^1H RMN) o carbonos (^{13}C RMN) entre el huésped libre y la CD, y el complejo de inclusión formado. Al encapsular correctamente el huésped, el entorno físico o químico de éste y la cavidad se verán afectados, lo que provocará una modificación de los espectros de RMN (Tsao et al., 2010). Así, si se incorpora una molécula huésped a la CD, los átomos de hidrógeno ubicados en el interior de la cavidad (C-3-H y C-5-H) estarán protegidos por la molécula encapsulada y mostrarán un cambio significativo hacia arriba, mientras que los átomos de hidrógeno en la superficie exterior (C-2-H, C-4-H y C-6-H) no se verán afectados o mostrarán un ligero cambio hacia arriba. Además, a partir de los espectros de ^{13}C -RMN (que pueden obtenerse en soluciones acuosas) se puede determinar qué átomos de la molécula huésped participan en la estabilización del complejo y también cómo están orientados (Marques, 2010).

Este enfoque se fue utilizado por Locci et al. (2004), quienes prepararon complejos de inclusión de β -ciclodextrina (β -CD) con carvacrol, timol y eugenol mediante la técnica de scCO_2 , y su caracterización estructural se logró mediante ^1H NMR en solución acuosa, comprobando la formación de los complejos de inclusión para todos los sistemas examinados.

4.6.1.4. Espectroscopía de fluorescencia

Mediante este método se puede investigar la formación de complejos de inclusión de huéspedes fluorescentes y determinar su geometría de complejación. Normalmente, tras la formación de un complejo se observa un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia y el máximo de emisión se desplaza hacia longitudes de onda más cortas, debido a la protección que brinda la CD a la molécula huésped contra los procesos de extinción y de descomposición

no radiactiva. A pesar de que esta técnica es simple y muy sensible, se limita únicamente a moléculas fluorescentes, la preparación de las muestras a estudiar es compleja y se requiere de gran cuidado para evitar interferencias (Marques, 2010; Mura, 2014).

4.6.2. Técnicas térmicas

En este grupo, DSC y TGA proporcionan información sobre las propiedades físicas y energéticas de las muestras, lo que puede ser una señal de las interacciones de los compuestos. Aunque los análisis de DSC se utilizan para cuantificar el rendimiento de inclusión de las formulaciones obtenidas, no permite distinguir si las moléculas del principio activo realmente se han incluido en la cavidad de la CD o simplemente se han dispersado en la ciclodextrina en su estado amorfo (Mura, 2014).

4.6.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica termoanalítica que permite determinar el cambio de entalpía de un material, ya sea en el modo de compensación de flujo de calor o de potencia. Permite estudiar el cambio de propiedades físicas y químicas en función de la temperatura y determinar la capacidad calorífica, teniendo una alta sensibilidad a procesos exotérmicos y endotérmicos (Yang & Hedin, 2022). DSC se considera una técnica confiable para investigar el proceso de encapsulación en estado sólido debido a su sensibilidad para detectar cambios en los perfiles termoanalíticos de las muestras (Giordano et al., 2001; Karathanos et al., 2007).

El comportamiento térmico de los aceites esenciales como el punto de fusión y la el cambio de formulación por el calor se puede estudiar. Luego, los cambios en el punto de

fusión durante la formación de complejos de inclusión indican el atrapamiento de las moléculas huésped dentro de las ciclodextrinas. Como podemos observar en la Fig. 6, el termograma obtenido durante el análisis térmico explica el comportamiento endotérmico o exotérmico del compuesto activo y la formación de nuevos compuestos (Xu et al., 2018). Si el aceite esencial se ha incluido en la cavidad de la molécula de la CD, se observará un desplazamiento o ensanchamiento de los picos, así como la aparición de nuevos picos que no se aprecian en los escaneos de calentamiento del principio activo puro o de la CD pura. Por su parte, la desaparición de los eventos térmicos de las moléculas huésped cuando se examinan como complejos de CD, generalmente se toma como una prueba de inclusión real, debido a la incapacidad del huésped para cristalizar mientras está aislado en las cavidades de las ciclodextrinas. Sin embargo, la ausencia del pico de fusión del compuesto volátil indica que éste se ha vuelto amorfo y no indica definitivamente que un complejo de inclusión sea la causa de la amorfización del dicha sustancia (Karathanos et al., 2007; Grandelli, 2013).

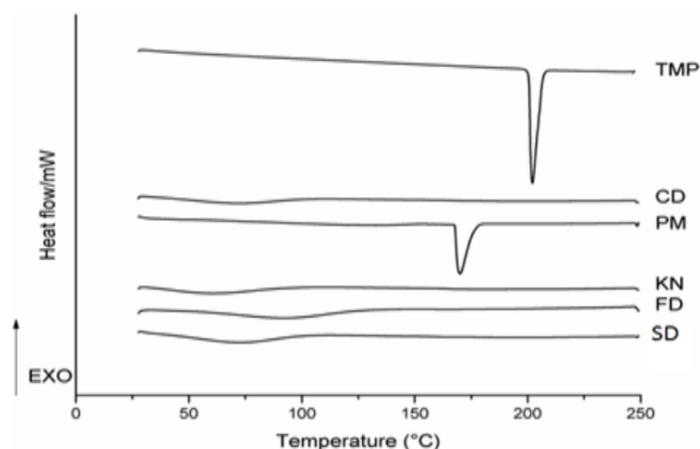


Fig. 6. Termogramas de DSC de molécula huésped cristalina, trimetoprima (TMP), que forma un complejo con metil-beta-ciclodextrina ($M\beta$ -CD). Se tomó como referencia un sistema de mezcla física (PM), y se encapsuló por las técnicas de amasado (KN),

liofilización (FD) y atomización (SD). Las curvas en TMP y PM indican el pico de fusión del fármaco. Obtenido de Figueiras et al. (2015).

4.6.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los métodos de análisis térmico incluyen análisis termogravimétrico (TGA) y termoanálisis diferencial (DTA). TGA registra la masa de la muestra en función del tiempo y permite evidenciar aquellas transformaciones térmicas que van acompañadas de pérdida de masa como absorción, desorción, descomposición, oxidación, reducción o calcinación. Por otra parte, el DTA mide los efectos térmicos, ya sean endotérmicos o exotérmicos, y puede detectar fenómenos que no van acompañados de cambios de masa, como las transiciones de fase (Lambert, 2018; Yang & Hedin, 2022).

Se sabe que la formación de complejos de inclusión mejora la estabilidad térmica de moléculas de compuestos activos térmicamente lábiles. Por ello, las temperaturas de degradación térmica de los complejos de inclusión pueden observarse a temperaturas superiores a la temperatura de degradación térmica del aceite esencial puro (Fig. 7). Esto se explica debido a que el aceite esencial y la ciclodextrina tienen cada uno un inicio de degradación térmica único. En un compuesto de inclusión de CDs, la degradación térmica del principio activo se desplaza a una temperatura más alta ya que el fármaco está protegido y estabilizado en la cavidad de la CD (Grandelli, 2013).

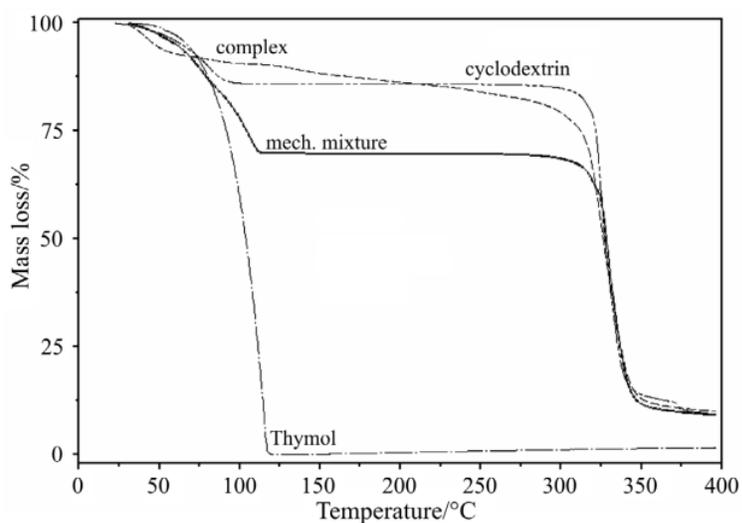


Fig. 7. Caracterización de TGA de un AE (timol) que forma un complejo con CD. Se aprecia la pérdida de masa para el AE puro, CD pura, la mezcla física y el complejo de inclusión. Obtenido de Fernandes et al. (2004).

4.6.3. Otras técnicas

4.6.3.1. Análisis de difracción de rayos X (XRD)

XRD es una caracterización de estado sólido, en el que se realiza un análisis estructural basado en la dispersión de rayos X en las muestras, lo que permite examinar la estructura de estado sólido del material. Diversos cambios en la intensidad y desplazamiento de los picos pueden indicar la formación de una nueva estructura sólida (Xu et al., 2017; Gao et al., 2015; de Araújo et al., 2017).

Este es un método cristalográfico rápido y fácil que permite la verificación de la encapsulación. Las CDs, en su estado cristalino, forman enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares que estabilizan la conformación de la molécula y su estructura, generando difractogramas bien definidos. Si ocurre una complejación, la

crystalinidad de las partículas se reduce, con cambios en los perfiles de difracción de la muestra (Raov et al., 2013; Abarca et al., 2016). El patrón de difracción de una mezcla física suele ser la suma del patrón de cada componente, mientras que los difractogramas de los compuestos de inclusión muestran un nuevo patrón que no se ve en los componentes puros. A menudo, en el patrón de difracción de un compuesto de inclusión se observa un pico amplio y suave que indica la presencia de un compuesto amorfo ausente de cristalinidad. Esto generalmente se toma como una indicación de un complejo de inclusión formado. Aunque se observan algunos cambios en la cristalinidad si está presente un complejo, es importante considerar las transformaciones polimórficas que pueden ocurrir en las moléculas del compuesto activo durante el proceso de formación del complejo (Grandelli, 2013).

Según Narayanan et al. (2017), los picos característicos en 2θ para β -CD suelen aparecer aproximadamente en 9,1, 12,6, 22,5, 26,9, 31,9 y 34,7°Å, lo que indica un alto grado de cristalinidad. Además, se observa un ensanchamiento sustancial del pico en los difractogramas obtenidos para todos los compuestos de inclusión, especialmente en el caso de las muestras liofilizadas, lo que confirma la hipótesis de complejación con interacciones más eficientes por este método.

4.6.3.2. Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada para determinar la composición de sustancias químicas midiendo con precisión sus masas moleculares (Romanova et al., 2016).

Ésta se ha convertido en una herramienta útil para la elucidación de pesos moleculares, estequiometrías e incluso interacciones no covalentes dentro de ensamblajes

supramoleculares, proporcionando ventajas sobre los diferentes métodos analíticos en términos de sensibilidad y velocidad. La técnica se ha aplicado para proporcionar información sobre la encapsulación de estructuras orgánicas, ferroceno y sus derivados, así como metallocenos en ciclodextrinas (Bruni & Schürch, 2021).

4.6.3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta microscopía es de gran utilidad para visualizar y analizar los cambios en la morfología superficial de diferentes complejos de formación, mostrando el tamaño y la forma de los complejos de inclusión (Xu et al., 2017).

5. Metodología

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Materiales

El aceite de tomillo utilizado era de calidad alimentaria y se obtuvo del Departamento de Ingeniería en Industrias Alimentarias, manteniéndolo en frascos oscuros tapados hasta su uso. La beta-ciclodextrina hidratada (β -CD) se adquirió de Sigma-Aldrich. Otros solventes y reactivos como el etanol y ácido clorhídrico fueron grado analítico del Departamento de Ciencias Químicas-Biológicas de la Universidad de las Américas Puebla.

5.1.2. Preparación de los complejos de inclusión de β -CD

En este estudio, se prepararon complejos de inclusión de TEO con β -CD en una proporción molar 1:1. El método de amasado y de liofilización se utilizaron como técnicas de complejación debido a su eficacia y buen rendimiento en procedimientos encontrados en la

literatura. También se utilizó el método de CO₂ supercrítico debido a su ventaja de no utilizar ningún disolvente orgánico y de preparar complejos en estado sólido.

5.1.2.1. Método de amasado

Los complejos de inclusión se prepararon de acuerdo con las metodologías descritas por Tao et al. (2014) y Marques et al. (2019), con algunas modificaciones que se describen a continuación.

- Agua como solvente

El aceite de tomillo fue añadido a una suspensión de β -CD en una relación molar 1:1 (0,1 mmol:0,1 mmol), utilizando una cantidad de 104,6 mg de β -CD, 0,10 mL de agua y 0,014 mL de TEO. De esta forma, se amasaron en un vaso de precipitados pequeño hasta obtener una pasta blanca homogeneizada. A continuación, el sólido obtenido se secó en un desecador durante 5 días a temperatura ambiente. El polvo se almacenó en un congelador a -20 °C hasta su uso posterior.

- Etanol como solvente

En este caso, se utilizó el método anterior con la modificación de utilizar únicamente etanol como solvente (0.10 mL).

5.1.2.2. Método de liofilización

- Agua como solvente

Este método se realizó de acuerdo con lo descrito por Marques et al. (2019). Se añadió aceite de tomillo (0,14 mL) a una solución saturada de β -CD previamente homogeneizada, a

concentraciones equimolares (1 mmol:1 mmol), y se agitó magnéticamente en un recipiente sellado durante 48 horas a temperatura ambiente (25 °C). Después de mezclar, la solución se congeló a -80 °C durante 24 horas y se liofilizó a -85 °C a 0,010 mbar en un equipo LABCONCO Freezone 6 L -84 °C hasta sublimar toda la mezcla. El polvo liofilizado resultante se almacenó en un contenedor Falcon sellado en un congelador a -20 °C hasta su uso posterior.

- Solución de etanol/agua como solvente

Este método se preparó de acuerdo con Tao et al. (2014). De esta manera, se tomaron concentraciones equimolares de β -CD y TEO (1 mmol:1 mmol), dispersando 1135 mg de β -CD en 11,35 mL de solución de etanol-agua (1:3 v/v) a temperatura ambiente bajo agitación constante durante 30 min. La misma cantidad de TEO descrita en la Sección 5.1.2.2.1 se solubilizó en etanol al 10% (v/v), en la proporción de 1 g de TEO por 10 mL de solución de etanol y se agregaron a la mezcla de β -CD. Dicha mezcla fue agitada magnéticamente, congelada, liofilizada y almacenada en las mismas condiciones que la técnica descrita anteriormente.

5.1.2.3. Fluidos supercríticos (scCO₂)

Los complejos de inclusión se prepararon de acuerdo con lo descrito por Locci et al. (2004) y Pires et al. (2018) con algunas modificaciones. Para ello, se procesó en una unidad supercrítica a escala de laboratorio una mezcla física sólida de 1,24 mL de TEO y 9,003 g de β -CD (1:1). Las muestras se trataron bajo un rango de presión de 80-90 bar (que corresponde a las condiciones de mayor solubilidad de los aceites esenciales en CO₂ supercrítico), un flujo de 90 mL/min y una temperatura de 50 °C con un tiempo de contacto de 6 horas. Todas estas

condiciones fueron controladas mediante un barómetro y una banda térmica localizada alrededor del tubo contenedor. Asimismo, se adicionaron unas perlas metálicas a la mezcla sólida con el objetivo de aumentar la superficie de contacto del complejo y el gas, las cuales fueron removidas al finalizar el proceso mediante un tamiz. Cabe mencionar que tomó aproximadamente 3 horas para alcanzar la presión y temperaturas deseadas. De esta manera, el CO₂ supercrítico actúa como solvente para las moléculas huésped y juega un papel importante en la complejación debido a su alta difusividad y baja viscosidad.

5.2. Caracterización fisicoquímica

5.2.1. Análisis químico

El aceite esencial de tomillo se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La muestra se analizó con un cromatógrafo de gases en red (6850, Agilent Technologies) acoplado a un detector selectivo de masas (5975 C VL, Agilent Technologies), con eje triple y un inyector *split-splitless* (relación de división 1:10). El flujo del gas portador helio se fijó en 1,1 mL/min. Las muestras se prepararon diluyendo el aceite esencial a 5:100 (v/v) en etanol y el volumen de inyección fue de 1 µL. Los derivados se separaron en una columna capilar de sílice fundida (30 m por 0,250 mm; espesor de película, 0,25 µm; Agilent J&W) HP-5MS (5% de fenilo–95% de polidimetilsiloxano). La temperatura del horno de columna se programó de 60 °C (4 min) a 240 °C (10 min) a 4 °C/min. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 250 y 280 °C, respectivamente. Los componentes del aceite se identificaron comparando con los espectros de masas de compuestos puros y el perfil de masas de los mismos compuestos disponibles en la biblioteca del Instituto Nacional de Tecnología Estándar (NIST) de EE. UU.

5.2.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR de TEO, β -CD y los complejos de inclusión se recolectaron a temperatura ambiente en el rango de la región del infrarrojo medio de 650 a 4000 cm^{-1} utilizando un espectrofotómetro Cary 630 (Agilent Technologies) acoplado a un accesorio para analizar la reflectancia total atenuada (ATR) a una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros obtenidos fueron procesados por el software Agilent MicroLab.

5.2.3. Análisis térmogravimétrico (TGA/DTA)

Para identificar la degradación de las ciclodextrinas, la evaporación del aceite de tomillo y la formación del complejo de inclusión, se realizaron curvas termogravimétricas (TGA/DTA) en una termobalanza NETZSCH STA 2500, en atmósfera dinámica de nitrógeno (10 mL min^{-1}), a velocidad de calentamiento de 10 K/min en el rango de temperatura de 30-600 $^{\circ}\text{C}$, utilizando crisoles de dióxido de aluminio (Al_2O_3), con aproximadamente 10 mg de muestras sólidas.

5.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las microestructuras de los polvos de los complejos de inclusión se analizaron utilizando el microscopio electrónico de barrido MAIA3 TESCAN, con un potencial de aceleración de 10 kV. Las muestras sólidas se montaron en trozos adheridos con cinta de grafito para influenciar la conducción.

5.2.5. Eficiencia de encapsulación

Se llevó a cabo la metodología descrita por Rezaei et al., (2021). Para ello, se disolvieron 10 mg del complejo β CD-TEO, así como la cantidad equivalente de CD contenida en la muestra

(~8,73 mg) en 10 mL de etanol y se agitaron durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las soluciones se sonicaron durante 10 min a temperatura ambiente y después de centrifugarlas a 2000 rpm durante 10 min, se determinó su absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV (Cary 60) a 274 nm. Se utilizó una celda de de cuarzo y la muestra en blanco fue una dispersión de la cantidad fija tomada de CD. La cantidad (μL) de TEO se determinó según la curva de calibración del espectrofotómetro realizada con diferentes concentraciones del aceite. La eficiencia de encapsulación (EE) de TEO se determinó utilizando la Eq. 3.

$$EE = \frac{\text{cantidad de TEO encapsulado}}{\text{cantidad inicial de TEO}} \times 100$$

(Eq. 3)

5.3. Estudios de actividad antimicrobiana

5.3.1. Cepas bacterianas

Se obtuvieron precultivos ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, glicerol 1:1, v/v) de cepas bacterianas (*Listeria monocytogenes* Scott A y *Escherichia coli* ATCC 25922) de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP, México, Puebla). Cada cepa se cultivó ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h) en Tryptic Soy Broth (TSB; Difco, BD, Sparks, MD) y el inóculo se ajustó aproximadamente a 105 CFU/mL por dilución por recuento en placa.

5.3.2. Ensayos antimicrobianos

A partir del complejo de inclusión de β -CD/TEO obtenido por el método de $scCO_2$, se tomaron diferentes cantidades (0,25 y 0,50 g) y se solubilizaron en etanol al 99%, obteniendo concentraciones de 25 y 50 mg/ml, respectivamente. Se utilizó la técnica de difusión en disco de agar con papel filtro. Para ello, se dispensaron papeles filtro blancos estériles de 5 mm de diámetro sobre la superficie de placas petri de agar Mueller-Hinton (previamente sembradas por esparcimiento con los inóculos *L. monocytogenes* y *E. coli*). Luego, se agregaron 100 μ L de cada tratamiento. Cabe mencionar que se trabajó en un medio neutro (pH 7,0) tanto en el agar como en la solubilización del complejo. Se usaron como control placas inoculadas con la bacteria sin la adición del complejo de inclusión. Esto se realizó por duplicado. Las placas se invirtieron y se colocaron en una incubadora a 35 °C por 24 h. Después del tiempo de incubación, se examinó cada placa y se midieron las zonas de inhibición resultantes.

Como segundo ensayo, se tomaron las mismas cantidades del complejo β -CD/TEO que en el primer ensayo y se solubilizaron a un pH 5,0 (para promover la liberación del EO) por medio del *buffer* McIlvaine que contenía ácido cítrico 0,1 M y fosfato de sodio dibásico 0,2 M, y se mantuvo en agitación durante 5 min. Posteriormente, se dejó reposar en el solvente por 5 días, aproximadamente, para promover su liberación. Se utilizó la técnica de difusión en pozo de agar para investigar la actividad antimicrobiana de cada muestra. El método se basó en las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute para el método de difusión en disco (CLSI, 2015) con modificaciones sugeridas por Magaldi et al. (2004). Para ello, se preparó agar tripticaseína soya (TSA) y luego de la esterilización se ajustó a pH 3,0 y pH 5,0 con ácido clorhídrico (HCl). Por lo tanto, se hicieron pozos de 10 mm de diámetro después de la solidificación de TSA. Los inóculos estandarizados de *L.*

monocytogenes y *E. coli* se inocularon en la superficie del agar utilizando una varilla de vidrio estéril. Posteriormente, se agregaron a los pozos 100 μ L de cada complejo de inclusión. Se usaron como control placas inoculadas con la bacteria sin la adición de β -CD/TEO. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo los diámetros (en mm) de la zona clara de inhibición del crecimiento. Dichas pruebas se realizaron por triplicado.

6. Resultados y discusión

6.1. Composición de TEO

A partir del análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se encontraron 51 componentes en el aceite esencial de tomillo estudiado. Entre los principales compuestos se encuentran linalol y carvacrol, constituyendo aproximadamente el 50%. Asimismo, se distinguen ρ -cimeno (17.19%), óxido de cariofileno (6.46%) y timol (4.39%). En la Tabla 3 se presentan dichos componentes químicos mayoritarios con sus respectivos porcentajes. Asimismo, se encontraron más compuestos presentes en menor proporción, como el γ -terpineno (2.65%), canfeno (2.44%) y β -pineno (1.22%) (Anexo 1).

Tabla 3. Principales componentes del aceite esencial de tomillo de acuerdo con el análisis de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).

Componente	Área (%)
Linalol	25.84
Carvacrol	24.25
ρ -cimeno	17.19
Óxido de cariofileno	6.46

Timol	4.39
1R-alfa-pineno	3.35

De acuerdo con diversos reportes, los principales componentes del aceite esencial *T. vulgaris* es el timol, seguido de γ -terpineno y p -cimeno (Borugă et al., 2014; Abozid & Asker, 2013). Así, los principales componentes del TEO en los trabajos mencionados son compuestos fenólicos, responsables del aroma de la sustancia (Baranauskienė et al., 2003). Como se puede observar, existe una gran diferencia respecto a las proporciones de los componentes reportados en la literatura y los que se analizan en este estudio, en el cual también se encontraron alcoholes monoterpénicos, como el carvacrol, linalol y p -cimeno. Aunque el porcentaje obtenido de compuestos químicos detectados difiere de otros estudios, varios componentes detectados en el aceite esencial de tomillo, como linalol, timol, carvacrol, α -pineno y p -cimeno, concuerdan con informes anteriores. Reyes-Jurado et al. (2022), identificaron un total de 15 compuestos por CG-MS en TEO, siendo p -cimeno (19,80%), linalol (14,61%) y timol (12,13%) los principales componentes, lo que demuestra las variaciones que puede tener el TEO.

Adicionalmente, también existen parámetros que pudieron haber influido en la composición del aceite esencial de tomillo, causando variaciones en las proporciones de los componentes, como la planta de origen, su etapa de desarrollo, su localización, el periodo de cosecha, la técnica de extracción, y principalmente el quimiotipo, ya que influyen en las vías biosintéticas de la planta y, en consecuencia, en la proporción de los principales compuestos característicos (Abozid & Asker, 2013). De acuerdo con Baranauskienė et al. (2003), los fertilizantes nitrogenados tienen una pequeña influencia en el rendimiento del cultivo, así

como en la producción y composición del aceite esencial y algunas otras características químicas del tomillo. Asimismo, debido a que la sustancia tuvo un periodo de almacenamiento prolongado, puede ser que algunos compuestos se hayan transformado en otros o se hayan degradado con el paso del tiempo.

Con respecto a los quimiotipos, en un trabajo realizado por Satyal et al. (2016), se tomaron 85 composiciones de aceite esencial de *T. vulgaris* para realizar un análisis jerárquico de conglomerados, y el estudio reveló hasta 20 quimiotipos diferentes del aceite de tomillo. El quimiotipo con más muestras (39) fue el timol, que había sido reconocido previamente. Otros quimiotipos previamente estudiados fueron el quimiotipo geraniol; con tres muestras representativas; el quimiotipo linalool, con cuatro muestras; y el quimiotipo carvacrol, con dos muestras, entre otros. Otros quimiotipos identificados incluyen el conjunto linalool/carvacrol/p-cimeno, el cual se puede encontrar en el presente estudio.

6.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

FT-IR es una técnica adecuada para evidenciar la formación de los complejos de inclusión β -CD/TEO, debido al cambio o desaparición de las vibraciones de estiramiento y flexión de los grupos funcionales de la molécula huésped una vez complejados, así como la alteración de la intensidad y ubicación de las bandas de la β -CD. Sin embargo, su aplicación es limitada cuando la masa de la molécula huésped no supera el 5-15% de la masa del complejo porque las alteraciones suelen estar enmascaradas por el espectro de CD (Friné et al., 2019; Marques, 2010). En la Fig. 10 se pueden visualizar los espectros FT-IR de las muestras puras y complejadas. En este estudio, se trabajó con las muestras obtenidas por las técnicas de liofilización y fluidos supercríticos (FD-1, FD-2 y scCO₂).

Con respecto a β -CD, en el espectro se puede observar una banda ancha característica en 3265 cm^{-1} asignada a las vibraciones de estiramiento de -OH. El pico a 2922 cm^{-1} pertenece a vibraciones de estiramiento simétricas/asimétricas C-H (Sun et al., 2021). La banda de absorción a 1645 cm^{-1} corresponde a la flexión de H-O-H (bandas de deformación del agua presente en la cavidad) (Abarca et al., 2016; Pires et al., 2019). El pico centrado en 1418 cm^{-1} está formado por la superposición de las vibraciones de tijera (*scissoring*) -CH₂ y cabeceo (*wagging*) con el -OH en las bandas de flexión. La región entre 1180 y 1000 cm^{-1} se puede asignar al estiramiento de los enlaces glucosídicos C-O-C y C-OH (Durante et al., 2020). La banda ancha centrada en 1021 cm^{-1} y la de 1073 cm^{-1} están asociadas con las vibraciones del enlace de estiramiento simétrico C-O-C, mientras que la banda en 1148 cm^{-1} está asociada con las vibraciones asimétricas de C-O-C (El Kharraf et al., 2021; Abarca et al., 2016; Wang et al., 2014).

Para TEO, los picos característicos se visualizaron en una banda muy ancha en 3352 cm^{-1} debido al estiramiento de los grupos O-H enlazados con H en agua de hidratación o alcohol y fenol, 1418 cm^{-1} (vibración de flexión -OH), y 1224 cm^{-1} (vibración de flexión C-O). De acuerdo con el análisis de Cantauro et al. (2017), las bandas en 2959 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} y 2868 cm^{-1} corresponden a estiramientos C-H asimétricos y simétricos en grupos alifáticos -CH₃. Su flexión asimétrica y simétrica provoca la señal en el rango entre 1457 - 1380 cm^{-1} . Además, las señales en el rango 1617 - 1582 cm^{-1} (señal de estiramiento C=C-C) y los picos en las regiones 1224 - 944 cm^{-1} y 855 - 806 cm^{-1} , relacionados con C-H aromático con flexión dentro y fuera del plano, respectivamente, prueban la presencia de anillos aromáticos, relacionados con los compuestos fenólicos del TEO como el timol y/o el carvacrol. Así, la presencia de estos compuestos se confirma a partir de las señales típicas de la función

fenólica, como la flexión de los grupos O–H en el rango de 1334–1239 cm^{-1} , las bandas de absorción de C–OH que se extienden a 1151 y 1058 cm^{-1} y los picos por a la flexión fuera del plano O–H en la región 738–691 cm^{-1} (Rezaei et al., 2021; Catauro et al., 2017).

De acuerdo el espectro de Schulz et al. (2005), las bandas de vibración del anillo de timol y carvacrol se observaron a 804 cm^{-1} y 811 cm^{-1} , respectivamente. En los espectros FT-IR del presente estudio, solo se observó el pico característico de carvacrol a 806 cm^{-1} , evidenciando que el aceite de tomillo investigado era del tipo carvacrol (Altiok et al., 2010). Esta banda surge de la superposición de las bandas de timol y ρ -cimeno (804 y 813 cm^{-1}) y se puede atribuir a vibraciones oscilantes del -CH fuera del plano, que son las señales más importantes utilizadas para distinguir las sustituciones en los anillos aromáticos (Agnieszka et al., 2013).

En el análisis FT-IR de los complejos de inclusión, los espectros obtenidos tuvieron unas grandes similitudes con el espectro de β -CD pura, ya que se observaron todos los picos pertenecientes a β -CD y los picos característicos de TEO desaparecieron. Los desplazamientos de las bandas de absorción características de TEO y β -CD con respecto a su espectro en su forma pura indican la presencia de TEO en el complejo de inclusión y su interacción con β -CD (Adjali et al., 2022). Sin embargo, de acuerdo con Abarca et al. (2016), una ausencia de modificaciones de las señales asociadas con β -CD por la presencia de compuestos activos puede explicarse debido a un bajo contenido de TEO dentro de la ciclodextrina o una interacción débil entre ambos compuestos, lo que podría concordar con los resultados de la eficiencia de encapsulación.

No obstante, en los espectros de los complejos de inclusión se detectaron ciertas interacciones entre TEO y β -CD que aparecieron o desaparecieron en el rango de 1700–1200

cm^{-1} . La vibración de flexión (1224 cm^{-1}) de TEO mostró un cambio en $\beta\text{-CD}/\text{TEO}$ y apareció a 1237 cm^{-1} (con una intensidad más baja) para las tres muestras analizadas, y puede estar relacionado con la interacción del grupo C-O de TEO con $\beta\text{-CD}$. Otro pico característico de TEO a 1418 cm^{-1} se desplazó y disminuyó su intensidad en $\text{TEO}/\beta\text{-CD}$, apareciendo alrededor de 1438 cm^{-1} (vibración de flexión -OH). Las interacciones entre TEO y $\beta\text{-CD}$ pueden deberse a los enlaces de hidrógeno entre los grupos -OH de los componentes de TEO (como timol y carvacrol) y los grupos -OH de la ciclodextrina (Rezaei et al., 2021).

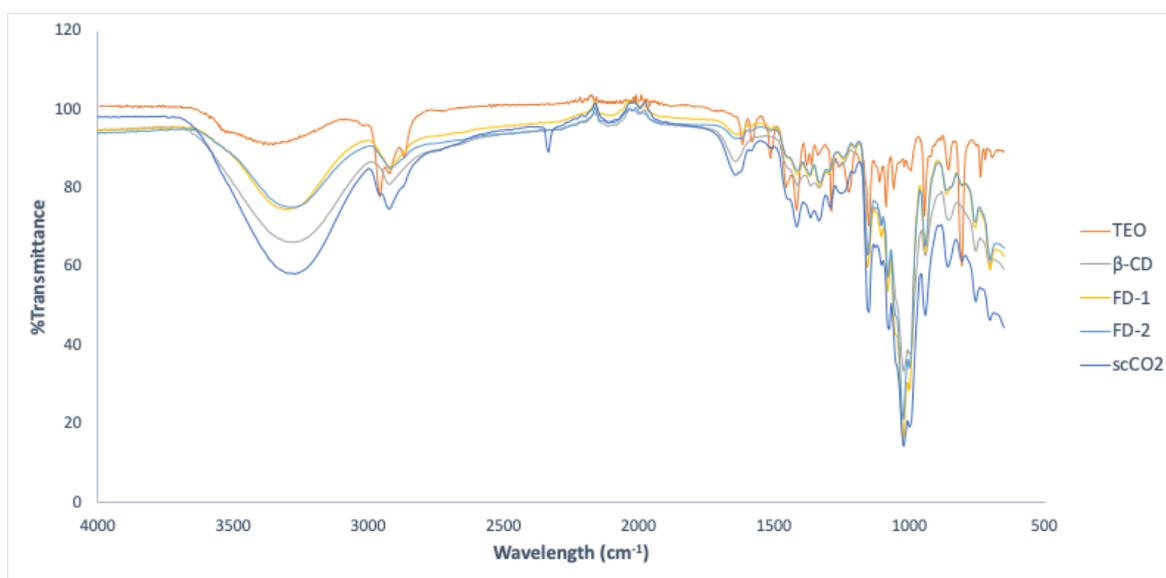


Fig. 10. Análisis FT-IR de TEO, $\beta\text{-CD}$ y los complejos de inclusión.

6.3. Análisis termogravimétrico (TGA/DTA)

De acuerdo con los termogramas obtenidos (Fig. 10), el perfil termoanalítico del $\beta\text{-CD}$ se puede dividir en 3 partes: (1) pérdida de agua desde temperatura ambiente hasta $140 \text{ }^\circ\text{C}$, (2) degradación térmica a partir de $280 \text{ }^\circ\text{C}$; (3) ignición por encima de $300 \text{ }^\circ\text{C}$. Se puede observar que entre 140 y $280 \text{ }^\circ\text{C}$ la curva TGA es plana y no se detecta pérdida de masa (Giordano et

al., 2001). De esta forma, los termogramas de β -CD mostraron una pérdida de masa de 13% (~ 96 °C), relacionado con la pérdida de agua en la zona intersticial de la molécula (en la superficie de la CD, >100 °C) y de la cavidad (~ 110 °C), y 79% (~ 335 °C), relacionado con la descomposición del material. La curva TGA/DTA en nitrógeno para el aceite esencial de tomillo tiene un perfil típico, mostrando un solo paso de descomposición, resultado del proceso de evaporación y volatilización del aceite y todos sus diferentes componentes que se inicia a los 70 °C y finaliza a los 195 °C, que coincide con el punto de ebullición reportado de dicha sustancia. Este análisis muestra que perdió más del 99% de su masa en el proceso.

Con respecto al aceite encapsulado, es posible observar que la pérdida de peso inicial fue menor que la observada en β -CD, indicando la existencia de interacción *host/guest*. Esto es debido a que la adición de los compuestos no polares provocan un desplazamiento de las moléculas de agua contenidas en la cavidad hidrofóbica de la β -CD hacia el exterior, teniendo una interacción energéticamente favorable. Además, entre 120 y 270 °C se presenta una pérdida de peso de TEO no complejado y posiblemente adherido a la zona intersticial de las ciclodextrinas. Adicionalmente, el solvente utilizado (etanol) puede estar presente en las muestras (KN-2 y FD-2) y también forma parte del peso perdido en la primera y segunda etapa. Finalmente, así como con la ciclodextrina, a partir de los 300 °C se puede observar la degradación del complejo de inclusión, con una pérdida de masa. Inmediatamente, se presenta la carbonización de β -CD (~ 335 °C). Así, la pérdida de masa en estos pasos indica la eficiencia de la complejación, y el incremento en la estabilidad térmica de TEO.

En la Tabla 4 se pueden observar las pérdidas de masa en las 3 etapas principales del proceso para las muestras complejadas por diferentes técnicas. De esta forma, las muestras que tuvieron una pérdida significativa de compuesto activo en el intervalo de estabilidad de

β -CD fueron aquellas preparadas por el método de amasado con etanol como solvente y liofilización con agua y etanol/agua como solventes, teniendo una pérdida mayor al 9,5%. Por otro lado, la muestra scCO₂ exhibió únicamente ~1,2% más de pérdida en masa con respecto a la muestra de β -CD pura. Así, esto indica que el método de fluidos supercríticos demostró la mejor capacidad de complejación.

Tabla 4. Pérdida de masa (%) de cada muestra en las tres etapas del proceso de 30-600 °C.

Pérdida de masa (%)	Primera etapa Pérdida de agua (30-120 °C)	Segunda etapa Estabilidad del complejo (120-290 °C)	Tercera etapa Degradación β -CD (290-350 °C)
β -CD	13,0 (~40-130 °C)	2,84 (~130-304 °C)	64,46 (~304-340 °C)
KM-1	19,8 (~45-130 °C)	4,12 (~130-300 °C)	62,13 (~300-340 °C)
KM-2	12,93 (~40-124 °C)	13,98 (~124-294 °C)	60,14 (~294-334 °C)
FD-1	6,80 (~41-121 °C)	13,22 (~121-296 °C)	68,22 (~296-332 °C)
FD-2	6,04 (~30-122 °C)	9,56 (~122-292 °C)	84,38 (~292-335 °C)
scCO ₂	18,9 (~50-134 °C)	4,08 (~134-299 °C)	62,29 (~299-334 °C)

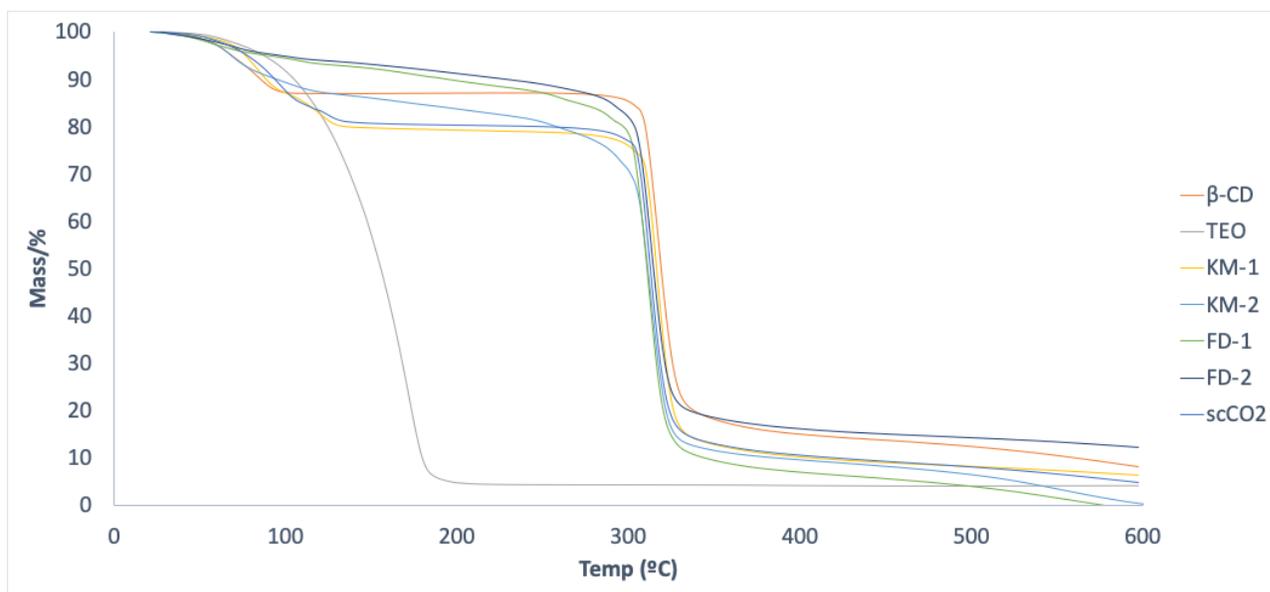


Fig. 11. Análisis termogravimétrico (TGA) de TEO, β -CD y de los complejos de inclusión β -CD/TEO.

Por otra parte, en la Fig. 11 se muestra el gráfico comparativo del termoanálisis diferencial (DTA) para las muestras puras y complejadas. Los picos direccionados hacia arriba representan un fenómeno endotérmico, y hacia abajo un proceso exotérmico. Primeramente, el TEO muestra picos endotérmicos, resultado de la volatilización de los diferentes componentes del aceite. Por otro lado, el perfil de la β -CD muestra dos picos endotérmicos importantes: la pérdida de agua y la degradación de la molécula a las temperaturas mencionadas de acuerdo con el análisis termogravimétrico. Para los complejos de inclusión, se observa el pico de la pérdida de agua, aproximadamente a la misma temperatura que la β -CD, y desaparecen curvas endotérmicas de componentes volátiles para KM-1 y scCO₂. Específicamente, para la muestra de scCO₂. Para las muestras restantes algunos picos se conservan, indicando la degradación de aceite no complejado. Con respecto

al segundo proceso, se presenta el pico endotérmico de degradación para todos los complejos, a excepción de la muestra scCO₂, la cual expone un pico exotérmico. Dependiendo de las diferentes formas de preparación y los consiguientes niveles de hidratación, las muestras de β -CD pueden existir en diferentes formas cristalinas y algunas de ellas pueden transformarse entre sí. Una transición exotérmica puede atribuirse a una transformación reversible de β -CD en estado sólido (Giordano et al., 2001).

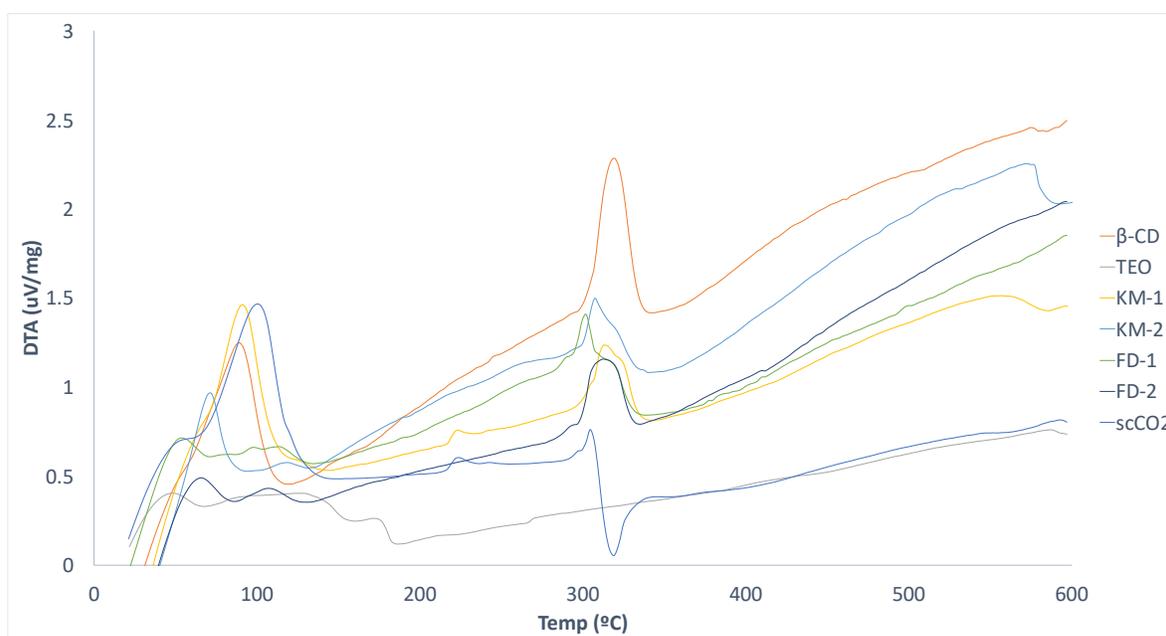


Fig. 11. Termoanálisis diferencial (DTA) de β -CD y de los complejos de inclusión β -CD/TEO. Los picos hacia arriba representan un proceso endotérmico, y los picos hacia abajo son exotérmicos.

6.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías obtenidas a partir de SEM muestran el tamaño y la morfología de las partículas de la muestra pura de β -CD y de los complejos de inclusión β -CD/TEO preparadas

por los métodos KN, FD y scCO₂. De estas imágenes, se pueden observar que la mayoría de las partículas presentan porosidad, formas irregulares, superficies lisas y bordes afilados con diferencias significativas en la distribución del tamaño (Fig. 12). En el Anexo 2 se pueden apreciar micrografías adicionales de las muestras analizadas. La apariencia de poros se puede atribuir a la pérdida de agua atrapada por la red de hidrolizado de colágeno durante la preparación de la muestra para SEM (Sutaphanit & Chitprasert, 2014).

La forma y morfología de las partículas de los complejos tuvieron grandes desigualdades con respecto a las de β -CD libre. Los tamaños de partículas para β -CD estuvieron en el rango de 10-100 μm , el método KN-1 tuvo tamaños de 2 μm aproximadamente, FD-2 se encontró en el rango de 3.5-10 μm y scCO₂ abarcó de 80-100 μm . De este modo, los tamaños de partícula de la β -CD libre fueron mucho mayores que los de los productos encapsulados. Al considerar que β -CD forma clusters en solución a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares, podría ser que la incorporación de aceite esencial de tomillo interfiere en estas interacciones y reduce el tamaño de partícula (Rakmai et al., 2018).

Adicionalmente, se evidencia una aglomeración donde las partículas grandes atraen a partículas más pequeñas debido a la falta de carga neta (El Kharraf et al., 2021). Resultados similares han sido obtenidos por Hill et al. (2013) con el complejo β -CD/trans-cinamaldehído:eugenol, Tao et al. (2014) con β -CD/TEO y Seo et al. (2010) con el complejo β -CD/eugenol en el cual se formaban grandes agregados, lo que sugiere que su forma irregular fue consecuencia del autoensamblaje de β -CD en el agua. Adicionalmente, Choi et al. (2009) han reportado que en la preparación de las muestras para la microscopía electrónica, al cargar las partículas en la rejilla para asentar y adherir la muestra, provoca que

las partículas aglomeradas se separan en partículas más pequeñas, observable en las imágenes TEM.

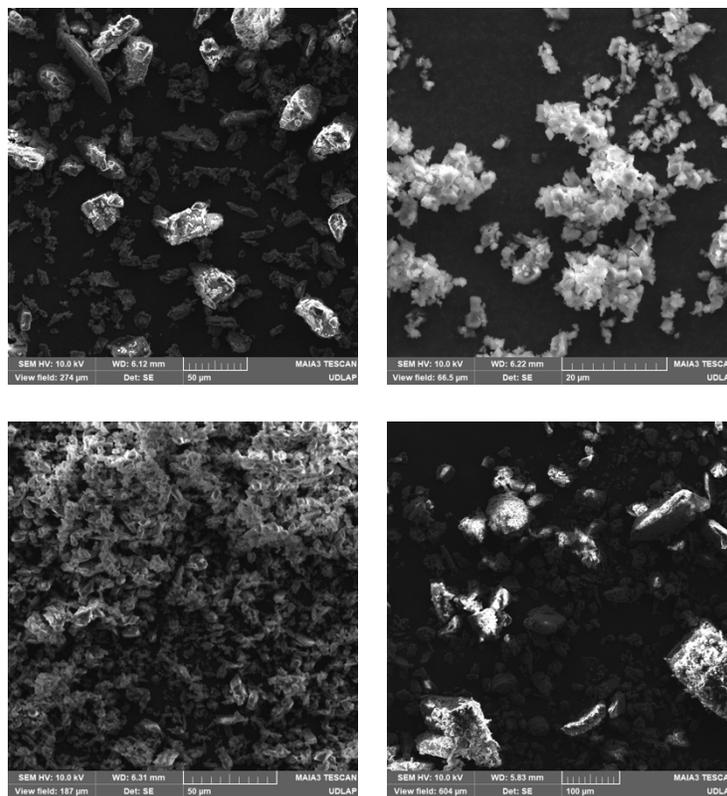


Fig. 12. Micrografías obtenidas por SEM: a) β -CD, b) KN-1 β -CD/TEO, c) FD-2 β -CD/TEO, d) $scCO_2$ β -CD/TEO.

6.5. Eficiencia de encapsulación (EE)

Para cuantificar la cantidad de compuesto activo encapsulado dentro de la β -CD, se determinó la eficiencia de encapsulación (EE). Este estudio se llevó a cabo únicamente con el complejo de inclusión obtenido por el método de fluidos supercríticos. Primeramente se obtuvo una curva de calibración (Fig. 8) con concentraciones que van de 5 ppm hasta 100 ppm, considerando una concentración inicial de 1,122 mg (1,22 μ g) del aceite en el complejo

a partir de los 10 mg que se tomaron. Posteriormente, al cumplirse satisfactoriamente la Ley de Beer, y teniendo una absorbancia de 1.3045 para la muestra problema, se calculó una concentración de 30.12 ppm, lo que corresponde a una EE del 26.92%.

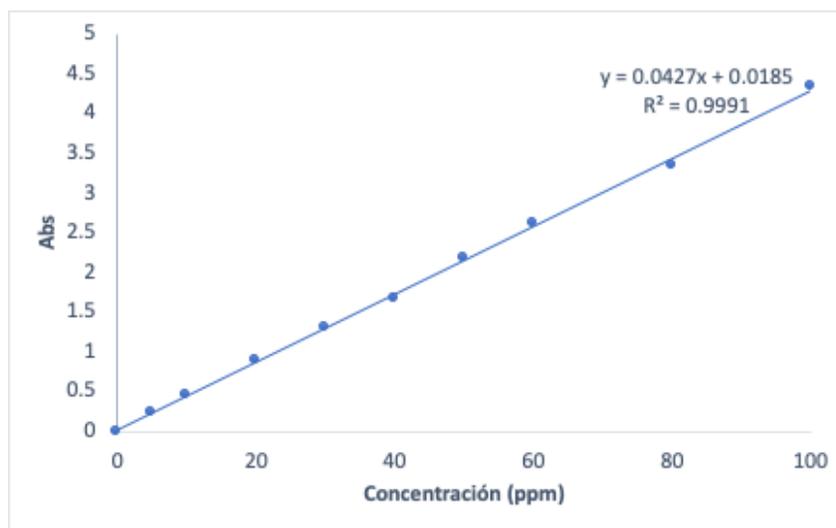


Fig. 8. Curva de calibración del aceite esencial de tomillo obtenido a partir de espectroscopía UV-Vis.

Aquí, es importante señalar que la eficiencia del atrapamiento puede depender de varios factores, tales como la estructura química y características físicas del huésped a encapsular y las interacciones *host/guest*, además del método de encapsulación (Abarca et al., 2016). Tomando en cuenta que el componente del TEO en mayor proporción es el linalol, se puede analizar desde dicho punto de vista. El linalol es un alcohol monoterpénico no cíclico: es octa-1,6-dieno sustituido con grupos metilo en las posiciones 3 y 7 y un grupo hidroxilo en la posición 3.

Lawtrakul et al. (2014), realizaron un trabajo en donde se describe un modelo molecular del complejo de inclusión β -CD con derivados de aceites esenciales, como

interacciones dipolo-dipolo, van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Esta técnica permitió determinar las energías de unión de β -CD/AEs: eugenol/ β -CD > metil eugenol/ β -CD > linalol/ β -CD > estragol/ β -CD > eucaliptol/ β -CD. Estos resultados evidenciaron interacciones favorables entre β -CD y moléculas con funciones aromáticas y grupos hidroxilo -OH. Por otra parte, las moléculas lineales como linalol, mostraron interacciones desfavorables con la cavidad, mostrando el grupo dimetilo de la molécula por fuera de la cavidad en el borde más ancho (Fig. 9). Esto puede explicar el bajo porcentaje de eficiencia de encapsulación.

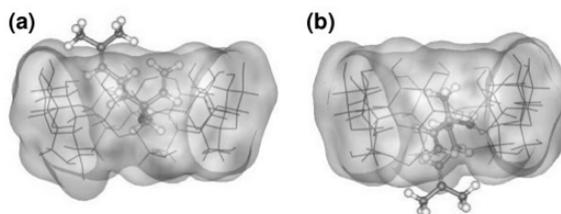


Fig. 9. Estructuras optimizadas en agua bajo el método DFT B3LYP/6-31G (d). El compuesto linalol se presenta en sus dos conformaciones, observándose el grupo dimetilo por fuera de la cavidad de la β -CD. Obtenido de Lawtrakul et al. (2014).

6.6. Estudios de actividad antimicrobiana

Con respecto al primer ensayo en pH neutro, se observó una actividad antimicrobiana ligera, percibiendo anillos de inhibición de 1 mm hasta 4 mm para el aceite esencial de tomillo. Asimismo, se trabajó con aceite esencial de lemongrass (LEO), aceite esencial de naranja (OEO) y aceite esencial de *Lippia graveolens* (LiEO) obtenidos por el método de liofilización, con el objetivo de comparar la efectividad del aceite de tomillo. De acuerdo con los resultados, se observa una mayor actividad para el complejo de inclusión β -CD/TEO con

Listeria monocytogenes en cantidades menores (0,25 g). Sin embargo, los halos de inhibición son mínimos con respecto a resultados anteriores de complejos de inclusión de β -CD y aceite esencial de clavo y orégano (Anaya-Castro et al., 2017), lo que podría indicar que los compuestos activos encapsulados no se liberaron completamente en las 24 h que se dejaron en incubación. Esto se puede comprobar con un análisis termogravimétrico (TGA) que se realizó a una temperatura constante, misma que se utiliza en el periodo de incubación (35 °C) por 3 h aproximadamente, en la cual no se detectó pérdida de masa en la muestra del complejo de inclusión, indicando así que no hubo procesos de evaporación o volatilización del aceite. De esta forma, podría ser que la temperatura no es lo suficientemente alta para liberar completamente el aceite contenido en la cavidad de la ciclodextrina.

Con base en la premisa anterior, se estudió otro parámetro que pudiera causar la liberación del EO, en este caso, el pH del medio de solubilización y de crecimiento bacteriano. Como fue mencionado en la sección 5.3.2., el solvente utilizado para alcanzar un pH ácido (5,0) fue el *buffer McIlvaine*. Primeramente, inmediatamente después de agitar por 5 min, se llevó a cabo la aplicación de los inóculos de cada bacteria y la adición de la muestra en los pozos en las cajas Petri. Después de 24 h de incubación, no se observó ningún anillo de inhibición y hubo crecimiento completo de las bacterias. Por ello, las muestras en el pH ácido se dejaron reposar por 5 días más para promover la liberación completa de los compuestos bioactivos. Posteriormente, los complejos de inclusión según la metodología 5.3.2 en pH 4,0 y 5,0. En el primero, de acuerdo con el control dónde únicamente se adicionaron los inóculos, se observa un crecimiento nulo de bacterias, lo que indica que dicho medio es muy ácido y no apto para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los complejos de inclusión.

Por otra parte, con pH 5,0, se observó una mayor efectividad en la medida en zonas de inhibición con respecto al primer ensayo en un medio neutro, como se puede observar en la Fig. 13 y Tabla 5. En esta prueba, también se estudió al complejo β -CD/LiEO, del cual se obtuvieron resultados similares a los de β -CD/TEO. Asimismo, se observó una menor y/o igual efectividad del tratamiento de 0,5 g de las muestras contra los microorganismos, lo que podría atribuirse a una cantidad demasiado alta de complejos en un volumen pequeño, implicando una sobresaturación de la solución que impide la disolución completa de los complejos y por lo tanto la liberación del aceite.

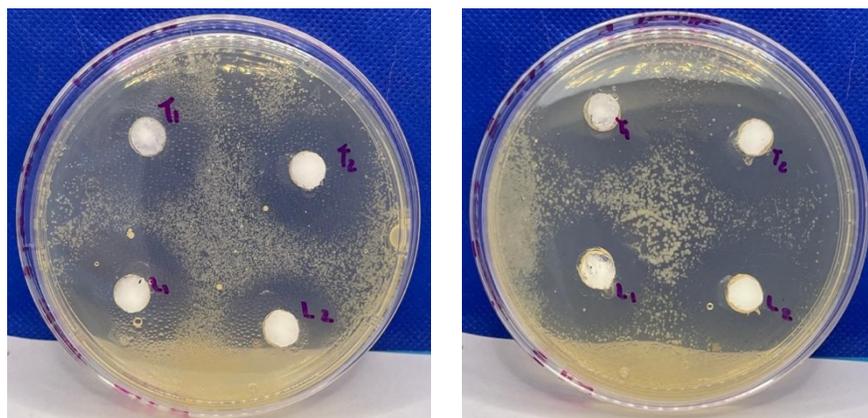


Fig. 13. Actividad antimicrobiana de los complejos β -CD con aceite esencial de tomillo (T1 para 0,25 g y T2 para 0,50 g) y *Aloysia citriodora* (L1 para 0,25 g y L2 para 0,50 g) contra (a) *L. monocytogenes* y (b) *E. coli* en pH 5,0.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana (medida en zonas de inhibición en mm) de los complejos de inclusión β -CD con TEO y LiEO en pH 5,0.

Complejo de inclusión	Masa de la muestra (g)	mm de inhibición	
		<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
β -CD/TEO	0,25	30	28
	0,50	32	30
β -CD/LiEO	0,25	25	30
	0,50	30	23

De esta manera, los resultados obtenidos confirman que la actividad biológica del aceite esencial de tomillo se conserva después del proceso de encapsulación. Además, las zonas de inhibición que demuestra contra *L. monocytogenes* y *E. coli* en pH neutro y ácido se encuentra por encima de los demás aceites estudiados. Por último, se evidencia cómo un medio ácido (5,0) promueve la liberación del aceite hacia el medio, parámetro que puede ser estudiado en próximos trabajos con aplicación directa en alimentos como carne y pescado, que poseen un pH ácido.

7. Conclusiones y recomendaciones

Este trabajo tuvo como objetivo obtener complejos de inclusión formados por β -CD y TEO, y que demostraran una actividad antimicrobiana contra patógenos que son transmitidos por los alimentos y degradan a los mismos, para tener una potencial aplicación como conservadores naturales de alimentos. Los resultados obtenidos por FT-IR sugieren la presencia de TEO dentro del complejo de inclusión, pero se podría sospechar un bajo contenido de compuesto activo dentro de la cavidad y una interacción débil entre ambos

compuestos. Por otra parte, el análisis TGA indica el incremento de la estabilidad térmica de TEO al estar incluido en la ciclodextrina, demostrando una complejación exitosa para todas muestras obtenidas por diferentes métodos. No obstante, la muestra scCO₂ exhibe una pérdida mínima de masa en la región de la evaporación del aceite, lo que demuestra que esta técnica proporciona una mejor capacidad de encapsulación. El estudio UV-Vis para determinar la eficiencia de encapsulación de la muestra scCO₂ indicó un porcentaje del 26.92% del compuesto bioactivo complejado, lo que se podría deber a las estructuras incompatibles de los componentes de TEO, como linalol. Adicionalmente, las micrografías obtenidas por SEM revelan un reducido tamaño de partícula para los complejos de inclusión con relación a la β -CD pura debido a la interferencia de los enlaces hidrógeno intermoleculares por parte de la incorporación de TEO.

En cuanto a los ensayos antimicrobianos, se puede apreciar que TEO mostró una extensa actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* en un pH ácido (pH 5,0), al mostrar zonas de inhibición que alcanzaron los 30 mm (3 cm) para 0,25 y 0,50 g, evidenciando como un medio ácido promueve la liberación del aceite hacia el medio. Así, dichos resultados confirman que la actividad biológica y fisicoquímica de TEO se conserva después del proceso de encapsulación.

De esta manera, la recopilación de resultados en el presente trabajo incentiva futuras investigaciones en la investigación de los complejos de inclusión β -CD/TEO obtenidos por la técnica de fluidos supercríticos (scCO₂) para su aplicación en los sistemas alimentarios con la finalidad de confirmar sus propiedades conservantes y promoviendo una liberación controlada al conocer los parámetros que influyen en su encapsulación como temperatura y pH.

8. Bibliografía

- Abarca, R. L., Rodriguez, F. J., Guarda, A., Galotto, M. J., & Bruna, J. E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food chemistry*, *196*, 968-975.
- Abbasi, Y. F., Panda, P., Arora, S., Layek, B., & Bera, H. (2021). Introduction to tailor-made biopolymers in drug delivery applications. In *Tailor-Made and Functionalized Biopolymer Systems* (pp. 1-31). Woodhead Publishing.
- Abdulazeez, M. A., Abdullahi, A. S., & James, B. D. (2016). Lemongrass (*Cymbopogon* spp.) oils. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 509-516). Academic Press.
- Ademosun, A. O., Oboh, G., Olupona, A. J., Oyeleye, S. I., Adewuni, T. M., & Nwanna, E. E. (2016). Comparative study of chemical composition, in vitro inhibition of cholinergic and monoaminergic enzymes, and antioxidant potentials of essential oil from peels and seeds of sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) Fruits. *Journal of food biochemistry*, *40*(1), 53-60.
- Adukwu, E. C., Bowles, M., Edwards-Jones, V., & Bone, H. (2016). Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*(22), 9619-9627.

- Agnieszka, N., Danuta, K., Malgorzata, P., & Agata, C. (2013). Effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils on growth of *Brochothrix thermosphacta*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(26), 3396-3404.
- Alagawany, M., El-Saadony, M. T., Elnesr, S. S., Farahat, M., Attia, G., Madkour, M., & Reda, F. M. (2021). Use of lemongrass essential oil as a feed additive in quail's nutrition: its effect on growth, carcass, blood biochemistry, antioxidant and immunological indices, digestive enzymes and intestinal microbiota. *Poultry science*, 100(6), 101172.
- Altıok, D., Altıok, E., & Tihminlioglu, F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(7), 2227-2236.
- Aluyor, E. O., & Oboh, I. O. (2014). Preservatives: Traditional Preservatives–Vegetable Oils. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 137-140.
- Arruda, T. R., Bernardes, P. C., e Moraes, A. R. F., & Soares, N. D. F. F. (2022). Natural bioactives in perspective: The future of active packaging based on essential oils and plant extracts themselves and those complexed by cyclodextrins. *Food Research International*, 111160.

- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., & Simal-Gandara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1631-1640.
- Axelos, M. A., & Van de Voorde, M. (2017). *Nanotechnology in agriculture and food science*. John Wiley & Sons.
- Ayala-Zavala, J. F., Del-Toro-Sánchez, L., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. A. (2008). High relative humidity in-package of fresh-cut fruits and vegetables: advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems?. *Journal of Food Science*, 73(4), R41-R47.
- Ayala-Zavala, J. F., Del Toro-Sánchez, L., Alvarez-Parrilla, E., Soto-Valdez, H., Martín-Belloso, O., Ruiz-Cruz, S., & González-Aguilar, G. (2008). Natural antimicrobial agents incorporated in active packaging to preserve the quality of fresh fruits and vegetables. *Stewart Postharvest Rev*, 4(3), 1-9.
- Aziz, Z. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., ... & Ashraf, G. M. (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Current drug metabolism*, 19(13), 1100-1110.

- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, *45*(2), 722-734.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, *46*(2), 446-475.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *15*(1), 143-182.
- Banchero, M. (2020). Recent advances in supercritical fluid dyeing. *Coloration Technology*, *136*(4), 317-335.
- Banchero, M. (2021). Supercritical Carbon Dioxide as a Green Alternative to Achieve Drug Complexation with Cyclodextrins. *Pharmaceuticals*, *14*(6), 562.
- Baránková, E., & Dohnal, V. (2016). Effect of additives on volatility of aroma compounds from dilute aqueous solutions. *Fluid Phase Equilibria*, *407*, 217-223.
- Bazana, M. T., Codevilla, C. F., & de Menezes, C. R. (2019). Nanoencapsulation of bioactive compounds: Challenges and perspectives. *Current opinion in food science*, *26*, 47-56.

- Bender, M. L., & Komiyama, M. (1978). Catalyses by cyclodextrins leading to practical usages of cyclodextrins. In *Cyclodextrin Chemistry* (pp. 28-32). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Blanco-Padilla, A., Soto, K. M., Hernández Iturriaga, M., & Mendoza, S. (2014). Food antimicrobials nanocarriers. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Brayden, D. J., & Baird, A. W. (2013). Opportunities for drug-delivery research in nutraceuticals and functional foods?. *Therapeutic delivery*, 4(3), 301-305.
- Bruni, P. S., & Schürch, S. (2021). Mass Spectrometric Evaluation of β -Cyclodextrins as Potential Hosts for Titanocene Dichloride. *International journal of molecular sciences*, 22(18), 9789.
- Budryn, G., Zaczyńska, D., Rachwał-Rosiak, D., & Oracz, J. (2015). Changes in properties of food proteins after interaction with free and β -cyclodextrin encapsulated hydroxycinnamic acids. *European food research and technology*, 240(6), 1157-1166.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

- Burt, S. A., Vlieland, R., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. (2005). Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157: H7 by addition of food stabilizers. *Journal of food protection*, 68(5), 919-926.
- Callaway, T. R., Carroll, J. A., Arthington, J. D., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Ricke, S. C., ... & Nisbet, D. J. (2011). Citrus products and their use against bacteria: potential health and cost benefits. In *Nutrients, dietary supplements, and nutraceuticals* (pp. 277-286). Humana Press.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food control*, 54, 111-119.
- Capelezzo, A. P., Mohr, L. C., Dalcanton, F., de Mello, J. M. M., & Fiori, M. A. (2018). β -Cyclodextrins as encapsulating agents of essential oils. *Cyclodextrin-A Versatile Ingredient: IntechOpen*, 169-200.
- Catauro, M., Bollino, F., Tranquillo, E., Sapio, L., Illiano, M., Caiafa, I., & Naviglio, S. (2017). Chemical analysis and anti-proliferative activity of Campania *Thymus Vulgaris* essential oil. *Journal of essential oil research*, 29(6), 461-470.
- Cevallos, P. A. P., Buera, M. P., & Elizalde, B. E. (2010). Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin:

- Effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 70-75.
- Cheirsilp, B., & Rakmai, J. (2016). Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications, *Biology, Engineering and Medicine*. 2(2017).
- Chen, H., & Ji, H. (2010). Alkaline hydrolysis of cinnamaldehyde to benzaldehyde in the presence of β -cyclodextrin. *AIChE journal*, 56(2), 466-476.
- Choi, M. J., Soottitantawat, A., Nuchuchua, O., Min, S. G., & Ruktanonchai, U. (2009). Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion–diffusion method. *Food Research International*, 42(1), 148-156.
- Cid-Samamed, A., Rakmai, J., Mejuto, J. C., Simal-Gandara, J., & Astray, G. (2022). Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chemistry*, 132467.
- Ciobanu, A., Landy, D., & Fourmentin, S. (2013). Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. *Food research international*, 53(1), 110-114.
- Connors, K. A. (1997). The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chemical Reviews*, 97(5), 1325–1357.

- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*, 88(1), 170-175.
- Cramer, F., Saenger, W., & Spatz, H. C. (1967). Inclusion compounds. XIX. 1a The formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics and kinetics. *Journal of the American Chemical Society*, 89(1), 14-20.
- de Araújo, É. J. F., Silva, O. A., Rezende-Júnior, L. M., Sousa, I. J. O., de Araújo, D. Y. M. L., de Carvalho, R. B. F., ... & Lima, F. D. C. A. (2017). Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of inclusion complexes between Riparin A and β -cyclodextrin. *Journal of Molecular Structure*, 1142, 84-91.
- Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, 39(9), 1033-1046.
- de Oliveira-Filho, R. D., de Azevedo Moreira, R., & Nogueira, N. A. P. (2018). Biological activities and pharmacological applications of cyclodextrins complexed with essential oils and their volatile components: A systematic review. *Current Pharmaceutical Design*, 24(33), 3951-3963.

- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25.
- Dodziuk, H. (Ed.). (2006). Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications. John Wiley & Sons.
- Duchêne, D. E. N., Vaution, C., & Glomot, F. (1986). Cyclodextrins, their value in pharmaceutical technology. *Drug development and industrial pharmacy*, 12(11-13), 2193-2215.
- Durante, M., Milano, F., De Caroli, M., Giotta, L., Piro, G., Mita, G., ... & Lenucci, M. S. (2020). Tomato oil encapsulation by α -, β -, and γ -Cyclodextrins: A comparative study on the formation of supramolecular structures, antioxidant activity, and carotenoid stability. *Foods*, 9(11), 1553.
- El Kharraf, S., Farah, A., El Hadrami, E. M., El-Guendouz, S., Lourenço, J. P., Rosa Costa, A. M., & Miguel, M. G. (2021). Encapsulation of Rosmarinus officinalis essential oil in β -cyclodextrins. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(10), e15806.
- El Sawi, S. A., Ibrahim, M. E., El-Rokiek, K. G., & El-Din, S. A. S. (2019). Allelopathic potential of essential oils isolated from peels of three citrus species. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(1), 89–94.

- Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat science*, 86(2), 283-288.
- Fakayode, S. O., Lowry, M., Fletcher, K. A., Huang, X., Powe, A. M., & Warner, I. M. (2007). Cyclodextrins host-guest chemistry in analytical and environmental chemistry. *Current Analytical Chemistry*, 3(3), 171-181.
- Falleh, H., Jemaa, M. B., Saada, M., & Ksouri, R. (2020). Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chemistry*, 330, 127268.
- Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2, 1143e1156.
- Fathi, M., Martín, Á., & McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 39(1), 18-39.
- Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 23(1), 13-27.

- Fenyvesi, É., Szemán, J., Csabai, K., Malanga, M., & Szente, L. (2014). Methyl-beta-cyclodextrins: the role of number and types of substituents in solubilizing power. *Journal of pharmaceutical sciences*, *103*(5), 1443-1452.
- Fernandes, L. P., Éhen, Z., Moura, T. F., Novák, C., & Sztatisz, J. (2004). Characterization of Lippia sidoides oil extract- β -cyclodextrin complexes using combined thermoanalytical techniques. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, *78*(2), 557-573.
- Figueiras, A., Cardoso, O., Veiga, F., de Carvalho, R. B., & Ballaro, G. (2015). Preparation and characterization of Trimethoprim inclusion complex with Methyl- β -Cyclodextrin and determination of its antimicrobial activity. *Pharm Anal Acta*, *6*, 405-409.
- Galvão, J. G., Silva, V. F., Ferreira, S. G., França, F. R. M., Santos, D. A., Freitas, L. S., ... & Nunes, R. S. (2015). β -cyclodextrin inclusion complexes containing Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control Aedes aegypti larvae. *Thermochimica Acta*, *608*, 14-19.
- Gao, R., Jin, Y., Yang, Q. Y., Sun, B. W., & Lin, J. (2015). Study of stability and drug-excipient compatibility of estradiol and pharmaceutical excipients. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *120*(1), 839-845.

- Giordano, F., Novak, C., & Moyano, J. R. (2001). Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 380(2), 123-151.
- Gould, G. W. (1989). *Mechanisms of action of food preservation procedures*. Elsevier Applied Science.
- Grandelli, H. E. (2013). *Formation of Cyclodextrin-Drug Inclusion Compounds and Polymeric Drug Delivery Systems Using Supercritical Carbon Dioxide* (Doctoral dissertation, Virginia Tech).
- Gratieri, T., Gelfuso, G. M., Lopez, R. F., & Souto, E. B. (2010). Current efforts and the potential of nanomedicine in treating fungal keratitis. *Expert Review of Ophthalmology*, 5(3), 365-384.
- Guignon, B., Duquenoy, A., & Dumoulin, E. D. (2002). Fluid bed encapsulation of particles: principles and practice. *Drying Technology*, 20(2), 419-447.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology*, 124(1), 91-97.
- Hedges, A. (2009). Cyclodextrins: properties and applications. In *Starch* (pp. 833-851). Academic Press.

- Hedges, A.R., Shiech, W.J. & Sikorski, C.T. (1995). Use of cyclodextrins for encapsulation in the use and treatment of food products. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* (edited by S.J. Risch & G.A. Reineccius). Pp. 60–71. Washington, DC: American Chemical Society.
- Hill, L. E., Gomes, C., & Taylor, T. M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 86-93.
- Iversen, C. K. (1999). Black currant nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. *Journal of Food Science*, 64(1), 37-41.
- Jug, M., & Mura, P. A. (2018). Grinding as solvent-free green chemistry approach for cyclodextrin inclusion complex preparation in the solid state. *Pharmaceutics*, 10(4), 189.
- Kahraman, E., Güngör, S., & Özsoy, Y. (2017). Potential enhancement and targeting strategies of polymeric and lipid-based nanocarriers in dermal drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 8(11), 967-985.

- Kalembe, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- Kamimura, J. A., Santos, E. H., Hill, L. E., & Gomes, C. L. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 701-709.
- Karathanos, V. T., Mourtzinou, I., Yannakopoulou, K., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *Food chemistry*, 101(2), 652-658.
- Kfoury, M., Landy, D., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2014). Effect of cyclodextrin complexation on phenylpropanoids' solubility and antioxidant activity. *Beilstein journal of organic chemistry*, 10(1), 2322-2331.
- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2019). Encapsulation in cyclodextrins to widen the applications of essential oils. *Environmental Chemistry Letters*, 17(1), 129-143.
- Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E., & Mortazavian, A. M. (2018). Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 62-72.

- Knez, Ž., Markočič, E., Leitgeb, M., Primožič, M., Hrnčič, M. K., & Škerget, M. (2014). Industrial applications of supercritical fluids: A review. *Energy*, 77, 235-243.
- Kiran, E., Debenedetti, P. G., & Peters, C. J. (Eds.). (2012). *Supercritical fluids: fundamentals and applications* (Vol. 366). Springer Science & Business Media.
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*, 25(18), 4125.
- Kringel, D. H., Antunes, M. D., Klein, B., Crizel, R. L., Wagner, R., de Oliveira, R. P., ... & Zavareze, E. D. R. (2017). Production, characterization, and stability of orange or eucalyptus essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of food science*, 82(11), 2598-2605.
- Kubow, S. (1992). Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free radical biology and medicine*, 12(1), 63-81.
- Kuswandi, B. Freshness sensors for food packaging. *Reference Module in Food Science* 2017, 1-11.
- Lambert, J. F. (2018). Organic pollutant adsorption on clay minerals. In *Developments in clay science* (Vol. 9, pp. 195-253). Elsevier.

- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, *91*(3), 453-462.
- Lawtrakul, L., Inthajak, K., & Toochinda, P. (2014). Molecular calculations on β -cyclodextrin inclusion complexes with five essential oil compounds from *Ocimum basilicum* (sweet basil). *Science Asia*, *40*, 145-151.
- Lee, D. H., Sim, G. S., Kim, J. H., Lee, G. S., Pyo, H. B., & Lee, B. C. (2007). Preparation and characterization of quercetin-loaded polymethyl methacrylate microcapsules using a polyol-in-oil-in-polyol emulsion solvent evaporation method. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *59*(12), 1611-1620.
- Leimann, F. V., Gonçalves, O. H., Machado, R. A., & Bolzan, A. (2009). Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering: C*, *29*(2), 430-436.
- Liao, W., Badri, W., Dumas, E., Ghnimi, S., Elaïssari, A., Saurel, R., & Gharsallaoui, A. (2021). Nanoencapsulation of essential oils as natural food antimicrobial agents: an overview. *Applied Sciences*, *11*(13), 5778.

- Linde, G. A., Laverde, A., Jr., & Barros Colauto, N. (2011). Changes to taste perception in the food industry: Use of cyclodextrins. In V. Preedy, R. Watson, & C. Martin (Eds.), *Handbook of behavior, Food and nutrition (99-118)*. New York: Springer New York.
- Linert, W., Margl, P., & Renz, F. (1992). Solute-solvent interactions between cyclodextrin and water: a molecular mechanical study. *Chemical physics*, *161*(3), 327-338.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., & Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, *60*(15), 1650-1662.
- Locci, E., Lai, S., Piras, A., Marongiu, B., & Lai, A. (2004). ¹³C-CPMAS and ¹H-NMR Study of the Inclusion Complexes of β-Cyclodextrin with Carvacrol, Thymol, and Eugenol Prepared in Supercritical Carbon Dioxide. *Chemistry & biodiversity*, *1*(9), 1354-1366.
- Loh, G. O. K., Tan, Y. T. F., & Peh, K. K. (2016). Enhancement of norfloxacin solubility via inclusion complexation with β-cyclodextrin and its derivative hydroxypropyl-β-cyclodextrin. *asian journal of pharmaceutical sciences*, *11*(4), 536-546.
- López-Nicolás, J. M., Pérez-López, A. J., Carbonell-Barrachina, Á., & García-Carmona, F. (2007). Use of natural and modified cyclodextrins as inhibiting agents of peach juice

enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5312-5319.

Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M. T., Zafrilla, M. P., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. (2008). ORAC-fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(6), 2254-2259.

Lu, Z., Cheng, B., Hu, Y., Zhang, Y., & Zou, G. (2009). Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. *Food chemistry*, 113(1), 17-20.

Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung De Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>

Magalhães, M. L., Ionta, M., Ferreira, G. Á., Campidelli, M. L. L., Nelson, D. L., Ferreira, V. R. F., ... & Cardoso, M. D. G. (2020). Biological activities of the essential oil from the Moro orange peel (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Flavour and fragrance journal*, 35(3), 294-301.

Mandal, S., & DebMandal, M. (2016). Thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 825-834). Academic Press.

- Marques, H. C. (1994). Preparation of complexes. Evidence for complex formation. *Rev. Port. Farm*, 44(2), 77-84.
- Marques, H. M. C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and fragrance journal*, 25(5), 313-326.
- Marques, C. S., Carvalho, S. G., Bertoli, L. D., Villanova, J. C. O., Pinheiro, P. F., Dos Santos, D. C. M., ... & Bernardes, P. C. (2019). β -Cyclodextrin inclusion complexes with essential oils: Obtention, characterization, antimicrobial activity and potential application for food preservative sachets. *Food Research International*, 119, 499-509.
- Martins, I. M., Barreiro, M. F., Coelho, M., & Rodrigues, A. E. (2014). Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245, 191-200.
- Matencio, A., Navarro-Orcajada, S., Garcia-Carmona, F., & López-Nicolás, J. M. (2020). Applications of cyclodextrins in food science. A review. *Trends in food science & technology*, 104, 132-143.

- Mazzobre, M. F., Elizalde, B. E., Dos Santos, C., Cevallos, P. P., & Buera, M. P. (2010). Nanoencapsulation of food ingredients in cyclodextrins: Effect of water interactions and ligand structure. *Functional food product development*, 24-38.
- Menezes, P. P., Serafini, M. R., Santana, B. V., Nunes, R. S., Quintans Jr, L. J., Silva, G. F., ... & Araújo, A. A. (2012). Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochimica acta*, 548, 45-50.
- Mishra, M. (Ed.). (2015). *Handbook of encapsulation and controlled release*. CRC press.
- Mukarram, M., Choudhary, S., Khan, M. A., Poltronieri, P., Khan, M. M. A., Ali, J., ... & Shahid, M. (2021). Lemongrass essential oil components with antimicrobial and anticancer activities. *Antioxidants*, 11(1), 20.
- Mukarram, M., Khan, M., Zehra, A., Choudhary, S., Naeem, M., & Aftab, T. (2021). Biosynthesis of lemongrass essential oil and the underlying mechanism for its insecticidal activity. In *Medicinal and Aromatic Plants* (pp. 429-443). Springer, Cham.
- Mura, P. (2014). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 101, 238-250.

- Muturi, E. J., Selling, G. W., Doll, K. M., Hay, W. T., & Ramirez, J. L. (2020). *Leptospermum scoparium* essential oil is a promising source of mosquito larvicide and its toxicity is enhanced by a biobased emulsifier. *Plos one*, *15*(2), e0229076.
- Narayanan, G., Boy, R., Gupta, B. S., & Tonelli, A. E. (2017). Analytical techniques for characterizing cyclodextrins and their inclusion complexes with large and small molecular weight guest molecules. *Polymer Testing*, *62*, 402-439.
- Nieddu, M., Rassu, G., Boatto, G., Bosi, P., Trevisi, P., Giunchedi, P., ... & Gavini, E. (2014). Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: In vitro and in vivo studies. *Carbohydrate polymers*, *102*, 393-399.
- Nikitenko, N. A., & Prassolov, V. S. (2013). Non-viral delivery and therapeutic application of small interfering RNAs. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, *5*(3 (18)), 35-53.
- Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A., & García-Carmona, F. (1997). Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(8), 2830-2835.
- Osorio-Tobón, J. F., Silva, E. K., & Meireles, M. A. (2016). Nanoencapsulation of flavors and aromas by emerging technologies. *Encapsulations*, *2*, 89–126.

- Patil, J., Kadam, D., Marapur, S., & Kamalapur, M. (2010). Inclusion complex system; a novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: A review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 2, 29-34.
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., & Henriques, M. (2014). Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate polymers*, 101, 121-135.
- Pires, F. Q., Pinho, L. A., Freire, D. O., Silva, I. C., Sa-Barreto, L. L., Cardozo-Filho, L., ... & Cunha-Filho, M. (2019). Thermal analysis used to guide the production of thymol and Lippia organoides essential oil inclusion complexes with cyclodextrin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 137(2), 543-553.
- Poncelet, D. (2006). Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. In *Surface chemistry in biomedical and environmental science* (pp. 23-34). Springer, Dordrecht.
- Rakmai, J., Cheirsilp, B., Torrado-Agrasar, A., Simal-Gándara, J., & Mejuto, J. C. (2017). Encapsulation of yarrow essential oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: physiochemical characterization and evaluation of bio-efficacies. *CyTA-Journal of Food*, 15(3), 409-417.

- Rakmai, J., Cheirsilp, B., Mejuto, J. C., Simal-Gándara, J., & Torrado-Agrasar, A. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Industrial crops and products*, *111*, 219-225.
- Raoov, M., Mohamad, S., & Abas, M. R. (2013). Synthesis and characterization of β -cyclodextrin functionalized ionic liquid polymer as a macroporous material for the removal of phenols and As (V). *International journal of molecular sciences*, *15*(1), 100-119.
- Reineccius, T. A., Reineccius, G. A., & Peppard, T. L. (2004). Utilization of β -cyclodextrin for improved flavor retention in thermally processed foods. *Journal of food science*, *69*(1), FCT58-FCT62.
- Reis, D. R., Ambrosi, A., & Di Luccio, M. (2022). Encapsulated essential oils: A perspective in food preservation. *Future Foods*, 100126.
- Rezaei, A., Khavari, S., & Sami, M. (2021). Incorporation of thyme essential oil into the β -cyclodextrin nanosponges: Preparation, characterization and antibacterial activity. *Journal of Molecular Structure*, *1241*, 130610.
- Rios, J. L. (2016). Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 3-10). Academic Press.

- Romanova, E. V., Annangudi, S. P., Tai, H. C., & Sweedler, J. V. (2016). Mass spectrometry of proteins. In *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology* (pp. 681-687). Elsevier Science Ltd.
- Salehi, B., Abu-Darwish, M. S., Tarawneh, A. H., Cabral, C., Gadetskaya, A. V., Salgueiro, L., ... & del Mar Contreras, M. (2019). Thymus spp. plants-Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 287-306.
- Sauceau, M., Rodier, E., & Fages, J. (2008). Preparation of inclusion complex of piroxicam with cyclodextrin by using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(2), 326-332.
- Schneider, H. J., Hacket, F., Rudiger, V., & Ikeda, H. (1998). NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chemical reviews*, 98(5), 1755-1785.
- Seo, E. J., Min, S. G., & Choi, M. J. (2010). Release characteristics of freeze-dried eugenol encapsulated with β -cyclodextrin by molecular inclusion method. *Journal of Microencapsulation*, 27(6), 496-505.
- Severino, P., Andreani, T., Macedo, A. S., Fangueiro, J. F., Santana, M. H. A., Silva, A. M., & Souto, E. B. (2012). Current state-of-art and new trends on lipid nanoparticles (SLN and NLC) for oral drug delivery. *Journal of drug delivery*, 2012.

Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M. R., Ademiluyi, A. O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S. A., & Iriti, M. (2017). Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(1), 70.

Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., del Mar Contreras, M., ... & Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1675-1687.

Sharma, S., Habib, S., Sahu, D., & Gupta, J. (2021). Chemical properties and therapeutic potential of citral, a monoterpene isolated from lemongrass. *Medicinal Chemistry*, 17(1), 2-12.

Schulz, H., Özkan, G., Baranska, M., Krüger, H., & Özcan, M. (2005). Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 39(2), 249-256.

Siepmann, J., & Siepmann, F. (2012). Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of controlled release*, 161(2), 351-362.

Silva, M. P., Tulini, F. L., Martins, E., Penning, M., Favaro-Trindade, C. S., & Poncelet, D. (2018). Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect

- Lactobacillus acidophilus LA3 in simulated gastrointestinal fluids. *LWT*, 89, 392-399.
- Singh, V.P., Sharma, H., Veerma, R., Javed, A., & Singh, M.F. (2013). Topical non steroidal anti inflammatory drug (NSAIDs) microemulsions: Rationale, review and future prospective. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 7, 1.
- Singh, H. (2016). Nanotechnology applications in functional foods; opportunities and challenges. *Preventive nutrition and food science*, 21(1), 1.
- Singh, H., Thompson, A., Liu, W., & Corredig, M. (2012). Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems. In *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals* (pp. 287-318). Woodhead Publishing.
- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., ... & Sahin, F. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food control*, 15(8), 627-634.
- Sun, C., Cao, J., Wang, Y., Chen, J., Huang, L., Zhang, H., ... & Sun, C. (2021). Ultrasound-mediated molecular self-assemble of thymol with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for fruit preservation. *Food Chemistry*, 363, 130327.

- Sutaphanit, P., & Chitprasert, P. (2014). Optimisation of microencapsulation of holy basil essential oil in gelatin by response surface methodology. *Food chemistry*, *150*, 313-320.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical reviews*, *98*(5), 1743-1754.
- Szejtli, J., & Szente, L. (2005). Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, *61*(3), 115-125.
- Szente, L., Mikuni, K., Hashimoto, H., & Szejtli, J. (1998). Stabilization and solubilization of lipophilic natural colorants with cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry*, *32*(1), 81-89.
- Szente, L., & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(3-4), 137-142.
- Takagi, S., & Maeda, M. (1984). Calorimetric determination of enthalpies, Gibbs energies, and entropies of inclusion of some alcohols into α - and β -cyclodextrins in aqueous solutions. *Journal of inclusion phenomena*, *2*(3), 775-780.

- Tao, F., Hill, L. E., Peng, Y., & Gomes, C. L. (2014). Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 247-255.
- Thombre, R. S., & Kanekar, P. P. (2013). Synthesis of β -Cyclodextrin by Cyclodextrin glycosyl transferase produced by *Bacillus licheniformis* MCM-B1010. *J. Microbiol. Biotech. Res*, 3(1), 57-60.
- Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and Technology*, 32(3), 235-245.
- Tsao, J. Y., Tsai, H. H., Wu, C. P., Lin, P. Y., Su, S. Y., Chen, L. D., ... & Tsai, Y. (2010). Release of paeonol- β -CD complex from thermo-sensitive poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels. *International journal of pharmaceutics*, 402(1-2), 123-128.
- Turasan, H., Sahin, S., & Sumnu, G. (2015). Encapsulation of rosemary essential oil. *LWT-Food science and technology*, 64(1), 112-119.
- Van de Braak, S. A. A. J., & Leijten, G. C. J. J. (1999). Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. *CBI, centre for the promotion of imports from developing countries, Rotterdam*, 116.

- Van Hees, T., Barillaro, V., Piel, G., Bertholet, P., De Hassonville, S., Evrard, B., & Delattre, L. (2002). Application of supercritical carbon dioxide for the preparation of drug-cyclodextrin inclusion compounds. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, *44*(1), 271-274.
- Velázquez-Nuñez, M. J., Avila-Sosa, R., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, *31*(1), 1-4.
- Venturini, C. D. G., Nicolini, J., Machado, C., & Machado, V. G. (2008). Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova*, *31*, 360-368.
- Vikas, Y., Sandeep, K., Braham, D., Manjusha, C., & Budhwar, V. (2018). Cyclodextrin complexes: An approach to improve the physicochemical properties of drugs and applications of cyclodextrin complexes. *Asian Journal of Pharmaceutics*, *12*, S394–S409.
- Viuda-Martos, M., Mohamady, M. A., Fernández-López, J., Abd ElRazik, K. A., Omer, E. A., Pérez-Alvarez, J. A., & Sendra, E. (2011). In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, *22*(11), 1715-1722.

- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2007). Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of food safety*, 27(1), 91-101.
- Voncina, B., & Vivod, V. (2013). Cyclodextrins in textile finishing. In M. Gunay (Ed.), *Eco-friendly textile dyeing and finishing*. 53–75.
- Wadhwa, G., Kumar, S., Chhabra, L., Mahant, S., & Rao, R. (2017). Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 89(1-2), 39-58
- Wang, J., Cao, Y., Sun, B., & Wang, C. (2011). Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Food chemistry*, 127(4), 1680-1685.
- Wang, X., Luo, Z., & Xiao, Z. (2014). Preparation, characterization, and thermal stability of β -cyclodextrin/soybean lecithin inclusion complex. *Carbohydrate polymers*, 101, 1027-1032.
- Wang, S., Su, R., Nie, S., Sun, M., Zhang, J., Wu, D., & Moustaid-Moussa, N. (2014). Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(4), 363-376.

- Wang, L., Zhang, Y., Fan, G., Ren, J. N., Zhang, L. L., & Pan, S. Y. (2019). Effects of orange essential oil on intestinal microflora in mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(8), 4019-4028.
- Xu, J., Zhang, Y., Li, X., & Zheng, Y. (2017). Inclusion complex of nateglinide with sulfobutyl ether β -cyclodextrin: Preparation, characterization and water solubility. *Journal of Molecular Structure*, 1141, 328-334.
- Yang, J., & Hedin, N. (2022). Advances of lab-scale analytical methods for solidification/stabilization technologies. In *Low Carbon Stabilization and Solidification of Hazardous Wastes* (pp. 483-495). Elsevier.
- Yu, H., Park, J. Y., Kwon, C. W., Hong, S. C., Park, K. M., & Chang, P. S. (2018). An overview of nanotechnology in food science: preparative methods, practical applications, and safety. *Journal of Chemistry*, 2018.
- Zhaveh, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S. T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T., & Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of Cuminum cyminum essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, 69, 251-256.

Zulfa, Z., Chia, C. T., & Rukayadi, Y. (2016). In vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) extracts against selected foodborne pathogens. *International Food Research Journal*, 23(3), 1262.

9. Anexos

Anexo 1. Composición del aceite esencial del tomillo utilizado de acuerdo con el análisis HPLC.

Compuesto	Área (%)
Trimethylethylene oxide	0
Tricyclene	0.02
1R-alpha-Pinene	3.35
Camphene	2.44
β -pinene	1.22
β -Myrcene	0.55
O-Cymene	17.19
γ -Terpinen	2.65
Bicyclo (3.1.0) hexan -2-ol,2 methyl-5-(1-methylethyl)-(1-alpha.,2.alpha,5.alpha	0.22
Terpinolen	0.43
Linalol	25.84
Carvacrol	24.25
Thymol	4.39
Cyclohexene, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl	0.38
Caryophyllene	1.22
Widdrol	0.09
α -Caryophyllene	0.17
Ascaridole epoxide	0.3
Ledeneoxide (II)	0.13
5-Isopropyl-2-methyl-7-oxabicyclo(4.1.0)heptan-2-ol	0.24

Caryophyllene oxide	6.46
Cis-Z- α -Bisabolene epoxide	0.1
2-[4-Methyl-6-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)hexa-1,3,5-trienyl]cyclohex-1-en-1-carboxaldehyde	0.05
Spiro[4.5]decan-7-one,1,8-dimethyl-8,9-epoxy-4-isopropyl	0.03
Isoaromadendrene epoxide	0.05
Geranylgeraniol	0.01
Diepi- α -cedrene epoxide	0.01
1,4,7-Androstatrien-3,17-dione	0.28
1H-trindene, 2,3,4,5,6,7,8,9-Octahydro-1,1,4,4,9,9-hexamethyl	0.07
Benzene,1,1'-(Oxydi-2,1-ethanediy)bis 3 ethyl	0.09
Cembrene	0.39
Androst-4-en-11-ol-3,17-dione,9-thiocyanato	0.63
2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyne-4,7-diol	0.07
Gibberellin A5 methyl ester	0.09
Androst-5-en-3-one,4,4-dimethyl	1.15
1,2,5,5,8a-Pentamethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro naphthalen-1-ol	1.49
5 α -Pregn-16-en-20-ene	0.15
α -cetone	0.31
Retinoic acid	1.12
Abietic acid	1.08
Hinokiol	0.27
Androst-5,7-dien-3-ol-17-one	0.12
Gibberellic acid	0.03
Retinoyl- β -glucuronide 6'-3'-lactone	0.31
3 β -acetoxy-6-nitroandrost-5-en-17-one	0.19
Methyl retinoate	0.04
Corticosterone,17 α -hydroxy-11-dehydroxy-9-11-epoxy	0.03
Pregn-5-ene-3,20-diol-13-carboxylic acid, 3-acetate-18,20 lactone	0.04
Gibberellin A3 methyl ester	0.01
Cedrenol	0.23
Betulin	0.01
Cholest -22-ene-21-ol,3,5-dehydro-6-methoxy-pivalate	0.02

Anexo 2. Imágenes obtenidas por SEM: a) β -CD, b) KN-1 β -CD/TEO, c) FD-2 β -CD/TEO, d) $scCO_2$ β -CD/TEO.

