

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“DESARROLLO DE NANOINGREDIENTES FUNCIONALES A BASE DE  
PRODUCTOS NATURALES PARA PRESERVAR  
PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS”**

**POR  
M.C. ANDRÉS MAURICIO PIÑA BARRERA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN  
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

**NOVIEMBRE, 2019**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**“Desarrollo de nanoingredientes funcionales a base de productos naturales para preservar productos hortofrutícolas”**

**COMITÉ DE TESIS**

---

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez  
Presidente

---

Dra. Catalina Rivas Morales  
Secretaria

---

Dr. Juan Gabriel Báez González  
Vocal 1

---

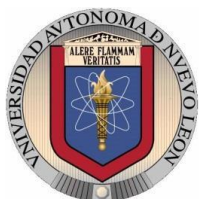
Dra. Adriana Núñez González  
Vocal 2

---

Dr. Eduardo Sánchez García  
Vocal 3

NOVIEMBRE, 2019

---



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**“Desarrollo de nanoingredientes funcionales a base de productos naturales para preservar productos hortofrutícolas”**

DIRECCIÓN DE TESIS

A blue ink signature of Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez.

---

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez  
Director

A blue ink signature of Dra. Rocío Álvarez Román.

---

Dra. Rocío Álvarez Román  
Directora externa

NOVIEMBRE, 2019

---

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS



A la Universidad Autónoma de Nuevo León. Por abrir las puertas de esta maravillosa casa de estudio para mi crecimiento académico y profesional.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT 2019-IT1084-19) por el apoyo para la realización de este proyecto.



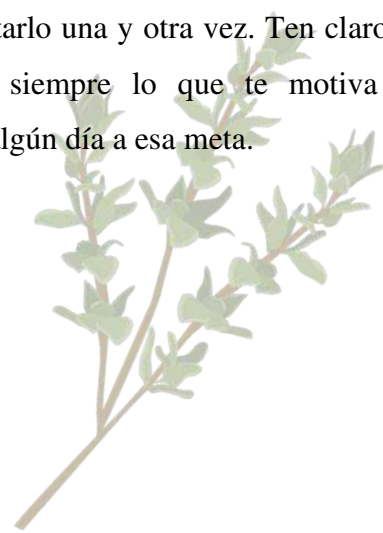
A la Facultad de Ciencias Biológicas  
y todo su personal que fueron parte de mi formación académica.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
por la beca para estudios de posgrado (No. 273928).

---

Motivaciones. Esas motivaciones que solo tú conoces no deben irse, no te abandonarán y te ayudarán a soportar lo que venga. Cuando te desanimas, piensa en ellas, cuándo te frustres, piensa en ellas, cuándo tengas éxito, piensa en ellas. Aprovecha tu libertad de decidir y decide que te mueve a hacer lo que haces, a decir lo que dices, a transmitir lo que transmites y a intentarlo una y otra vez. Ten claro y recuerda siempre lo que te motiva y llegarás algún día a esa meta.



## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A Dios. Quien es el dador de todo lo que podemos tener. Él me ha provisto de vida, salud, protección y sabiduría. Él ha puesto a cada persona y lugar para que cada día no sea en vano. Porque sus tiempos son perfectos.

A mi esposa y a mi hijo. Por su apoyo, su ánimo y su paciencia. Por estar siempre.

A mi familia, mis padres y mis hermanos. Por sus consejos y palabras de aliento. Por su apoyo y sus oraciones constantes.

A mis directores de tesis, Dr. Sergio Galindo y Dra. Rocío Álvarez. Por abrir un espacio en su laboratorio y permitirme formar parte de su maravilloso equipo de trabajo. Por su dedicación y orientación. Por su apoyo, sus consejos, su ejemplo y su paciencia durante la realización de este proyecto. Por regalarme de lo más valiosos que tenemos, tiempo.

A mi comité de tesis. Por sus acertados consejos y comentarios durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A todos mis compañeros del laboratorio de nanotecnología. Por convertirse en mi familia extendida. Por cada momento. Por cada minuto vivido. Por permitirme ser uno más entre ustedes. Por recordarme el significado de la palabra amigo.

A la administración de la Universidad de Montemorelos. Por el apoyo brindado para realizar este proyecto académico.

Y a todas las personas que de una u otra manera han aportado para culminar este objetivo.

*“LA GRATITUD ES LA MEMORIA DEL CORAZÓN”*

---

## DEDICATORIA

*Con toda mi alma y corazón para mi hijo  
Andrés Emilio. Porque tienes lo mejor de  
mí y me iluminas cada día.*

*Porque no tengo desafío más grande en  
mi vida que ser el mejor ejemplo para ti.  
Porque quiero que sepas que los sueños se  
cumplen si eres decidido y valiente.*



## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Índice de Tablas	III
Índice de Figuras	IV
Resumen	
Abstract	
Introducción	1
Justificación	2
Hipótesis	3
Objetivo general	4
Objetivos específicos	5
Capítulo 1: Aceites esenciales: una alternativa viable para la protección de alimentos	6
1.1 Introducción	7
1.2 Componentes de los aceites esenciales	9
1.3 Propiedades bioactivas de los aceites esenciales	11
1.4 Perspectivas en la industria alimentaria de los aceites esenciales incorporados en recubrimientos, películas y nanopartículas poliméricas	15
1.4.1 Recubrimientos y películas	15
1.4.2 Nanotecnología y aceites esenciales	18
1.5 Conclusión	21
1.6 Bibliografía	22
Capítulo 2: Efecto protector de nanocápsulas poliméricas con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. en combinación con un recubrimiento comestible de alginato de sodio para aumentar la vida útil de papaya ( <i>Carica papaya</i> L.)	29
2.1 Introducción	30



2.2 Materiales y métodos	33
2.3 Resultados y discusión	38
2.4 Conclusión	57
2.5 Bibliografía	58
Capítulo 3: Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of <i>Thymus vulgaris</i> L. to increase the shelf life of table grapes ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	65
3.1 Introduction	66
3.2 Methodology	68
3.3 Results and discussion	72
3.4 Conclusion	84
3.5 References	85
Conclusión general	90
Perspectivas	91
Anexo I: Estructura química y propiedades físicas de los principales componentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L.	92
Anexo II: Artículo publicado (DOI: 10.1109/TNB.2019.2941931)	95
Anexo III: Presentación en congresos internacionales	105
Resumen biográfico	107

## ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 1	Contenido	Página
I.	Componentes químicos de interés presentes en algunos aceites esenciales.	12
II.	Aceites esenciales incorporados con recubrimientos y películas comestibles aplicados como conservadores de alimentos.	17
III.	Aceites esenciales o algunos de sus componentes formulados en nanopartículas poliméricas aplicados en alimentos.	20
<b>Capítulo 2</b>		
I.	Composición química del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	39
II.	Características fisicoquímicas de nanocápsulas poliméricas con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. obtenidas por la técnica de nanoprecipitación. ( $n=3; \bar{X} \pm DS$ ).	43
<b>Capítulo 3</b>		
I.	Chemical composition of <i>Thymus vulgaris</i> L. essential oil by gas chromatography coupled to mass spectrometry.	73
II.	Physicochemical characterization of the formulation of nanoparticles loaded with <i>Thymus vulgaris</i> L. essential oil.	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Capítulo 1</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1.	Sistema de destilación por arrastre de vapor (A) e hidrodestilador tipo Clevenger (B).	8
2.	Equipo para extracción de aceites esenciales por medio de fluidos supercríticos.	9
3.	Elementos de un cromatógrafo de gases.	10
4.	Familias diversas de compuestos orgánicos de bajo peso molecular presentes en los aceites esenciales.	11
5.	Tipos de nanopartículas poliméricas: nanocápsulas (vesicular) (A) y nanoesferas (matriz) (B).	19
<b>Capítulo 2</b>		
1.	Estructura química del alginato obtenido de algas pardas ( <i>Phaeophyceae</i> ).	31
2.	Cromatograma por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM) del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L.	40
3.	Cromatograma por cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (CG-FID) del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L.	40
4.	Estructura de polímero Eudragit L 100-55.	44
5.	Espectro MID-FTIR del AEt, Eudragit L 100-55 y NC-AEt.	46
6.	Determinación de la capacidad antioxidante (IC <sub>50</sub> ) del AEt no encapsulado y las NC-AEt por los ensayos ABTS <sup>+</sup> y DPPH. ( $n=3; \bar{x} \pm DS$ ).	48
7.	Gráficos de análisis PROBIT para capacidad antioxidante del AEt no encapsulado (A) y NC-AEt (B) por el ensayo ABTS <sup>+</sup> . ( $n=3; \bar{x} \pm DS$ ).	48
8.	Gráficos de análisis PROBIT para capacidad antioxidante del AEt no encapsulado (A) y NC-AEt (B) por el ensayo DPPH. ( $n=3; \bar{x} \pm DS$ ).	49
9.	Firmeza (A) y color (B) de las papayas después del almacenamiento durante 13 días a 25 °C. Las barras corresponden a la medición inicial (inicial) así como a grupos de papayas sin tratamiento (control), con emulsión de AEt (AEt), con nanocápsulas sin AEt (AL-NC-BCO) y con el multisistema de recubrimiento (AL-NC-AEt). ( $n=3; \bar{x} \pm DS$ ).	51

10. Fruta de papaya con el multisistema de recubrimiento (AL-NC-AEt) (A) y papaya sin ningún tratamiento (B). 52
- Sólidos solubles totales (A) y acidez titulable (B) de las papayas después del almacenamiento durante 13 días a 25 °C. Las barras corresponden a la medición inicial (inicial) así como a grupos de papayas sin tratamiento (control), con emulsión de AEt (AEt), con nanocápsulas sin AEt (AL-NC-BCO) y con el multisistema de recubrimiento (AL-NC-AEt). ( $n=3; \bar{X} \pm DS$ ).
11. 54
12. Evaluación de la protección antimicrobiana en papayas después de 13 días de almacenamiento a 25 °C. Las imágenes corresponden a las papayas sin tratamiento (control, A), con emulsión de AEt (AEt, B), con nanocápsulas sin AEt (AL-NC-BCO, C) y con el multisistema de recubrimiento (AL-NC-AEt, D). 57

### Capítulo 3

1. Chromatogram by gas chromatography with a flame ionization detector of *Thymus vulgaris* L. essential oil. 74
2. Radical scavenging activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil (EOt), nanocapsules without EOt (NC-BCO), nanocapsules with EOt (NC-EOt), and standard (carvacrol) at 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  by the DPPH and ABTS<sup>+</sup> methods. ( $n=3; \bar{X} \pm DS$ ). 78
3. Firmness (A) and color (B) of grapes after storage at 25 °C for 13 days. Bars correspond to the initial measurement (zero day) as well as groups of grapes without treatment (control), with EOt emulsion (EOt), with nanocapsules without EOt (NC-BCO-C), and with the multisystem coating (NC-EOt-C). ( $n=10; \bar{X} \pm DS$ ). 79
4. Total soluble solid content (A) and titratable acidity (B) of grapes after storage at 25 °C for 13 days. Bars correspond to the initial measurement (zero day) as well as groups of grapes without treatment (control), with EOt emulsion (EOt), with nanocapsules without EOt (NC-BCO-C), and with the multisystem coating (NC-EOt-C). ( $n=3; \bar{X} \pm DS$ ). 82
5. Evaluation of antimicrobial protection of grapes after storage at 4 °C for 6 months. Image correspond to the grapes without treatment (control, A), with EOt emulsion (EOt, B), with nanocapsules without EOt (NC-BCO-C, C), and with the multisystem coating (NC-EOt-C, D). 84

## RESUMEN

México se encuentra entre los 10 principales productores de frutas y hortalizas a nivel mundial. Desafortunadamente, la FAO estima que las pérdidas postcosecha para estos productos están alrededor del 50 % de la producción total. Durante el período postcosecha de la fruta, es necesario garantizar una vida útil más larga del vegetal. Por lo tanto, la búsqueda de alternativas para la conservación de productos hortofrutícolas es una necesidad constante. En el presente estudio, primeramente, se realizó una revisión bibliográfica sobre los aceites esenciales (AE). Se abordó su caracterización química y la importancia de sus actividades biológicas (e.g. antimicrobianas, antioxidantes), así como, su aplicación en combinación con recubrimientos y películas comestibles y su incorporación en nanopartículas poliméricas para preservar productos alimenticios. En segunda instancia, se desarrolló un multisistema de recubrimiento a base de alginato de sodio y NC-AEt (AL-NC-AEt). Las NC-AEt se obtuvieron por nanoprecipitación y tuvieron un tamaño promedio de 153.9 nm, un IP de 0.186, un potencial zeta de -4.11 mV y una EE de 52.81 %. Las NC-AEt también mostraron la capacidad antioxidante del AEt determinada por los métodos DPPH y ABTS<sup>+</sup>. Su funcionalidad como nanoingrediente conservador se evaluó en un estudio de calidad postcosecha y vida útil de papaya (*Carica papaya* L.). El multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt retrasó exitosamente el proceso de maduración de la fruta; básicamente, los SST aumentaron 30 % menos y la AT disminuyó 50 % menos, en comparación con los frutos sin el multisistema. Posteriormente, se desarrolló un segundo multisistema de recubrimiento a base de pululano y NC-AEt (NC-AEt-C). En el estudio de calidad postcosecha y vida útil sobre uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) el multisistema de recubrimiento NC-AEt-C retrasó también el proceso de maduración, lo que se reflejó en los análisis de color; además, la firmeza se mantuvo un 15 % más y los SST tuvieron un aumento 3 veces menor que los frutos no tratados. Así mismo, con ambos multisistemas los frutos (i.e. papaya y uva) fueron protegidos al 100 % de la presencia de microorganismos que los pudren. En general, el efecto protector de los multisistemas con nanoingredientes fue resultado de la suma de las características individuales de sus componentes: las actividades biológicas del AEt, la residencia y la liberación gradual del AE desde las NC-AEt en la superficie de la fruta y el efecto barrera del recubrimiento comestible.

---

## ABSTRACT

Mexico is one of most important producers of fruits and vegetables in the world. Unfortunately, FAO estimates that postharvest losses for fruit and vegetable products are around 50 % of total production. During the postharvest period of the fruit, it is necessary to guarantee a longer shelf life of the vegetable. Therefore, the search of alternatives for the preservation of horticultural products is a constant necessity. In the present study, a review of essential oils (EO) was first reported. It included the chemical characterization of EO and descriptions of their more relevant biological activities (e.g. antimicrobials, antioxidants). It was also discussed the application of EO in combination with edible coatings and films, and their incorporation into polymeric nanoparticles to preserve food products. Concerning the experimental approach of our study, a coating multisystem was developed based on sodium alginate (AL) and NC containing EOt (AL-NC-EOt). The NC-EOt were obtained by the nanoprecipitation method and had a particle mean size of 153.9 nm, a PI of 0.186, a zeta potential of -4.11 mV, and 52.81% of EE. The NC-EOt also showed antioxidant activity, which was determined by the DPPH and ABTS<sup>+</sup> methods. The functionality of the NC-EOt as a preservative nanoingredient was evaluated in a study of postharvest quality and shelf life of papaya fruits (*Carica papaya* L.). The AL-NC-AEt coating multisystem successfully delayed the fruit ripening process; fruits covered with the multisystem showed a minor increase of SSC (30%) as well as a minor decrease of TA (50%) than the fruits without the multisystem. Subsequently, another coating multisystem was developed based on pullulan and NC-EOt (NC-EOt-C). In the study of postharvest quality and shelf life of grapes (*Vitis vinifera* L.), the NC-EOt-C coating multisystem also successfully delayed the fruit ripening process, which was observed first by means of a color analysis; in addition, the firmness was remained 15 % more and SSC increased 3 times less than untreated fruits. In addition, for both multisystems, the fruits (i.e. papaya and grapes) were 100% protected from the presence of microorganisms that deteriorated them. In general, the protective effect of multisystems with nanoingredients was the result of the sum of individual characteristics of their components: the biological activities of the EOt, the residence and the gradual release of the EOt from the NC-EOt on the surface of the fruit and the barrier effect of the edible coating.

---

## INTRODUCCIÓN

México tiene un lugar importante en el comercio internacional de hortalizas, legumbres y frutas. Dentro de los principales productos exportados se encuentra la papaya (*Carica papaya* L.). México ocupa el primer lugar como exportador de papaya y el tercer lugar como productor mundial con una producción de 961,789 toneladas al año, con un valor de 4,948 millones de pesos. Por otra parte, la uva (*Vitis vinífera* L.) tiene también relevancia económica a nivel nacional ya que representa el 0.83 % del PIB agrícola nacional, con un valor de 6,467 millones de pesos mexicanos, teniendo un valor económico de exportación de 246 millones de dólares. Las frutas y hortalizas frescas reciben el nombre de productos perecibles debido a que tienen una tendencia inherente a deteriorarse por razones fisiológicas, independientemente de los efectos causados por la invasión de plagas, infecciones y enfermedades. En los países en desarrollo, en donde existe una gran deficiencia en la infraestructura de mercadeo, las pérdidas postcosecha de productos frescos varían entre 25 y 50 % de la producción, según datos de la FAO. Las mermas de esta magnitud representan una pérdida significativa de alimentos y un considerable daño económico para los comerciantes y, especialmente, para los productores. En años recientes, la nanoencapsulación se ha implementado con éxito en la industria alimentaria proveyendo a los compuestos nanoencapsulados características como una liberación sostenida y la protección de los factores ambientales. Estos componentes activos incluyen a los aceites esenciales que, debido a sus actividades antioxidantes y antimicrobianas, se han convertido en una opción para el desarrollo de conservadores naturales. Además, si se utilizan en combinación con recubrimientos comestibles, que tienen la capacidad de interferir en el proceso de maduración de las frutas y hortalizas, podrían ser utilizados como una alternativa importante e innovadora para el control y la reducción de las pérdidas postcosecha.

En el presente estudio, se formuló, caracterizó y se evaluó un multisistema basado en un recubrimiento comestible y nanocápsulas poliméricas cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. para preservar por más tiempo productos hortofrutícolas como la papaya y la uva.

## JUSTIFICACIÓN

México está entre los primeros exportadores de papaya a nivel mundial y entre los principales productores de uva. Por lo tanto, las exigencias en cuanto a calidad son siempre rigurosas y el ofrecer productos con todas sus cualidades organolépticas que perduren por más tiempo representa una ventaja competitiva frente a otras economías mundiales.

Las pérdidas por el deterioro de los productos hortofrutícolas, una vez que estos son cosechados, pueden llegar a ser hasta del 50 %, por lo cual es una problemática importante desde el punto de vista económico y nutricional. En la actualidad, la FAO tiene un plan para la reducción de Pérdidas y Desperdicios de Alimentos (PDA) que tiene dentro de sus estrategias promover el desarrollo y facilitar el acceso al equipamiento y nuevas tecnologías que contribuyan a reducir las pérdidas de alimentos en todas las etapas de la cadena.

En años recientes se ha observado un incremento en la aplicación de la nanotecnología en la industria alimentaria. En particular, la nanoencapsulación permite la protección de los compuestos nanoencapsulados de factores ambientales, lo cual ayuda a mantener su estabilidad y viabilidad, además de controlar su liberación en el entorno que los rodea. Dentro de estos activos a encapsular se encuentran los aceites esenciales, que, al protegerlos de los factores ambientales, podrían aumentar su efectividad para ser utilizados como nanoconservadores de alimentos, aprovechando sus propiedades biológicas (e.g. antimicrobianas y antioxidantes).

Por otro lado, el uso de recubrimientos comestibles se ha extendido con el fin de utilizar métodos de conservación en condiciones ambientales que no afecten al fruto. Dichos recubrimientos están basados en productos de origen natural, lo que les da una ventaja frente a otros métodos de conservación tradicionales.

Por lo anterior, en este trabajo se elaboraron nanopartículas poliméricas conteniendo aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. que fueron incorporadas a un recubrimiento comestible (nanoingrediente) para preservar por más tiempo productos hortofrutícolas como la papaya y la uva.



## HIPÓTESIS

La aplicación de un multisistema basado en un recubrimiento comestible y nanocápsulas poliméricas cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. (nanoingrediente) preserva por más tiempo productos hortofrutícolas como la papaya (*Carica papaya* L.) y la uva (*Vitis vinífera* L.) al actuar como una barrera con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar una formulación de un multisistema basado en un recubrimiento comestible y nanocápsulas poliméricas cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. y evaluar su potencial para preservar por más tiempo productos hortofrutícolas como la papaya (*Carica papaya* L.) y la uva (*Vitis vinífera* L.).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. mediante hidrodestilación y realizar su caracterización química por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas.
2. Desarrollar una formulación de nanocápsulas poliméricas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. y caracterizarla fisicoquímicamente en función del tamaño, índice de polidispersidad, potencial zeta, análisis por espectroscopia infrarroja y determinación de eficiencia de encapsulación.
3. Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., libre y nanoencapsulado, mediante el método de captación de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>+</sup>).
4. Evaluar el efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. nanoencapsulado e incorporado en un recubrimiento comestible sobre la calidad postcosecha y la vida útil de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) y uva (*Vitis vinífera* L.).

# **CAPÍTULO 1**

## **ACEITES ESENCIALES:**

### **UNA ALTERNATIVA VIABLE PARA LA PROTECCIÓN DE ALIMENTOS**

## **ACEITES ESENCIALES: UNA ALTERNATIVA VIABLE PARA LA PROTECCIÓN DE ALIMENTOS**

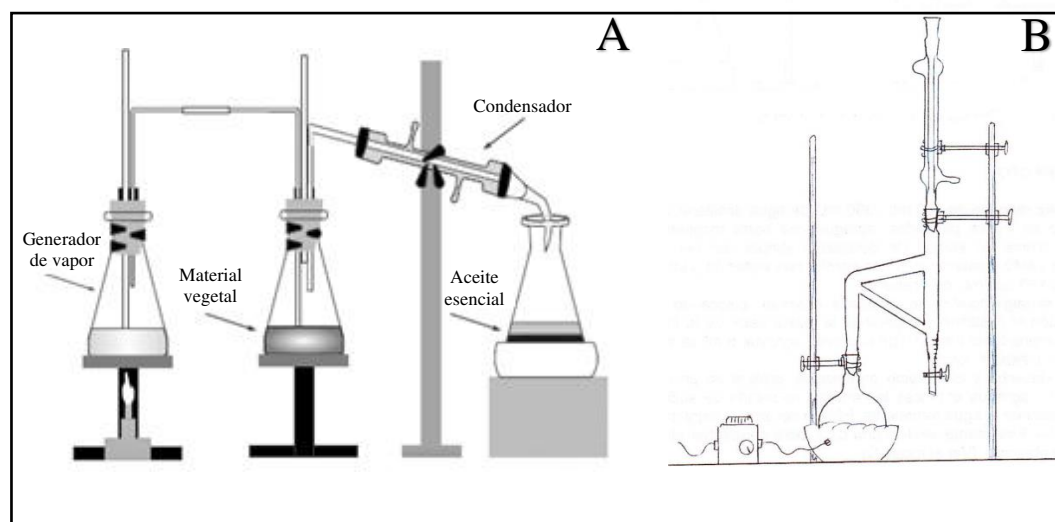
### **1.1 Introducción**

Las plantas, además de producir y contener elementos nutricionales de vital importancia para el ser humano, tienen la capacidad de producir compuestos químicos con diferentes propiedades y actividades biológicas. Dichos compuestos, llamados fitoquímicos (de la palabra griega *fito*, que significa planta), actúan como sistemas de defensa naturales para la planta, brindando protección contra infecciones e invasiones microbianas, además de proporcionar color, sabor y aroma. Esta última propiedad es dada, principalmente, por los aceites esenciales (AE), los cuales se encuentran contenidos en unas glándulas especializadas llamadas pelos glandulares y que finalmente son las que proporcionan el aroma característico a cada espécimen (Linde *et al.*, 2016).

Los AE son mezclas complejas de compuestos extraídos de plantas y se definen como las fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas (Castelo Branco Melo *et al.*, 2018; Dussault, Vu, & Lacroix, 2014; Hyldgaard, Mygind, & Meyer, 2012). Económicamente, son productos naturales de gran importancia para la industria cosmética (e.g. perfumes y aromatizantes), farmacéutica (e.g. saborizantes y activos) y de alimentos (e.g. antioxidantes y antimicrobianos) (Mercado *et al.*, 2014). Se conocen aproximadamente 3000 AE diferentes y cerca de 300 son usados comercialmente en el mercado de aromas y fragancias (Donsì & Ferrari, 2016). Los AE están conformados por compuestos de bajo peso molecular que en su mayoría son insolubles en agua. Esta característica, y su volatilidad, es la base para su extracción (Dima & Dima, 2015).

Para obtener los AE de las muestras vegetales existen diferentes métodos. Entre los más utilizados se encuentran la destilación por arrastre de vapor de agua y la utilización de fluidos supercríticos. En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal fresca y cortada en trozos pequeños es puesta en un matraz y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentada (Figura 1.1A). Los componentes volátiles son “acarreados” junto con el vapor de agua y, posteriormente, son condensados, separados y recolectados de la fracción acuosa (Asbahani *et al.*, 2015a; Dima & Dima, 2015). Esta técnica presenta

una variante llamada "hidrodestilación" (Figura 1.1B), en la que el material vegetal está en contacto directo con el agua generadora del vapor. Al final del refrigerante se coloca una trampa tipo Clevenger, la cual separa el AE del agua debido a su menor densidad. Esta técnica es utilizada a nivel laboratorio y se sitúa como una de las preferidas a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del AE obtenido y su relativa sencillez (Amiri, 2012; Muthumperuma *et al.*, 2016; Raut & Karuppayil, 2014).

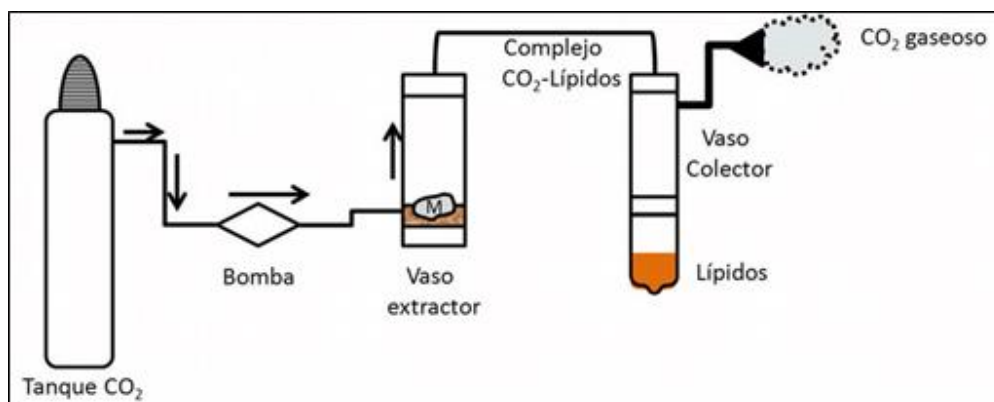


**Figura 1.1.** Sistema de destilación por arrastre de vapor (A) e hidrodestilador tipo Clevenger (B).

El método de extracción utilizando fluidos supercríticos (FSC) es una de las alternativas más recientes. Un FSC es una sustancia que se encuentra bajo condiciones operativas de presión y temperatura superiores a las de su punto crítico, presentando propiedades intermedias entre un gas y un líquido (i.e. densidad elevada, baja viscosidad y coeficiente de difusión superior al del líquido). Estas características favorecen su penetración en diferentes matrices para la solubilización de los solutos. El material vegetal cortado en trozos pequeños se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un FSC (e.g. bióxido de carbono líquido) (Figura 1.2). De esta forma, los compuestos volátiles son solubilizados y arrastrados (Arranz *et al.*, 2015; Bagheri *et al.*, 2014; Dima & Dima, 2015).

El FSC, que actúa como componente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar presión y temperatura ambiente. Las principales ventajas de este método son su alto rendimiento y la pureza del AE obtenido; además, está catalogado como un

proceso amigable con el ambiente. Sin embargo, la mayor desventaja que presenta es que el equipo requerido es costoso y complejo (Conde-Hernández, Espinosa-Victoria, Trejo, & Guerrero-Beltrán, 2017; Pereira & Meireles, 2010).



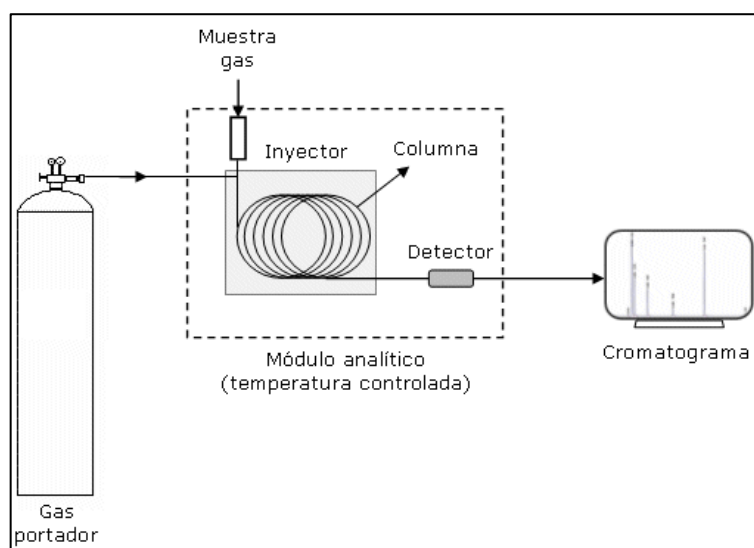
**Figura 1.2.** Equipo para extracción de aceites esenciales por medio de fluidos supercríticos.

La elección de una técnica de extracción particular sistematizada depende de las cantidades requeridas de AE, la complejidad del proceso y la pureza deseada del AE.

## 1.2 Componentes de los aceites esenciales

Los AE presentan componentes químicos con actividades biológicas importantes, las cuales han sido aprovechadas para su aplicación en diferentes áreas de la ciencia. Una vez que ha sido obtenido el AE de la matriz vegetal, es necesario realizar una caracterización química del mismo, identificando los compuestos que lo constituyen. Esto no es sencillo, debido a que los AE son mezclas complejas; además, la composición de un AE en particular puede variar por diferentes factores, por ejemplo, la temporada de cosecha, el lugar de recolección de la planta y los métodos utilizados para extraerlo (Amiri, 2012; Martucci, Gende, Neira, & Ruseckaite, 2015). Para la caracterización química de un AE la técnica utilizada es la cromatografía de gases (CG) (Pesavento *et al.*, 2015; Tohidi *et al.*, 2017), la cual es una técnica capaz de separar mezclas altamente complejas y se basa principalmente, en las diferencias de punto de ebullición/presión de vapor y la polaridad de los componentes de la mezcla. Estos componentes se distribuyen de manera diferente entre una fase gaseosa móvil, generalmente un gas inerte (e.g. Helio) y una fase

estacionaria líquida o sólida, contenida en una columna de vidrio o metal (Stauffer, Dolan, & Newman, 2008). El funcionamiento de los equipos de CG (Figura 1.3) se explica a continuación. El AE es llevado a fase gaseosa utilizando altas temperaturas en el inyector de muestra del equipo. Posteriormente, el AE vaporizado es transportado a través de la columna cromatográfica por medio de la fase móvil, la cual no interactúa con los componentes de la muestra, sino que funciona exclusivamente como medio de transporte. La elusión de los componentes se realiza mediante el flujo de la fase gaseosa móvil y la interacción de estos con la fase estacionaria (i.e. columna cromatográfica). Según su tiempo de retención, los componentes llegan separados al detector que traduce esto en una señal; el conjunto de señales constituye el cromatograma.



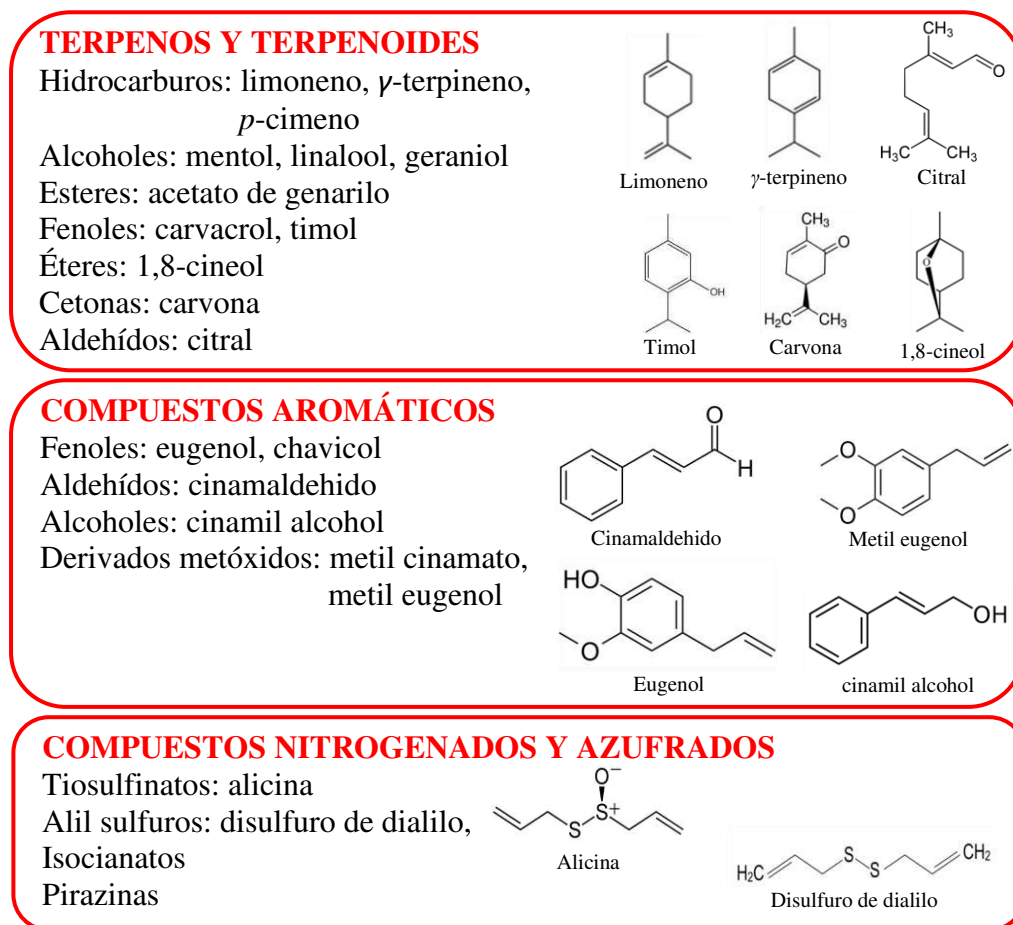
**Figura 1.3.** Elementos de un cromatógrafo de gases.

La CG, por tanto, es una técnica de análisis que ofrece resoluciones excelentes con sensibilidad del orden de miligramos a picogramos. En el análisis de AE se pueden determinar los diferentes componentes que lo constituyen y la proporción en la que se encuentran.

Los compuestos orgánicos de bajo peso molecular que constituyen a los AE incluyen los terpenos, sesquiterpenos, aldehídos, compuestos aromáticos, cetonas y compuestos fenólicos (Figura 1.4) (Dima & Dima, 2015; Hyldgaard *et al.*, 2012; Martucci *et al.*, 2015).



En la Tabla I.1 se presenta un resumen de la composición de algunos AE de interés. Como se observa, son muchos los compuestos que conforman un AE, y es justamente esta variabilidad lo que da las diferentes propiedades y aplicaciones de los mismos.



**Figura 1.4.** Familias diversas de compuestos orgánicos de bajo peso molecular presentes en los aceites esenciales.

### 1.3 Propiedades bioactivas de los aceites esenciales

Los AE han sido utilizados durante mucho tiempo en diferentes áreas como la perfumería y la cosmética debido a su fácil disponibilidad, presentar pocos efectos secundarios y una adecuada capacidad de biodegradarse. Especial interés tiene el estudio de sus componentes para ser aplicados en la medicina debido a sus propiedades antiinflamatorias (Arranz *et al.*, 2015), sedantes, digestivas, antioxidantes (Amiri, 2012; Kavooosi & Rowshan, 2013) y citotóxicas (Yap *et al.*, 2014). Además, los AE han demostrado tener propiedades preventivas contra algunos tipos de cáncer (Raut & Karuppaiyl, 2014). Así

mismo, presentan la capacidad de controlar el crecimiento de una amplia gama de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoos e insectos (Abbaszadeh, Sharifzadeh, Shokri, Khosravi, & Abbaszadeh, 2014; Cornelius & Wycliffe, 2015; Granata *et al.*, 2018; Pavela & Benelli, 2016).

**Tabla I.1.** Componentes químicos de interés presentes en algunos aceites esenciales.

PLANTA	NOMBRE CIENTÍFICO	COMPONENTES MAYORITARIOS	REFERENCIAS
Bergamota	<i>Citrus bergamia</i>	Limoneno y acetato de linalilo	Nabiha <i>et al.</i> , 2010 Navarra <i>et al.</i> , 2015
Canela	<i>Cinnamomum verum</i>	Cinamaldehído, acetato de cinamilo, $\beta$ -felandreno y linalool	Unlu <i>et al.</i> , 2010 Choi <i>et al.</i> , 2016
Limón	<i>Cymbopogon citratus</i>	Geraniol y nerol	Pinto <i>et al.</i> , 2015 Tofiño-Rivera <i>et al.</i> , 2016
Lavanda	<i>Lavandula officinalis</i>	Linalol, alcanfor, acetato de linalilo, hidrato de trans-sabineno, $\beta$ -pineno y 1,8-cineol	Ferreira <i>et al.</i> , 2018 López <i>et al.</i> , 2017 Silva-Flores <i>et al.</i> , 2019
Orégano	<i>Origanum compactum</i>	Carvacrol, timol, $\gamma$ -terpineno y <i>p</i> -cimeno	Habbadi <i>et al.</i> , 2018 Ouedrhiri <i>et al.</i> , 2016
	<i>Origanum vulgare</i>	$\gamma$ -terpineno, hidrato de trans-sabineno y terpinen-4-ol	Fikry <i>et al.</i> , 2019
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alcanfor, $\alpha$ -pineno, camfeno y 1,8-cineol	Takayama <i>et al.</i> , 2016 Mekonnen <i>et al.</i> , 2016 Guerra-Boone <i>et al.</i> , 2015
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Timol, carvacrol, $\gamma$ -terpineno y <i>p</i> -cimeno	Habbadi <i>et al.</i> , 2018 Nikolić <i>et al.</i> , 2014 Lugo-Estrada <i>et al.</i> , 2019
Eucalipto	<i>Eucalyptus</i> spp.	1,8-cineol, <i>p</i> -cimeno y $\alpha$ -terpineol	Hafsa <i>et al.</i> , 2016 Harkat-Madouri <i>et al.</i> , 2015 Batish, Singh, Kohli, & Kaur, 2008

Particularmente, su actividad insecticida se ha aprovechado en la agricultura con la finalidad de reducir el uso de químicos sintéticos para el control de fitopatógenos (Ferreira *et al.*, 2015; Herrera-Romero, Ruales, Caviedes, & Leon-Reyes, 2017; Pavela, 2007). Por otro lado, en la industria alimentaria, los AE son considerados sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) que pueden ser utilizados como agentes aromatizantes, antioxidantes y, principalmente, como conservadores de alimentos. Dussault *et al.* (2014) determinaron que algunos AE comerciales (i.e. *Pimenta officinalis*, *Ocimum basilicum* L., *Thymus mastichina*) presentaban una potente actividad antimicrobiana en comparación con las oleorresinas (extractos semisólidos compuestos de una resina) obtenidas de la misma especie vegetal. Estos AE fueron mucho más efectivos contra bacterias gram positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*) y bacterias gram negativas (*E. coli*, *S. Typhimurium* y *P. aeruginosa*). Esto es muy importante ya que muchas especies de bacterias gram negativas causan enfermedades epidemiológicas y son considerados patógenos en el sector alimentario. Pesavento *et al.* (2015) reportaron que los AE de especies de *Rosmarinus*, *Thymus* y *Oreganum* tenían un potencial uso como conservadores de productos cárnicos, ya que demostraron una actividad como agentes bacteriostáticos y bactericidas contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

Recientemente, los AE han sido utilizados con éxito para controlar hongos y bacterias fitopatógenas, por lo tanto, se han aplicado satisfactoriamente para la protección de frutas y hortalizas. Por ejemplo, Bautista-Baños *et al.* (2013) reportaron que los AE de *Cinnamomum zeylanicum* y *Syzygium aromaticum* tenían la capacidad de disminuir la incidencia de la *antracnosis* en papaya (*Carica papaya* L.). Para los frutos tratados con estos AE la incidencia de la enfermedad alcanzó el 13 %, en comparación con el 35 % de los frutos no tratados. Esta enfermedad es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y es considerada la principal enfermedad postcosecha en papaya. En otro estudio, Habbadi *et al.* (2018) determinaron la actividad antibacteriana de diferentes AE de plantas aromáticas contra la bacteria *Allorhizobium vitis*, causante de la enfermedad de la *agalla de la corona*, que afecta el crecimiento y la producción de la vid en todo el mundo. Los AE de *Origanum compactum* y *Thymus vulgaris* mostraron actividades antibacterianas significativas *in vitro*, con porcentajes de inhibición de 67.5 y 41.6 %, respectivamente.

respectivamente. Finalmente, Sarkhosh *et al.* (2018) reportaron la efectividad de los AE de *Mentha piperita* Willd., *Satureja khuzistanica* Jamzad., *Thymus daenensis* Celak., *Cinnamomum zeylanicum* Blume., *Lavandula angustifolia* Mill., *Eucalyptus globulus* Labill., *Myrtus communis* Linn. y *Melaleuca alternifolia* Cheel. para controlar la pudrición de fruta causada por el ataque de diferentes fitopatógenos. Los resultados mostraron una reducción del 100 % en el crecimiento del micelio de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryosphaeria* sp., *Phytophthora palmivora* y *Fusarium solani* después de aplicar el AE de *Thymus daenensis* Celak. y el de *Satureja khuzistanica* Jamzad. en todas las concentraciones probadas (i.e. 100-1500 µl/L); el resto de los AE presentaron actividades menores contra estos fitopatógenos.

Así mismo, se han reportado algunas ventajas de los AE relacionadas con su capacidad antioxidante. Asensio *et al.* (2017) determinaron que el AE de *Origanum vulgare* libre y protegido en microcápsulas mantenía una importante actividad antioxidante que podía ser aprovechada como conservador alimentario. Los autores reportaron que la encapsulación de los AE, además de ayudar a preservar su actividad biológica (e.g. antioxidante), constituye una alternativa para mejorar su manejo y distribución en una matriz alimentaria. De igual manera, Martucci *et al.* (2015) reportó que los AE de *Origanum vulgare* y *Lavandula officinalis*, además de contar con una elevada capacidad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*, presentaban una importante cantidad de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, lo cual daba viabilidad a su uso como conservadores de origen natural. En otro estudio, el AE de *Syzygium lanceolatum* fue caracterizado químicamente, encontrando varios componentes fitoquímicos con valor terapéutico (e.g. germacreno, eugenol). Además, se determinó la capacidad antioxidante por medio de los ensayos DPPH y ABTS<sup>+</sup>, obteniendo valores de 69.97 y 73.01 %, respectivamente. Los autores indicaron que este AE tenía un potencial importante para ser usado como conservador natural en diferentes matrices alimentarias (Muthumperuma *et al.*, 2016).

Estos hallazgos resaltan el interés científico sobre los AE, ya que representan un grupo distintivo de posibles nuevos compuestos, tanto farmacológicos como conservadores alimentarios que, debido a su variación química y estructural, los hace funcionalmente versátiles.

## **1.4 Perspectivas en la industria alimentaria de los aceites esenciales incorporados en recubrimientos, películas y nanopartículas poliméricas**

### **1.4.1 Recubrimientos y películas**

Los AE presentan actividades biológicas que los posicionan como una opción viable para tener diferentes aplicaciones en la industria alimentaria como aditivos conservadores y antioxidantes. Para ello, se han buscado diferentes alternativas para su aplicación, incluyendo su incorporación en recubrimientos (RC) y películas comestibles (PC). Un RC es una matriz continua y delgada, que es incorporada alrededor del alimento generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora (Eça *et al.*, 2014); al secarse, el recubrimiento queda adherido directamente sobre el fruto. Por su parte, las PC se pueden definir como una matriz preformada y delgada que posteriormente será utilizada en forma de recubrimiento del alimento o también puede estar ubicada entre los componentes del mismo (Quintero *et al.*, 2010). Los RC y PC deben cumplir ciertas propiedades que incluyen (Fernández Valdés *et al.*, 2015):

- No ser tóxicos.
- Requerir una tecnología simple para su elaboración.
- Ejercer protección ante la acción física, química y mecánica.
- Ser transparentes y no ser detectados durante su consumo.
- Mejorar las propiedades mecánicas y preservar la textura.
- Prolongar la vida útil de alimentos a través del control del desarrollo de microorganismos.
- Regular distintas condiciones de interfase o superficiales del alimento a través del agregado de aditivos como antioxidantes, agentes antimicrobianos y nutrientes.
- Formar una barrera sobre la superficie del alimento que interfiera en la transferencia de distintas sustancias.
- Adecuada permeabilidad al vapor de agua, solutos y una permeabilidad selectiva a gases volátiles, desde el alimento hacia el exterior y viceversa.

Los RC y PC han sido utilizados exitosamente en frutas y hortalizas. Las soluciones formadoras de RC o PC pueden ser polisacáridos, lípidos, proteínas o una mezcla de los

anteriores. Dentro de los más utilizados se tienen el quitosano, alginato, almidón y pululano, entre otros (Atarés & Chiralt, 2016; Grande-Tovar *et al.*, 2018; Lemes *et al.*, 2017; Perdonés *et al.*, 2016). Tanto el RC como la PC modifican la interacción del fruto con el medio ambiente debido a la barrera que forma en su superficie, la cual presenta resistencia a la transmisión de humedad y gases producidos por el fruto. Este efecto provoca un retraso en la respiración del fruto, disminuyendo así su metabolismo y prolongando su tiempo de vida útil (Sivakumar & Bautista-Baños, 2014). Es importante resaltar que, si además de la presencia de esta barrera se incorporan compuestos con actividad biológica, como los AE, el efecto se potencializa ya que las propiedades del activo (e.g. antimicrobianas y/o antioxidantes) son aprovechadas para proteger y preservar por más tiempo al alimento. La principal ventaja de usar AE en combinación con RC y PC, es que se puede mejorar y aumentar el tiempo de contacto entre el AE y la superficie de la fruta. Lee *et al.* (2016) reportaron que una PC compuestas de las proteínas extraídas de harina de semilla de pimienta roja, gelatina y AE de *Origanum vulgare* L. redujeron las poblaciones de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* inoculadas en carne de atún, durante 12 días de almacenamiento, en comparación con el control. Además, se disminuyó el grado de oxidación de lípidos en la carne del atún durante el almacenamiento. Acosta *et al.* (2016) estudiaron la actividad antimicrobiana de los AE de canela, clavo de olor y orégano incorporados a RC y PC formados por una mezcla de gelatina, almidón y glicerol. Estos recubrimientos presentaron una actividad antifúngica contra dos especies de hongos fitopatógenos, *Colletotrichum gloeosporoides* y *Fusarium oxysporum*, al reducir su diámetro de inhibición de crecimiento. Javidi, Hosseini & Rezaei (2016) desarrollaron y caracterizaron una PC de ácido poliláctico adicionada con AE de *Origanum vulgare* L. Se determinó que la inclusión del AE produjo plastificación en la película y mejoró su flexibilidad. Además, las películas desarrolladas mostraron un notable efecto bactericida contra *S. aureus*, *L. monocitogenes*, *E. coli* y *S. enteritidis*. Los autores concluyeron que la adición de AE puede ofrecer una buena perspectiva para las películas bioactivas y, por lo tanto, podrían ser adecuadas para utilizarse como envases biodegradables de alimentos. Otros ejemplos de aplicación de RC y PC con AE se presentan en la Tabla I.2.

**Tabla I.2.** Aceites esenciales incorporados con recubrimientos y películas comestibles aplicados como conservadores de alimentos.

RECUBRIMIENTO/ACEITE ESENCIAL	PATÓGENO BLANCO	REFERENCIA
Quitosano/limón	<i>B. cinerea</i>	Perdones <i>et al.</i> , 2016
Goma arábica/canela	<i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. musae</i>	Maqbool <i>et al.</i> , 2011
Goma mezquite/tomillo y lima mexicana	<i>C. gloeosporioides</i> y <i>R. stolonifer</i>	Bosquez-Molina <i>et al.</i> , 2010
Quitosano/bergamota, tomillo y árbol de té	<i>P. italicum</i>	Cháfer <i>et al.</i> , 2012
Gelatina/orégano y lavanda	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	Martucci <i>et al.</i> , 2015
Ácido poliláctico/romero, tomillo y arrayán	<i>A. niger</i> sp.	Yahyaoui <i>et al.</i> , 2016
Proteína de soya/orégano y tomillo	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>L. plantarum</i>	Emiroğlu <i>et al.</i> , 2010
Alginato/canela y romero	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i> ,	Raeisi <i>et al.</i> , 2016
Quitosano/citronela y cedro	-----	Shen & Kamdem, 2015
Alginato/orégano	<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. Enteritidis</i>	Benavides <i>et al.</i> , 2012
Quitosano/limón, tomillo y canela	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	Peng & Li, 2014
Alginato/canela, hierba de limón y clavo	<i>E. coli</i>	Raybaudi-Massilia <i>et al.</i> , 2008

### 1.4.2 Nanotecnología y aceites esenciales

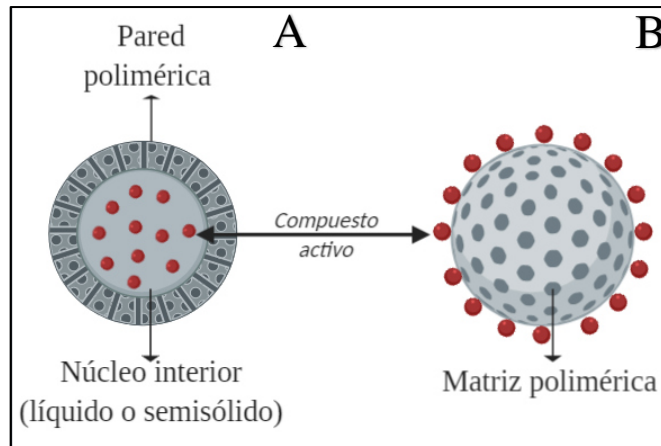
Los AE, junto con los extractos naturales, se encuentran entre los derivados de productos naturales que tienen la mayor probabilidad de ejercer un impacto notable dentro de la industria alimentaria debido a las propiedades bioactivas de sus componentes. A pesar del gran potencial que presentan los AE, su uso y aplicación como aditivos alimentarios presenta ciertas limitaciones, ya que tienden a deteriorarse con facilidad debido a factores ambientales, como la luz y el oxígeno.

Además, son propensos a volatilizarse (Asbahani, Miladi, Badri *et al.*, 2015b) y su baja solubilidad en agua, hace difícil incorporarlos en productos comerciales (Atarés & Chiralt, 2016; Feyzioglu & Tornuk, 2016). También es importante mencionar que los AE pueden presentar un intenso aroma y sabor que podrían interferir en las propiedades organolépticas del alimentos (Shen & Kamdem, 2015).

Debido a lo anterior, es de suma importancia buscar estrategias efectivas para proteger, controlar sus características negativas y/o mejorar la aplicación de los AE. Así, la nanoencapsulación de AE se ha convertido en una alternativa para su aplicación en alimentos, ya que, además de reducir la reactividad de los compuestos con su entorno y disminuir su transferencia hacia el medio ambiente, también permite enmascarar sabores y promover la distribución homogénea de los activos en su aplicación final (Martínez Rivas *et al.*, 2017; Sozer & Kokini, 2009).

Las nanopartículas poliméricas (NP) se definen como sólidos de tamaño submicrónico (<600 nm) que actúan como acarreadores de compuestos activos y pueden estar preparadas de materiales biodegradables o no biodegradables. El compuesto encapsulado puede encontrarse absorbido, adsorbido, solubilizado, disperso o unido covalentemente a la estructura polimérica (Bareras-Urbina *et al.*, 2016). La nanoencapsulación es el proceso en el que el ingrediente activo (e.g. AE, extractos naturales, fármacos, vitaminas) está rodeado por una pared polimérica para formar nanocápsulas (NC) o está inmerso en una matriz polimérica para formar nanoesferas (Mishra, Patel, & Tiwari, 2010) (Figura 1.5).





**Figura 1.5.** Tipos de nanopartículas poliméricas: nanocápsulas (vesicular) (A) y nanoesferas (matriz) (B).

La aplicación de NP para mantener las propiedades de los AE y protegerlos ha sido estudiada en los últimos años (Tabla I.3). Hosseini, Zandi, Rezaei, & Farahmandghavi (2013) incorporaron el AE de orégano a NP de quitosano mediante el método de emulsificación y gelificación iónica. A través de la espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier, espectrofotometría UV-VIS, análisis termogravimétrico y técnicas de difracción de rayos X se demostró la encapsulación del AE de orégano. Las nanopartículas obtenidas presentaron un tamaño de 40-80 nm y una eficiencia de encapsulación y un porcentaje de encapsulación de 21-47 % y 3-8 %, respectivamente. Los estudios de liberación *in vitro* mostraron una liberación rápida al inicio, seguida de una liberación lenta del activo. Así mismo, Wu, Luo, & Wang (2012) reportaron la encapsulación del AE de tomillo y de carvacrol en NP de zeína utilizando el método de dispersión líquido-líquido. Las propiedades antioxidantes se analizaron mediante el ensayo de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el ion férrico. El DPPH se redujo en el rango de 24.8–66.8 %, dependiendo de la formulación. Por medio del ensayo con ion férrico se determinó que los radicales libres de hidroxilo se eliminaron en un 60-90 %. Además, se presentó una reducción en el crecimiento de *Escherichia coli* a 0.8-1.8 log CFU/mL en presencia de NP con AE, en comparación con el control (7.5 log CFU/mL). Asbahani *et al.* (2015a) nanoencapsularon los AE de *Thymus leptobotris*, *Thymus satureoides*, *Pelargonium graveolens*, *Eugenia Caryophyllata* y su componente principal, eugenol. Se utilizó la técnica de nanoprecipitación empleando como polímero Eudragit RS 100.

**Tabla I.3.** Aceites esenciales o algunos de sus componentes formulados en nanopartículas poliméricas aplicados en alimentos.

<b>POLÍMERO FORMADOR DE LA NANOPARTÍCULA</b>	<b>ACEITE ESENCIAL O COMPONENTE</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>REFERENCIA</b>
Quitosano	<i>Satureja hortensis</i> L.	Actividades antibacteriana y antioxidantes mejoradas	Feyzioglu & Tornuk, 2016
Polietilenglicol	<i>Allium sativum</i>	Liberación controlada de AE contra <i>Tribolium castaneum</i>	Yang <i>et al.</i> , 2009
Quitosano	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> L.	Protección contra la evaporación del AE, liberación sostenida y enmascaramiento de sabor y olor del AE	Ghaderi-Ghahfarokhi <i>et al.</i> , 2017
Eudragit L 100-55	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Aumento de la vida útil de <i>Vitis vinefera</i> L.	Piña-Barrera <i>et al.</i> , 2019
Poly( $\epsilon$ -caprolactona)	<i>Thymus capitatus</i> y <i>Origanum vulgare</i>	Mejora en la actividad antimicrobiana contra patógenos transmitidos por alimentos	Granata <i>et al.</i> , 2018
Eudragit RS 100	<i>Thymus leptobotrys</i> , <i>Thymus satureoides</i> , <i>Pelargonium graveolent</i> , <i>Eugenia caryophyllata</i> y <i>eugenol</i>	Mantuvo la actividad antimicrobiana con liberación sostenida del activo	Asbahani <i>et al.</i> , 2015a
Quitosano	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Mejoró la actividad antimicrobiana y controló los cambios químicos y sensoriales indeseables en productos cárnicos	Ghaderi-Ghahfarokhi, Barzegar, Sahari, & Azizi, 2016
Metilcelulosa/etilcelulosa	<i>Citronela</i> , <i>eugenol</i> , <i>terpinen-4-ol</i> y <i>timol</i>	Mejoró la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los compuestos	Wattanasatcha <i>et al.</i> , 2012
Eudragit RS 100	<i>Citrus bergamia</i> y <i>Citrus sinensis</i>	Aumento en la actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> y prolongación de la vida útil de jugo de naranja	Froio <i>et al.</i> , 2019
Alginato/goma cashew	<i>Lippia sidoides</i>	Liberación controlada y sostenida del AE	de Oliveira <i>et al.</i> , 2014
Quitosano	<i>Mentha piperita</i> y <i>Camellia sinensis</i>	Aumento en la estabilidad de los compuestos fenólicos de los AE e incremento de actividad antioxidante y antimicrobiana	Shetta, Kegere, & Mamdouh, 2019

Las nanopartículas formadas tuvieron un tamaño promedio de 110 nm y un potencial zeta de +81 mV. La composición química de los AE encapsulados se investigó mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas, confirmando la similitud con los no encapsulados. Los ensayos antimicrobianos, a una misma concentración (0.4 %, v/v), presentaron actividad tanto bacteriostática como fungistática, las cuales fueron relativamente menores que los AE no encapsulados; es decir, dichas actividades no desaparecieron, sino que se mantuvieron. En otro estudio, Sotelo-Boyás *et al.* (2017) elaboraron NP de quitosano con AE de lima incorporado, utilizando la técnica de nanoprecipitación. Las NP se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, además se determinó el potencial zeta. De igual manera, se estudió la actividad antibacteriana de las NP contra cuatro patógenos transmitidos por alimentos (i.e. *S. aureus*, *L. monocitogenes*, *S. dysenteriae* y *E. coli*). La mayor actividad antibacteriana se presentó para las NP de quitosano con AE de lima contra *S. dysenteriae*, alcanzando un valor de halo de inhibición de 3.5 cm.

## 1.5 Conclusión

Los AE presentan una gama importante de atributos para ser aprovechados en diferentes áreas como la medicina, farmacología, agricultura y, principalmente, la alimentaria. En este contexto, en primer lugar, la exigencia de los consumidores por obtener alimentos saludables que utilicen sustancias naturales para su conservación va en aumento de manera importante. En segundo lugar, existe una búsqueda constante de métodos de conservación alternativos, eficaces y amigables con el medio ambiente, donde, los AE y sus compuestos bioactivos podrían desempeñar un papel notable como fuente de conservadores de alimentos.

Lamentablemente, debido a la complejidad de su composición, su aplicación presenta limitaciones, ya que tienen una tendencia natural al deterioro, baja solubilidad y una muy alta volatilidad. Debido a esto, se han buscado diferentes estrategias para disminuir o controlar estas limitaciones y de esta manera aprovechar mejor sus cualidades en la industria alimentaria.

Así, la combinación de AE con RC y PC hace posible utilizar de mejor manera su potencial al aumentar el tiempo de residencia y mejorar el contacto entre el AE y la superficie del

alimento. Su uso ha sido implementado recientemente y el efecto positivo como conservador de alimentos en frutas y hortalizas ha sido reportado.

Además, la nanotecnología, a través de la nanoencapsulación y protección de compuestos activos con actividad antimicrobiana y antioxidante (i.e. AE), recientemente se ha utilizado para mejorar las cualidades biológicas de los AE, evitando las interacciones con el medio ambiente, disminuyendo su tendencia natural a volatilizarse, controlando la liberación de sus componentes y permitiendo su solubilidad en sistemas acuosos. Además, la capacidad de las NP de enmascarar olores o sabores que pudieran dificultar su uso confiere una importante ventaja para que los AE sean incorporados en una mayor variedad de alimentos. Se ha demostrado que los AE pueden combinarse con cualquiera de estas dos tecnologías, RC, PC y NP, de manera efectiva, ampliando y mejorado su campo de aplicación.

## 1.6 Bibliografía

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, 24(2), e51–e56. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>
- Acosta, S., Chiralt, A., Santamarina, P., Rosello, J., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2016). Antifungal films based on starch-gelatin blend, containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 61, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.008>
- Amiri, H. (2012). Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2012/728065>
- Arranz, E., Jaime, L., López de las Hazas, M. C., Reglero, G., & Santoyo, S. (2015). Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. *Industrial Crops and Products*, 67, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.012>
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Addi, E. H. A., Bitar, A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Elaissari, A. (2015a). Antimicrobial activity of nano-encapsulated essential oils: comparison to non-encapsulated essential oils. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 4(1), 39–38. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2015.1118>
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Elaissari, A. (2015b). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1–2), 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Asensio, C. M., Paredes, A. J., Martín, M. P., Allemandi, D. A., Nepote, V., & Grosso, N. R. (2017). Antioxidant stability study of oregano essential oil microcapsules prepared by spray-drying. *Journal of Food Science*, 82(12), 2864–2872. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13951>
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>
- Bagheri, H., Abdul Manap, M. Y. Bin, & Solati, Z. (2014). Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential

- oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydro-distillation. *Talanta*, 121, 220–228. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2014.01.007>
- Bareras-Urbina, C. G., Ramírez-Wong, B., López-Ahumada, G. A., BurrueI-Ibarra, S. E., Martínez-Cruz, O., Tapia-Hernández, J. A., & Rodríguez Félix, F. (2016). Nano- and micro-particles by nanoprecipitation: Possible application in the food and agricultural industries. *International Journal of Food Properties*, 19(9), 1912–1923. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1089279>
- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12), 2166–2174. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008>
- Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., Bello-Pérez, A., Villanueva-Arce, R., & Hernández-López, M. (2013). A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection*, 49, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>
- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., & Reyes, J. E. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.023>
- Bosquez-Molina, E., Jesús, E. R. de, Bautista-Baños, S., Verde-Calvo, J. R., & Morales-López, J. (2010). Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 57(2), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.008>
- Castelo Branco Melo, N. F., de MendonçaSoares, B. L., Marques Diniz, K., Ferreira Leal, C., Canto, D., Flores, M. A. P., Montenegro Stamford, T. C. (2018). Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.014>
- Cháfer, M., Sánchez-González, L., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2012). Fungal decay and shelf life of oranges coated with chitosan and bergamot, thyme, and tea tree essential oils. *Journal of Food Science*, 77(8), E182–E187. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02827.x>
- Choi, O., Cho, S. K., Kim, J., Park, C. G., & Kim, J. (2016). *In vitro* antibacterial activity and major bioactive components of *Cinnamomum verum* essential oils against cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(4), 308–314. <https://doi.org/10.1016/J.APJTb.2016.01.007>
- Conde-Hernández, L. A., Espinosa-Victoria, J. R., Trejo, A., & Guerrero-Beltrán, J. (2017). CO<sub>2</sub>-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Food Engineering*, 200, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022>
- Cornelius, W.W. & Wycliffe, W. (2016). Tagetes (*Tagetes minuta*) Oils. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, 791–802.
- de Oliveira, E. F., Paula, H. C. B., & de Paula, R. C. M. (2014). Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.038>
- Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.003>
- Donsì, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233, 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>
- Dussault, D., Vu, K. D., & Lacroix, M. (2014). *In vitro* evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Science*, 96(1), 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.015>
- Eça, K. S., Sartori, T., & Menegalli, F. C. (2014). Films and edible coatings containing antioxidants - a review. *Brazilian Journal of Food Technology*, 17(2), 98–112. <https://doi.org/10.1590/bjft.2014.017>
- 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*,

- Fernández Valdés, D., Bautista Baños, S., Fernández Valdés, D., Ocampo Ramírez, A., García Pereira, A., & Falcón Rodríguez, A. (2015). Eatable films and coverings: A favorable alternative in the postharvest conservation of fruits and vegetables. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24(3), 52–57. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2071-00542015000300008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542015000300008)
- Ferreira, S. G., Conceição, V. S., Gouveia, N. S., Santos, G. S., Santos, R. L. C., Lira, A. A. M., Nunes, R. S. (2015). An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on *in situ* gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. *Journal of Colloid and Interface Science*, 456, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.06.012>
- Ferreira, L. E., Benincasa, B. I., Fachin, A. L., Contini, S. H. T., França, S. C., Chagas, A. C. S., & Belebóni, R. O. (2018). Essential oils of *Citrus aurantifolia*, *Anthemis nobile* and *Lavandula officinalis*: *in vitro* anthelmintic activities against *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors*, 11(1), 269. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2849-x>
- Feyzioglu, G. C., & Tornuk, F. (2016). Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.037>
- Fikry, S., Khalil, N., & Salama, O. (2019). Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *AMB Express*, 9(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0764-y>
- Froio, F., Ginot, L., Paolino, D., Lebaz, N., Bentaher, A., Fessi, H., & Elaissari, A. (2019). Essential oils-loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. *Polymers*, 11(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/polym11061017>
- Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., Ahmadi Gavlighi, H., & Gardini, F. (2017). Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.002>
- Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Azizi, M. H. (2016). Nanoencapsulation approach to improve antimicrobial and antioxidant activity of thyme essential oil in beef burgers during refrigerated storage. *Food and Bioprocess Technology*, 9(7), 1187–1201. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1708-z>
- Granata, G., Stracquadanio, S., Leonardi, M., Napoli, E., Consoli, G. M. L., Cafiso, V., Geraci, C. (2018). Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chemistry*, 269, 286–292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.140>
- Grande-Tovar, C. D., Chaves-Lopez, C., Serio, A., Rossi, C., & Paparella, A. (2018). Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involve in fruit decay and mechanisms of action. *Trends in Food Science and Technology*, 78(May), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.019>
- Guerra-Boone, L., Alvarez-Román, R., Salazar-Aranda, R., Torres-Cirio, A., Rivas-Galindo, V. M., Waksman de Torres, N., Pérez-López, L. A. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 363–369.
- Habbadi, K., Meyer, T., Vial, L., Gaillard, V., Benkirane, R., Benbouazza, A., Lavire, C. (2018). Essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus vulgaris* exert a protective effect against the phytopathogen *Allorhizobium vitis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), 29943–29952. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1008-9>
- Hafsa, J., Smach, M. ali, Ben Khedher, M. R., Charfeddine, B., Limem, K., Majdoub, H., & Rouatbi, S. (2016). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT Food Science and Technology*, 68, 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.050>
- Harkat-Madouri, L., Asma, B., Madani, K., Bey-Ould Si Said, Z., Rigou, P., Grenier, D., Boulekbache-Makhlouf, L. (2015). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of

- Eucalyptus globulus* from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 78, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.015>
- Herrera-Romero, I., Ruales, C., Caviedes, M., & Leon-Reyes, A. (2017). Postharvest evaluation of natural coatings and antifungal agents to control *Botrytis cinerea* in *Rosa* sp. *Phytoparasitica*, 45, 9–20. <https://doi.org/10.1007/s12600-017-0565-2>
- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Javidi, Z., Hosseini, S. F., & Rezaei, M. (2016). Development of flexible bactericidal films based on poly(lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.052>
- Kavoosi, G., & Rowshan, V. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. *Food Chemistry*, 138(4), 2180–2187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.131>
- Lee, J. H., Yang, H. J., Lee, K. Y., & Song, K. Bin. (2016). Physical properties and application of a red pepper seed meal protein composite film containing oregano oil. *Food Hydrocolloids*, 55, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.013>
- Lemes, G. F., Marchiore, N. G., Moreira, T. F. M., Da Silva, T. B. V., Sayer, C., Shirai, M. A., Leimann, F. V. (2017). Enzymatically crosslinked gelatin coating added of bioactive nanoparticles and antifungal agent: Effect on the quality of Benitaka grapes. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.050>
- Linde, G. A., Colauto, N. B., Albertó, E., & Gazim, Z. C. (2016). Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. *Rev. Bras. Pl. Med. Campinas*, 18(1), 191–200. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_037](https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_037)
- López, V., Nielsen, B., Solas, M., Ramírez, M. J., & Jäger, A. K. (2017). Exploring pharmacological mechanisms of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on central nervous system targets. *Frontiers in Pharmacology*, 8(5), 280. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00280>
- Lugo-Estrada, L., Galindo-Rodríguez, S. A., Pérez-López, L. A., Waksman de Torres, N., & Álvarez-Román, R. (2019). Headspace–solid-phase microextraction gas chromatography method to quantify *Thymus vulgaris* essential oil in polymeric nanoparticles. *Pharmacognosy Magazine*, 15(1), 473–478. <https://doi.org/10.4103/pm.pm>
- Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P. G., Mohamed, M. T. M., Siddiqui, Y., & Zahid, N. (2011). Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 62(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.04.002>
- Martínez Rivas, C. J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Elaissari, A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(1), 66–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>
- Martucci, J. F., Gende, L. B., Neira, L. M., & Ruseckaite, R. A. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.079>
- Mekonnen, A., Yitayew, B., Tesema, A., & Taddese, S. (2016). *In vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Microbiology*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/9545693>
- Mercado, P., Llenque, L., & Laguna, M. (2014). Sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a concentración de aceite de *Citrus reticulata* variedad Satsuma “mandarina”. *Ciencia y*

- Mishra, B., Patel, B. B., & Tiwari, S. (2010). Colloidal nanocarriers: A review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(1), 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.008>
- Muthumperuma, C., Stalin, N., K. Das, A., & Sudhakar Swamy, P. (2016). Chemical profiling of leaf essential oil, antioxidant potential and antibacterial activity of *Syzygium lanceolatum* (Lam.) Wt. & Arn. (Myrtaceae). *Free Radicals and Antioxidants*, 6(1), 13–22. <https://doi.org/10.5530/fra.2016.1.2>
- Nabiha, B., Abdelfatteh, E. O., Faten, K., Hervé, C., & Moncef, C. M. (2010). Chemical composition of Bergamot (*Citrus Bergamia* Risso) essential oil obtained by hydrodistillation. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 4(29), 1934–7375. <https://www.researchgate.net/publication/202064590>
- Navarra, M., Mannucci, C., Delbò, M., & Calapai, G. (2015). *Citrus bergamia* essential oil: From basic research to clinical application. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 36. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00036>
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.006>
- Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Moja, S., Chahdi, F. O., Taleb, M., & Greche, H. (2016). Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: Optimization of their antibacterial effect. *Industrial Crops and Products*, 89, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.04.049>
- Pavela, R. (2007). Lethal and sublethal effects of thyme oil (*Thymus vulgaris* L.) on the house fly (*Musca domestica* Lin.). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 10(5), 346–356. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2007.10643566>
- Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
- Peng, Y., & Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.013>
- Perdones, A., Escriche, I., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chemistry*, 197, 979–986. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.054>
- Pereira, C. G., & Meireles, M. A. A. (2010). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 340–372. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A. R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Lo Nostro, A. (2015). Antibacterial activity of oregano, rosmarinus and thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54, 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.045>
- Piña-Barrera, A. M., Álvarez-Román, R., Báez-González, J. G., Amaya-Guerra, C. A., Rivas-Morales, C., Gallardo-Rivera, C. T., & Galindo-Rodríguez, S. A. (2019). Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.). *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 18(4), 549–557. <https://doi.org/10.1109/tnb.2019.2941931>
- Pinto, Z. T., Sánchez, F. F., dos Santos, A. R., Fernandes Amaral, A. C., Pinto Ferreira, J. L., Escalona-Arranz, J. C., & de Carvalho Queiroz, M. M. (2015). Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(1), 36–44. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612015006>
- Quintero, J., Falguera, V., & Muñoz, A. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: Importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbaga*, 5, 93–118.



- Raeisi, M., Tabaraei, A., Hashemi, M., & Behnampour, N. (2016). Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, *Cinnamomum zeylanicum*, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during refrigeration. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.042>
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Raybaudi-Massilia, R. M., Rojas-Graü, M. A., Mosqueda-Melgar, J., & Martín-Belloso, O. (2008). Comparative study on essential oils incorporated into an alginate-based edible coating to assure the safety and quality of fresh-cut Fuji apples. *Journal of Food Protection*, 71(6), 1150–1161. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.6.1150>
- Sarkhosh, A., Schaffer, B., Vargas, A. I., Palmateer, A. J., Lopez, P., & Soleymani, A. (2018). *In vitro* evaluation of eight plant essential oils for controlling Colletotrichum, Botryosphaeria, Fusarium and Phytophthora fruit rots of avocado, mango and papaya. *Plant Protection Science*, 54(3), 153–162. <https://doi.org/10.17221/49/2017-PPS>
- Shen, Z., & Kamdem, D. P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.046>
- Shetta, A., Kegere, J., & Mamdouh, W. (2019). Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, *in-vitro* release, antioxidant and antibacterial activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126(1), 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.161>
- Silva-Flores, P. G., Pérez-López, L. A., Rivas-Galindo, V. M., Paniagua-Vega, D., Galindo-Rodríguez, S. A., & Álvarez-Román, R. (2019). Simultaneous GC-FID quantification of main components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula dentata* essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/2837406>
- Sivakumar, D., & Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Sotelo-Boyás, M. E., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., & Corona-Rangel, M. L. (2017). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.022>
- Sozer, N., & Kokini, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010>
- Stauffer, E., Dolan, J. A., & Newman, R. (2008). Chapter 8. Gas Chromatography and gas chromatography-Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*, 235–293. <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-99>
- Takayama, C., de-Faria, F. M., de Almeida, A. C. A., Dunder, R. J., Manzo, L. P., Socca, E. A. R., Luiz-Ferreira, A. (2016). Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 677–681. <https://doi.org/10.1016/J.APJTb.2015.09.027>
- Tofiño-Rivera, A., Ortega-Cuadros, M., Galvis-Pareja, D., Jiménez-Rios, H., Merini, L. J., & Martínez-Pabón, M. C. (2016). Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 749–754. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.044>
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 220, 153–161. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.09.203>
- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., & Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial

- activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3274–3280. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.09.001>
- Wattanasatcha, A., Rengpipat, S., & Wanichwecharungruang, S. (2012). Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1–2), 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.017>
- Wu, Y., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.027>
- Yahyaoui, M., Gordobil, O., Herrera Díaz, R., Abderrabba, M., & Labidi, J. (2016). Development of novel antimicrobial films based on poly(lactic acid) and essential oils. *Reactive and Functional Polymers*, 109, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.09.001>
- Yang, F. L., Li, X. G., Zhu, F., & Lei, C. L. (2009). Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10156–10162. <https://doi.org/10.1021/jf9023118>
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8(1), 6–14. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>

## **CAPÍTULO 2**

**EFECTO PROTECTOR DE NANOCÁPSULAS  
POLIMÉRICAS CON ACEITE ESENCIAL DE  
*Thymus vulgaris* L. EN COMBINACIÓN CON UN  
RECUBRIMIENTO COMESTIBLE DE ALGINATO DE  
SODIO PARA AUMENTAR LA VIDA DE ANAQUEL DE  
PAPAYA (*Carica papaya* L.)**

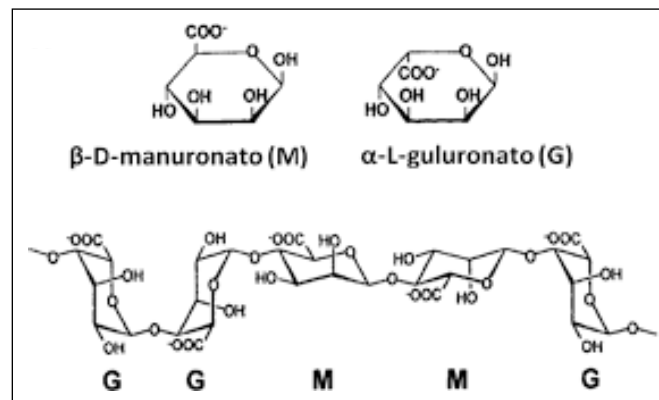
**EFEECTO PROTECTOR DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CON ACEITE  
ESENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. EN COMBINACIÓN CON UN  
RECUBRIMIENTO COMESTIBLE DE ALGINATO DE SODIO PARA  
AUMENTAR LA VIDA DE ANAQUEL DE  
PAPAYA (*Carica papaya* L.)**

## **2.1 Introducción**

México se encuentra entre los 10 principales productores de frutas y hortalizas a nivel mundial. Este tipo de productos son de vital importancia económica, ya que se han exportado aproximadamente 32 mil millones de dólares a 43 países diferentes en el mundo. A su vez, México ocupa el 3er lugar como productor de papaya (*Carica papaya* L.) y es líder mundial en su exportación (SAGARPA, 2018). Lamentablemente, se estima que las pérdidas postcosechas para este producto son cercanas al 30 % de la producción total, lo que equivale aproximadamente a unos 170 millones de dólares. Las mermas de esta magnitud y la falta de estrategias y tecnologías postcosecha adecuadas representan una problemática significativa en el área de alimentos y un considerable daño económico para los productores.

De manera general, las frutas y hortalizas frescas reciben el nombre de productos perecibles debido a su tendencia inherente al deterioro. Durante el período postcosecha de la fruta, es necesario garantizar una vida útil más larga del vegetal. Reportes de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) mencionan que, en los países en desarrollo, existe una gran deficiencia en la infraestructura de comercialización, por lo tanto, las pérdidas de productos frescos posteriores a la cosecha alcanzan hasta el 50 % de la producción total (FAO, 2011). Las pérdidas de esta magnitud provocan daño económico considerable para la cadena productiva alimentaria, especialmente para los productores primarios. Además, la presencia de plagas representa un grave riesgo para la salud del consumidor. La FAO, en colaboración con la Asociación Latinoamericana de Integración (ALADI) y la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), preparó el plan de Pérdida y Desperdicio de Alimentos (PDA), que promueve el desarrollo de tecnologías innovadoras que contribuyan a reducir la pérdida de alimentos en todas las etapas de su cadena de

producción (FAO, 2015). En años recientes, se han propuesto diferentes alternativas para preservar los productos hortofrutícolas, incluido el uso de recubrimientos comestibles protectores. Un recubrimiento comestible (RC) se define como una capa continua y delgada que es incorporada sobre el alimento. El uso de recubrimientos modifica la interacción de la fruta con el medio ambiente debido a sus propiedades fisicoquímicas, prolongando la vida útil de las frutas tratadas (Eça, Sartori, & Menegalli, 2014). Se han utilizado diferentes compuestos formadores de RC, incluidos el quitosano, alginato, almidón y pululano, entre otros (Atarés & Chiralt, 2016; Grande-Tovar, Chaves-Lopez, Serio, Rossi, & Paparella, 2018; Lemes *et al.*, 2017; Perdonés, Escriche, Chiralt, & Vargas, 2016). El alginato de sodio (AL) es un polímero glicosídico constituido por los ácidos D-manurónico y L-gulurónico (Figura 2.1) y es extraído de las algas pardas (Phaeophyceae) (Guerreiro *et al.*, 2015).



**Figura 2.1.** Estructura química del alginato obtenido de algas pardas (Phaeophyceae).

El AL puede formar recubrimientos comestibles y presenta varias ventajas sobre otros polisacáridos. Por ejemplo, no es tóxico, es biocompatible, tiene facilidad de solubilización, presenta capacidad de formar recubrimientos funcionales y tiene bajo costo. Además, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha clasificado al AL como GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro). Sus propiedades funcionales, estabilización, formación de película y gelificación han sido muy estudiadas (Riquelme, Herrera, & Matiacevich, 2017; Tavassoli-Kafrani, Shekarchizadeh,

& Masoudpour-Behabadi, 2016). Los RC de AL pueden influir en la fisiología de los frutos ya que actúa como una barrera entre el medio ambiente y el vegetal.

El efecto protector de los RC de AL también puede mejorarse mediante la adición de compuestos que exhiben alguna actividad biológica, como los aceites esenciales (AE). Debido a sus actividades antioxidantes y antimicrobianas, los AE se ha convertido en una alternativa importante e innovadora para el control y la reducción de las pérdidas posteriores a la cosecha (Pandey, Kumar, Singh, Tripathi, & Bajpai, 2017). De hecho, las propiedades antimicrobianas de los AE se han utilizado para controlar hongos y bacterias fitopatógenas (Camele *et al.*, 2012; Choudhary, Sharma, Agarwal, Varma, & Tuteja, 2017). En particular, el AE obtenido de la planta *Thymus vulgaris* L. (AET) se ha utilizado ampliamente como aditivo en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos. Por ejemplo, en la medicina alternativa, el AET ha sido útil por sus efectos antisépticos, carminativos, expectorantes, antimicrobianos y antioxidantes (Agili, 2014; Amiri, 2012; Ballester-Costa, Sendra, Fernández-López, Pérez-Álvarez, & Viuda-Martos, 2013; Nabavi *et al.*, 2015; Salehi *et al.*, 2018). En la industria alimentaria, el AET y sus componentes, se han utilizado como aditivos aromáticos, antioxidantes y conservadores. Además, la FDA lo ha clasificado como sustancia GRAS (Lozada Ordonez, Pereira da Silva, Borges Pereira, & Marcos Nascimento, 2019; Sivakumar & Bautista-Baños, 2014; Vilaplana, Pazmiño, & Valencia-Chamorro, 2018). A pesar de este potencial, de manera general, la aplicación de los AE como aditivos alimentarios suele presentar limitaciones, debido a que tienden a deteriorarse con facilidad por factores ambientales, como la luz y el oxígeno, y son propensos a la evaporación; además, los AE tienen baja solubilidad en agua, lo que hace difícil incorporarlos en productos comerciales (Asbahani, Miladi, Badri, *et al.*, 2015; Feyzioglu & Tornuk, 2016).

Para superar estos efectos, la nanoencapsulación de AE en nanopartículas poliméricas (NP) se ha convertido en una alternativa interesante. La nanoencapsulación es un proceso en el que el ingrediente activo (e.g. AE, extractos de plantas, medicamentos, vitaminas) está rodeado por una pared de recubrimiento de polímero para formar nanocápsulas (NC) o está incorporado en una matriz polimérica para formar nanoesferas. Por lo tanto, además de proteger el AET nanoencapsulado contra ambientes extremos, la nanoencapsulación puede ofrecer una liberación controlada y mejora el manejo general de los AE

(Granata *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 2018; Sozer & Kokini, 2009). Por ejemplo, NP de polietilenglicol con AE de geranio y bergamota fueron preparadas por el método de dispersión por fusión. El tamaño promedio de las NP fue de 235 nm y obtuvieron una eficiencia de encapsulación >75 %. Las NP aumentaron la toxicidad por contacto de los AE contra *Tribolium castaneum* y *Rhizopertha dominica*, dos importantes plagas para los cereales (Werdin González, Gutiérrez, Ferrero, & Fernández Band, 2014). En otro estudio, se prepararon NC que contenían AE de *Cymbopogon citratus* usando ácido poliláctico como polímero. Esta formulación fue más eficiente en la inhibición del crecimiento de bacterias que el AE no encapsulado. Además, un ensayo de formación de biopelículas demostró que NC con AE de *Cymbopogon citratus* redujeron la capacidad de los microorganismos para formar biopelículas. Esto podría atribuirse a una entrega más eficiente de los compuestos activos del AE desde las NC (Liakos *et al.*, 2016).

Con el fin de introducir una nueva estrategia para evitar pérdidas de calidad y cantidad en el almacenamiento postcosecha de productos hortofrutícolas, en este trabajo, se evaluó un multisistema basado en RC de alginato y NC poliméricas que contenían AE de *Thymus vulgaris* L. (AL-NC-AEt) para aumentar la vida útil de la papaya (*Carica papaya* L.).

## 2.2 Materiales y métodos

### Material vegetal

Los tallos y hojas frescas de la planta *Thymus vulgaris* L. fueron adquiridos en un mercado local en Monterrey, México, en junio de 2016. Las plantas fueron identificadas con el número 010970 y depositadas en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

### Obtención del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.

El AEt se obtuvo por hidrodestilación (Lugo-Estrada *et al.*, 2019). Brevemente, el material vegetal fresco recién cortado fue puesto en un hidrodestilador tipo Clevenger (100 g/L de agua) durante 4 h. El AEt se recolectó y se mantuvo a 4 °C hasta su uso. Se calculó el rendimiento del AEt utilizando la fórmula (1):

$$\text{Rendimiento AEt} = \frac{\text{AEt}}{\text{P.planta}} \times 100 \quad (1)$$

Donde  $A_{Et}$  son los gramos obtenidos de aceite y  $P_{planta}$  es el peso total, en gramos, de la planta fresca de *Thymus vulgaris* L.

### **Caracterización química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM) y cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)**

La identificación de los componentes volátiles del AEt se realizó utilizando un cromatógrafo de gases (6890N, Agilent Technologies, USA) equipado con un espectrómetro de masas selectivo (5973 INERT, Agilent Technologies, USA) con una energía de ionización 70 eV y una columna capilar (HP-5MS, Agilent Technologies, USA) (5 % de fenilmetilpolisiloxano, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, Agilent J&W). La temperatura de la fuente de ionización fue de 230 °C, la temperatura del cuádruplo fue de 150 °C y la temperatura del inyector fue de 220 °C. La adquisición de datos se realizó en el modo de escaneo. La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: 35 °C durante 9 min, se incrementó en 3 °C/min hasta 150 °C y se mantuvo durante 10 min. Se incrementó en 10 °C/min hasta 250 °C y se aumentó en 3 °C/min hasta 270 °C manteniéndose durante 10 min. El flujo del gas portador helio (99.999 % de pureza, INFRA<sup>®</sup>) fue de 0.5 mL/min. Los componentes del AEt se identificaron comparando el índice de retención con un estándar de n-alcanos C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) y el espectro de masa se comparó con los espectros de masas de la biblioteca del National Institute of Standards and Technology US. (NIST) y datos de referencia (Guerra-Boone *et al.*, 2015). Para determinar la proporción de cada componente del AEt, se realizó un análisis cuantitativo con un CG-FID (Autosystem XL, Perkin Elmer, USA) utilizando la misma columna HP-5MS. La temperatura del inyector fue 270 °C y se utilizó el mismo programa de temperatura del horno que en el Análisis CG-EM. La composición porcentual del AEt fue calculado utilizando el método de normalización de picos.



### **Formulación del multisistema de recubrimiento basado en nanocápsulas poliméricas que contienen aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.**

Las NC se prepararon mediante la técnica de nanoprecipitación (Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury, & Benita, 1989). Brevemente, se preparó una fase orgánica (5 mL) compuesta por una mezcla de acetona: isopropanol (TEDIA<sup>®</sup>) (1: 1), Eudragit L 100-55 (60 mg) y AEt (90 mg). Esta fase se inyectó en una fase acuosa (10 mL) que contenía 0.5 % (p/p) de poli(vinil alcohol) (Mowiol 4-88 con un PM 26,000 y un grado de hidrólisis del 88 %). La difusión de la fase orgánica en la fase acuosa indujo la agregación del polímero y la encapsulación del AEt en las NC (NC-AEt). Finalmente, el disolvente se eliminó a presión reducida (Control Laborota 4003, Heidolph Instruments, GER). Las NP sin AEt (NC-BCO) se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

La caracterización fisicoquímica de las formulaciones se determinó en una dispersión acuosa de NC-AEt. El tamaño promedio de partícula y el índice de polidispersidad (IP) se midieron en un ángulo de dispersión de 90 grados utilizando la dispersión dinámica de la luz, mientras que la medición del potencial zeta se realizó mediante microelectroforesis láser doppler (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, UK). Además, se determinó el espectro infrarrojo medio (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) de las NC-AEt, el AEt y el polímero Eudragit L 100-55 por medio de Espectrofotometría Infrarroja por Transformada de Fourier (Frontier MIR/FIR, Perkin Elmer, USA) a 64 barridos utilizando un accesorio universal de punta de diamante (UATR, Perkin Elmer, USA).

Para la formación del multisistema de recubrimiento se usó AL como agente formador del RC. El AL sólido se incorporó en una dispersión acuosa de NC-AEt con agitación magnética. Por otro lado, se preparó una emulsión de AEt (700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Homogeniser VDI 12, VWR, USA) para usar como control.

### **Análisis de nanocápsulas por GC-FID**

La dispersión de NC-AEt se centrifugó (Centrífuga Allegra 64R, Beckman Coulter, USA) y la pastilla de NC se analizó por medio de un CG-FID (Clarus 480, PerkinElmer, USA) utilizando una columna capilar (Elite-5, Perkin Elmer, USA) (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$

0.25  $\mu\text{m}$ ). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 280 °C y 260 °C, respectivamente. La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: 70 °C durante 1 min, se incrementó en 4 °C/min a 116 °C y se mantuvo durante 1 min, se incrementó en 20 °C/min hasta 200 °C y se aumentó en 14 °C/min hasta 230 °C. El flujo del gas portador helio (99.999 % de pureza, INFRA<sup>®</sup>) fue de 1 mL/min. Este programa de temperatura se utilizó durante la validación del método. El *o*-cimeno, el timol y el  $\gamma$ -terpineno se seleccionaron como compuestos de prueba porque eran los componentes más abundantes en el AEt del presente estudio. Posteriormente, el porcentaje de eficiencia de encapsulación (% EE) se calculó utilizando la fórmula (2):

$$\%EE = \left(\frac{Ce}{Ct}\right) \times 100 \quad (2)$$

Donde *Ce* es la cantidad de un componente en las NC-AEt (mg), y *Ct* es la cantidad del componente en el AEt (mg) total utilizado en la fase orgánica.

### **Determinación de capacidad de antioxidante de nanocápsulas poliméricas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.**

*Ensayo de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>+</sup>)*

La actividad de eliminación de radicales de las NC-AEt y el AEt no encapsulado se determinó primero por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) (Amiri, 2012). Brevemente, se prepararon soluciones de NC-AEt y AEt no nanoencapsulado en metanol (TEDIA<sup>®</sup>) a diferentes concentraciones (25-1200  $\mu\text{g/mL}$ ). Se mezcló 1 mL de cada solución con 1 mL de solución de DPPH (80  $\mu\text{g/mL}$ ) en metanol. Estos sistemas se dejaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las absorbancias de estas soluciones se midieron a 517 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, USA).

Por otro lado, el método de ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) (Otmene Benchabane *et al.*, 2015) se basa en la reducción del catión radical verde ABTS<sup>+</sup>. Brevemente, se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de cada solución (i.e. NC-AEt y AEt) a 1 mL de solución de ABTS<sup>+</sup> en metanol (7 mM). Después de 7 min, se midieron

las absorbancias a 734 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, USA). En ambos casos, el porcentaje de inhibición de los radicales libres (% I) se calculó utilizando la fórmula (3):

$$\%I = \left( \frac{ABS_o - ABS_{muestra}}{ABS_o} \right) \times 100 \quad (3)$$

Donde  $ABS_o$  es la absorbancia del radical (DPPH o ABTS<sup>+</sup>) en metanol y  $ABS_{muestra}$  es la absorbancia de la muestra con el radical. Las muestras se analizaron por triplicado y con los datos de % I se calculó el IC<sub>50</sub> para el AEt no encapsulado y las NC-AEt.

### **Efecto del multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt sobre la calidad postcosecha y la vida útil de papaya (*Carica papaya* L.)**

Se seleccionaron papayas con características homogéneas de color (maduración), tamaño y sin daño mecánico. Se lavaron con agua destilada y se secaron. Las frutas se distribuyeron en cuatro grupos de tres papayas cada uno. El primer grupo se usó como control (sin tratamiento). Al segundo grupo se le aplicó por aspersión 10 mL de la emulsión de AEt (700 µg/mL). Luego, al tercer grupo se le aplicó 10 mL de una dispersión acuosa de AL que contenía NC-BCO (AL-NC-BCO). Finalmente, el cuarto grupo se le aplicó por aspersión 10 mL de una dispersión acuosa que contenía los componentes del multisistema de recubrimiento, el AL y las NC-AEt (AL-NC-AEt). El AEt estaba en la misma concentración que la emulsión del grupo AEt. Todos los grupos se mantuvieron a 25 °C durante 13 días.

Para el análisis de la calidad postcosecha de los frutos, se determinó la acidez titulable (AT) mediante valoración del jugo de papaya usando una solución de NaOH al 0.1 N hasta el final de la valoración (pH = 8.2). Se expresó en gramos de ácido cítrico por 100 mL de jugo. El contenido de sólido soluble totales (SST) del jugo de papaya se obtuvo por refractometría (Abbemat 200, AntonPaar, AUT). Los valores de color (CIE L\* a\* y b\*) de las papayas se determinaron utilizando un colorímetro (ColorFlex EZ, HunterLab, USA). La firmeza de las papayas se midió utilizando un Texturómetro (CT3 Texture Analyzer, Brookfield-Ametek, USA) equipado con una sonda cilíndrica de 4 mm de diámetro. La firmeza se expresó en Newton (N). Todos los parámetros se determinaron al

principio y al final del estudio de vida útil. Además, se monitoreó la presencia de daño microbiológico durante la duración del experimento.

## 2.3 Resultados y discusión

### Extracción y caracterización química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.

La caracterización química del AEt por GC-MS (Figura 2.2) condujo a la identificación de 20 compuestos (Tabla II.1). Además, de forma paralela se optimizó un método por GC-FID con inyección directa (Figura 2.3) para obtener una mejor separación de las señales cromatográficas determinadas en el AEt. Como se muestra en la Figura 2.2 y 2.3, los componentes mayoritarios fueron el *o*-cimeno (32.68 %), timol (31.90 %) y  $\gamma$ -terpineno (15.69 %), que juntos representan más del 80 % de la abundancia total del AEt.

En general, el AEt estaba compuesto por 56.69 % de terpenos alifáticos y 43.31 % de terpenos oxigenados (Anexo I). Guerra-Boone *et al.* (2015) reportaron los mismos componentes en AEt, pero en diferentes porcentajes, 62.6 % de terpenos alifáticos y 35.6 % de terpenos oxigenados. De igual manera, los resultados de la caracterización química del AEt en el presente estudio fueron similares a los mencionados por Satyal *et al.* (2016), quienes reportaron que los componentes principales para el AEt eran el timol (23-60 %),  $\gamma$ -terpineno (18-50 %), *p*-cimeno (8-44 %), carvacrol (2-8 %) y linalool (3-4 %). En el estudio de diferentes especies de *Thymus* realizado por Nikolić *et al.* (2014), hallaron que de los 26 constituyentes encontrados, los más abundantes fueron el timol (49.10 %) seguido por el *p*-cimeno (20.01 %). Las diferentes proporciones de los componentes reportadas en los estudios anteriores se deben a las variaciones en la temporada de recolección, localización de la especie analizada y por los métodos de obtención del AE (Amiri, 2012).

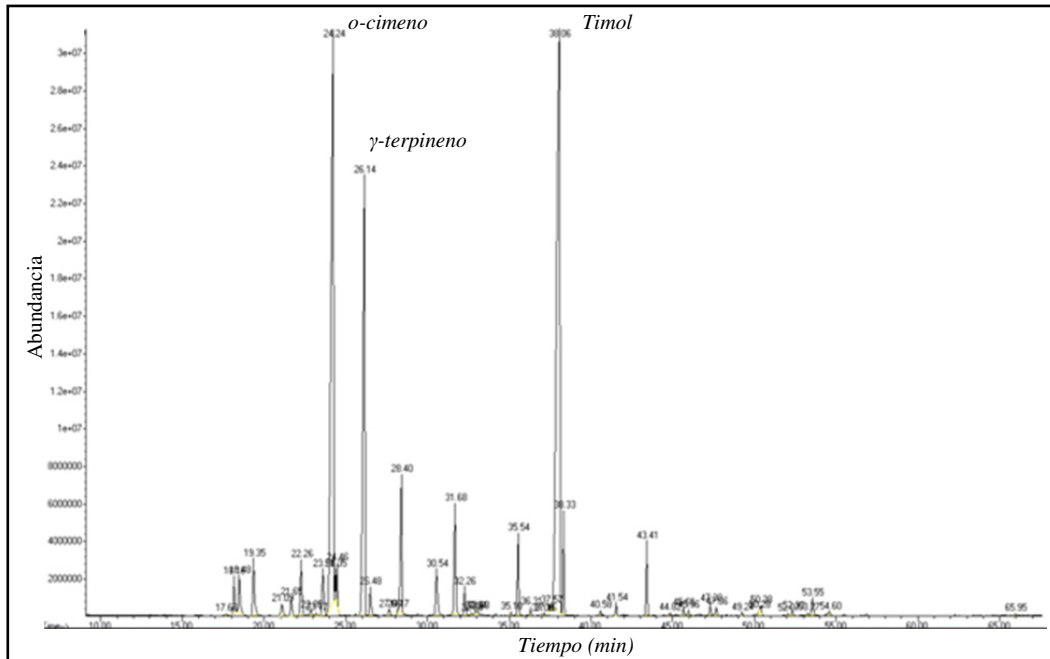
Varios estudios se han enfocado en mostrar las actividades antimicrobianas y antioxidantes del AEt (Carrasco *et al.*, 2016; Nabavi *et al.*, 2015; Thakre *et al.*, 2016). Algunos autores han sugerido que los efectos antimicrobianos de los AE podrían atribuirse a sus componentes mayoritarios.

**Tabla II.1.** Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas<sup>a</sup>.

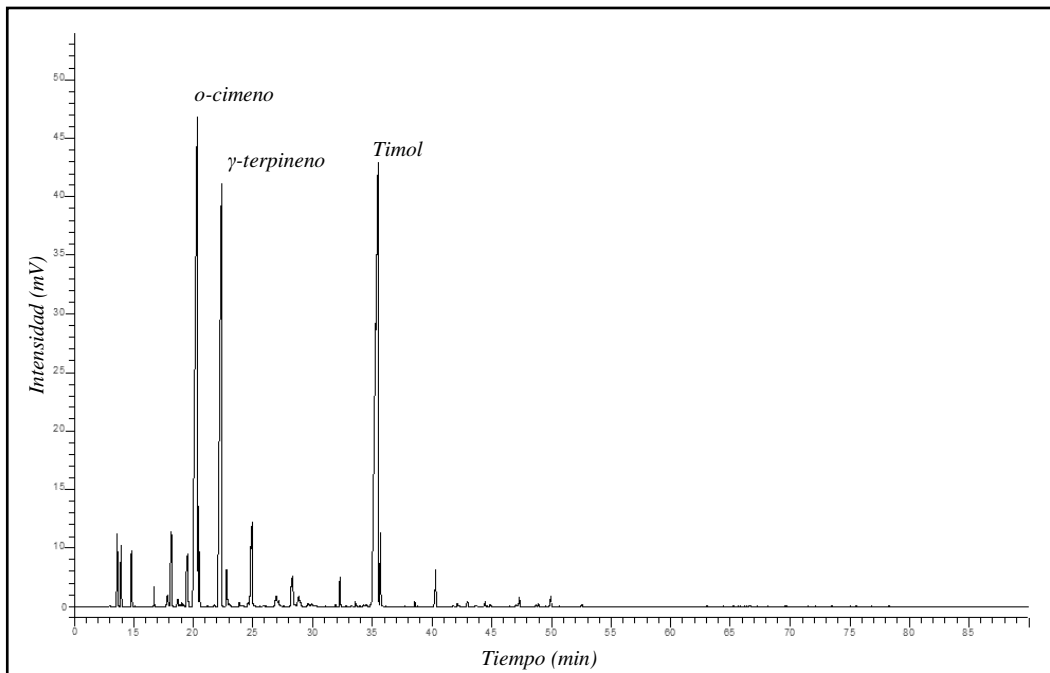
No. <sup>b</sup>	t <sub>r</sub> <sup>c</sup> (min)	ÁREA (%)	COMPONENTE
1	13.79	0.78	<i>α-tujeno</i>
2	13.93	0.95	<i>α-pineno</i>
3	14.75	1.55	<i>Camfeno</i>
4	16.76	0.40	<i>β-pineno</i>
5	17.81	0.40	<i>1-octen-3-ol</i>
6	18.03	1.52	<i>Mirceno</i>
7	19.35	1.03	<i>α-terpineno</i>
8	20.26	32.68	<i>o-cimeno</i>
9	20.36	0.75	<i>Silvestreno</i>
10	20.59	0.58	<i>1,8-cineol</i>
11	22.35	15.69	<i>γ-terpineno</i>
12	22.68	0.47	<i>cis-hidrato Sabineno</i>
13	24.78	3.54	<i>Linalol</i>
14	26.78	1.25	<i>Camfor</i>
15	28.06	2.75	<i>Borneol</i>
16	28.70	0.75	<i>Terpinen-4-ol</i>
17	32.16	0.98	<i>Carvacrol, metil éter</i>
18	35.44	31.90	<i>Timol</i>
19	35.58	1.16	<i>Carvacrol</i>
20	40.14	0.88	<i>E-cariofileno</i>
<b>Área total</b>		<b>100</b>	
<b>Terpenos alifáticos</b>		<b>56.69</b>	
<b>Terpenos oxigenados</b>		<b>43.31</b>	

<sup>a</sup> Cromatógrafo de gases 6890N acoplado a espectrómetro de masas selectivo 5973 INERT, Agilent Technologies, USA; <sup>b</sup> Orden de elución; <sup>c</sup> Tiempo de retención

Con respecto al presente estudio, se ha reportado que el timol es activo contra un amplio espectro de microorganismos, incluidos fitopatógenos (Hyldgaard, Mygind, & Meyer, 2012; Salehi *et al.*, 2018; Sivakumar & Bautista-Baños, 2014; Wattanasatcha, Rengpipat, & Wanichwecharungruang, 2012).



**Figura 2.2.** Cromatograma por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.



**Figura 2.3.** Cromatograma por cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (CG-FID) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.

De igual manera, se ha reportado actividad antimicrobiana para el *o*-cimeno y el  $\gamma$ -terpineno (Baldissera *et al.*, 2016; Nabavi *et al.*, 2015; Thakre *et al.*, 2016). Sin embargo, no hay mucha información sobre la aplicación de estos dos componentes en el área de alimentos como conservadores. De manera particular, las frutas y hortalizas son productos que se deterioran con facilidad debido a los diferentes tipos de microorganismos que pueden atacarlos. En particular, la papaya (*Carica papaya* L.) es susceptible a la descomposición fúngica por el género *Aspergillus* y, lo que es más importante, por la especie *Colletotrichum gloeosporioides* (Bautista-Baños, Sivakumar, Bello-Pérez, Villanueva-Arce, & Hernández-López, 2013). Para el presente estudio, es importante señalar que el principal compuesto del AEt (i.e., timol) han demostrado previamente tener actividades antifúngicas relevantes.

La actividad antimicrobiana del AEt esta relacionada con los grupos funcionales de sus componentes (e.g. grupo fenólico del timol y carvacrol). En general, el mecanismo de acción de la actividad antifúngica de los AE no está bien definido, pero se ha propuesto que el modo de acción parece depender de la estructura química de los componentes y de su capacidad para atravesar la pared celular y penetrar entre las cadenas de ácidos grasos de la bicapa lipídica, haciendo que la membrana celular sea mucho más permeable y, como resultado, ocasionan la muerte celular o la inhibición de la esporulación y la germinación de hongos u otros microorganismos causantes del deterioro (Diao, Hu, Zhang, & Xu, 2014; Grande-Tovar *et al.*, 2018; Wattanasatcha *et al.*, 2012). Se puede decir, por tanto, que los efectos antifúngicos propuestos para el AEt implica una serie de reacciones en las que está involucrada la integridad de la pared celular y el sistema de endomembrana, incluyendo la membrana plasmática y las mitocondriales (Yap *et al.*, 2014; Abbaszadeh, Sharifzadeh *et al.*, 2014; Granata *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta que una gran variedad de diferentes grupos de compuestos químicos están presentes en el AEt, es muy probable que la actividad antimicrobiana no se atribuya a un mecanismo o componente específico. Por lo tanto, es más significativo estudiar y aplicar todo el AE en lugar de sus componentes individuales, aprovechando la sinergia que existe entre todos los componentes del AE. Eguchi *et al.* (2016) demostraron que el AEt y sus componentes, redujeron *in vitro* de manera significativa el crecimiento micelial de *B. cinerea* a una concentración de 0.50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . En otro estudio reportado Bosquez-

Molina *et al.* (2010) evaluaron el efecto antifúngico del AEt contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*, dos fitopatógenos típicos de la papaya. En ese estudio, los autores encontraron que el AEt, en concentraciones de hasta 0.060 %, detuvo el crecimiento del micelio tanto para *C. gloeosporioides* como para *R. stolonifer*. La fruta de papaya sumergida en AEt en emulsión experimentó una disminución de la descomposición causada por *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* hasta en un 50 y 40 %, respectivamente, en comparación con el 100 % de infección observada en papayas no tratadas. Además de estos estudios, existen abundante información sobre la capacidad de los AE de diferentes plantas, entre ellas *T. vulgaris*, para el control exitoso de hongos fitopatógenos (Ribeiro-Santos *et al.*, 2017; Yela, Jimenez *et al.*, 2016; Sivakumar & Bautista-Baños, 2014; Barrera Necha & García Barrera, 2008).

Para este estudio, fue importante determinar que los compuestos más abundantes del AEt (e.g. timol) habían demostrado previamente actividad antimicrobiana relevante; además, identificarlos permitió darles seguimiento durante el desarrollo de la formulación de las NC con AEt aplicadas con el multisistema de recubrimiento.

### **Formulación y caracterización física de las nanocápsulas poliméricas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.**

El AEt tiene un gran potencial como conservador natural de alimentos, principalmente debido a las actividades biológicas (e.g. antimicrobianas y antioxidantes) reportadas para muchos de sus componentes. De hecho, el AEt está incluido en la lista GRAS de la FDA (Baker, Grant, & Malakar-Kuenen, 2008). Sin embargo, su uso y aplicación como aditivo alimentario tiene algunas limitaciones, debido a su baja solubilidad en agua y susceptibilidad a la degradación por factores ambientales (e.g. oxígeno y radiaciones UV) (Prakash *et al.*, 2018; Shen & Kamdem, 2015).

Usando la técnica de nanoprecipitación, el AEt se nanoencapsuló en una estructura polimérica para protegerlo de dichos factores naturales (Bareras-Urbina *et al.*, 2016). La formación de NC por la técnica de nanoprecipitación se explica en términos de una turbulencia interfacial. Esto ocurre cuando la FO que contiene polímero, AEt y el solvente orgánico miscible en agua se difunde en una FA bajo una ligera agitación magnética (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004). Esta es una técnica que ha sido utilizada exitosamente



para la encapsulación de productos naturales, como los AE (Badri *et al.*, 2018; Sotelo-Boyás *et al.*, 2017a). En este estudio se obtuvieron NC con AEt (NC-AEt) con las características fisicoquímicas presentadas en la Tabla II.2.

**Tabla II.2.** Características fisicoquímicas de nanocápsulas poliméricas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. obtenidas por la técnica de nanoprecipitación<sup>a</sup>. ( $n=3$ ;  $\bar{X} \pm DS$ ).

TAMAÑO (nm)	IP <sup>1</sup>	POTENCIAL ZETA (mV)	% EE <sup>2</sup>
153.9 ± 4.7	0.186 ± 0.011	-4.11 ± 0.170	52.81 ± 2.69

<sup>1</sup> Índice de polidispersidad que varía de 0 a 1, un valor más alto corresponde a una distribución de tamaño NC menos homogénea;

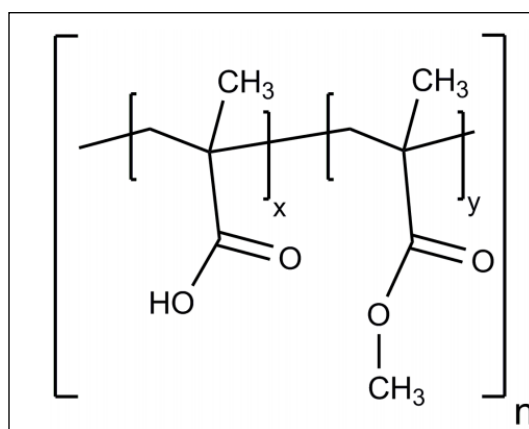
<sup>2</sup> Porcentaje de eficiencia de encapsulación.

La formulación de NC-AEt mostró un tamaño promedio de 153.9 ± 4.7 nm. En comparación con el AEt no encapsulado, su incorporación a NC puede ofrecer varias ventajas para su aplicación en la industria alimentaria. Primero, debido a su tamaño y carácter multiparticulado, las nanopartículas cargadas con AEt pueden distribuirse de manera más uniforme en productos alimenticios como las frutas y, posteriormente, pueden liberar gradualmente el AEt para cubrir toda la superficie del fruto (Boehm *et al.*, 2003; Sotelo-Boyás *et al.*, 2017b). En particular, el tamaño próximo a 150 nm ofrece ventajas en comparación con partículas grandes (e.g. micropartículas). A medida que el tamaño de partícula es menor, su relación superficie/volumen aumenta. Entonces, es posible tener más superficie de la NC directamente en contacto con la superficie de la fruta, lo que permite una entrega local de la AEt, especialmente donde se encuentran los microorganismos (Granata *et al.*, 2018). En segundo lugar, la pared del polímero de las NC permite retener el AEt dentro de su estructura, reduciendo así su velocidad de evaporación, favoreciendo su aplicación y aumentando el tiempo de residencia en la superficie del alimento. El tamaño promedio de las NC-AEt fue similar al reportado por Asbahani *et al.* (2015b) que obtuvieron NC (110-150 nm) con AE de dos especies del género *Thymus*. Además, encontraron actividades antimicrobianas similares del AEt nanoencapsulado y el AEt no nanoencapsulado contra bacterias (i.e. *Escherichia Coli*, *Kliebsella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomons aeruginosa*, y *Salmonella typhimurium*), levaduras (i.e. *Candida albicans* y *Candida glabrata*) y hongos (i.e. *Aspergillus Níger* y *Penicillium funiculosum*). En otro estudio, Granata *et al.* (2018)

prepararon NP con AE de *Thymus capitatus* y AE *Origanum vulgare* con tamaños promedios de  $175 \pm 1.0$  y  $171 \pm 2.0$  nm, respectivamente. Además, se reportó una mejora en la actividad antimicrobiana de las NP cargadas con AE, mostrando una mayor actividad contra patógenos transmitidos por los alimentos en comparación con el AE no nanoencapsulado.

Por otro lado, el IP es un parámetro asociado a la homogeneidad de la dispersión de NC. Para el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments) los valores de IP varían de 0 a 1. Un valor inferior a 0.200 indica una distribución homogénea del tamaño de nanopartículas (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004). Para este estudio, el valor IP de la formulación de NC-AEt fue de  $0.186 \pm 0.011$ , lo que indica una alta homogeneidad de nanopartículas que permitiría que las interacciones individuales de las NC (e.g. bioadhesión, liberación de AEt) también sean homogéneas en la superficie de alimentos, como las frutas.

Las propiedades electrocinéticas de las NC-AEt también se consideraron en este estudio. El potencial zeta es el potencial electrostático en el límite que divide la capa compacta y la capa difusa de las partículas coloidales. El potencial zeta para las NC-AEt fue de  $-4.11$  mV. El potencial negativo indica que las cargas negativas son dominantes en la superficie de las NC y puede atribuirse al Eudragit L 100-55 (Figura 2.4), el cual es un copolímero aniónico basado en ácido metacrílico y acrilato de etilo.



**Figura 2.4.** Estructura de polímero Eudragit L 100-55.

Por lo tanto, durante la formación de las NC-AEt, las cadenas de polímero rodearon el núcleo oleoso para formar la pared de polímero y sus grupos funcionales aniónicos se expusieron al medio acuoso externo. Este potencial negativo es importante porque podría facilitar la interacción de las NC-AEt con la membrana de microorganismos fitopatógenos (e.g. especies de *Botrytis cinérea* o *Colletotrichum gloeosporioides*), lo que aseguraría que la interacción de los compuestos del AEt fuera directamente desde el NC al microorganismo, aumentando, por lo tanto, su efectividad antimicrobiana (Wang, Hu, & Shao, 2017).

Por otro lado, se empleó espectroscopia infrarroja (IR) para identificar grupos funcionales e interacciones químicas entre los componentes de la formulación. La región media del espectro infrarrojo ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) (MID-FTIR) es muy utilizada para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional-vibratoria asociada a los diferentes enlaces químicos. Las muestras analizadas (AEt, NC-AEt y Eudragit L 100-55) presentaron una absorción característica de los grupos funcionales más importante presente en cada una de ellas (Figura 2.5).

Al analizar el espectro infrarrojo del AEt se debe recordar que los AE están constituidos por una mezcla de componentes que están en diferentes proporciones. La banda presente en la región de  $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  y la de  $1650\text{ cm}^{-1}$  pertenece a las vibraciones de enlaces O-H características de los componentes fenólicos presentes en el AEt, principalmente timol y carvacrol (Anexo I). La región de  $850\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$  presenta bandas pertenecientes a los grupos C-O y C-OH. Dentro de la región de  $1101\text{-}1209\text{ cm}^{-1}$  se presentan bandas características de los enlaces C-OH de los alcoholes primarios y secundarios, presentes en moléculas como la del 1-octen-3-ol y borneol. Otras bandas que se presentan en los espectros MID-FTIR de manera común son las que se encuentran en la región de  $2845\text{-}2995\text{ cm}^{-1}$ . Estas aparecen por la presencia de enlaces CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub> de los grupos metilos y metilenos que se encuentran de manera frecuente en las estructuras de compuestos orgánicos.

En el espectro MID-FTIR del polímero utilizado (Eudragit L 100-55) se observa a los  $1705\text{ cm}^{-1}$  la banda característica de las vibraciones del grupo carbonilo (C=O) del ácido carboxílico, si como los grupos carboxilo esterificados en  $1730\text{ cm}^{-1}$ , así como otras vibraciones del grupo éster (C-O-C) en  $1150\text{-}1160$ ,  $1190\text{-}1195$  y  $1250\text{-}1275\text{ cm}^{-1}$ .

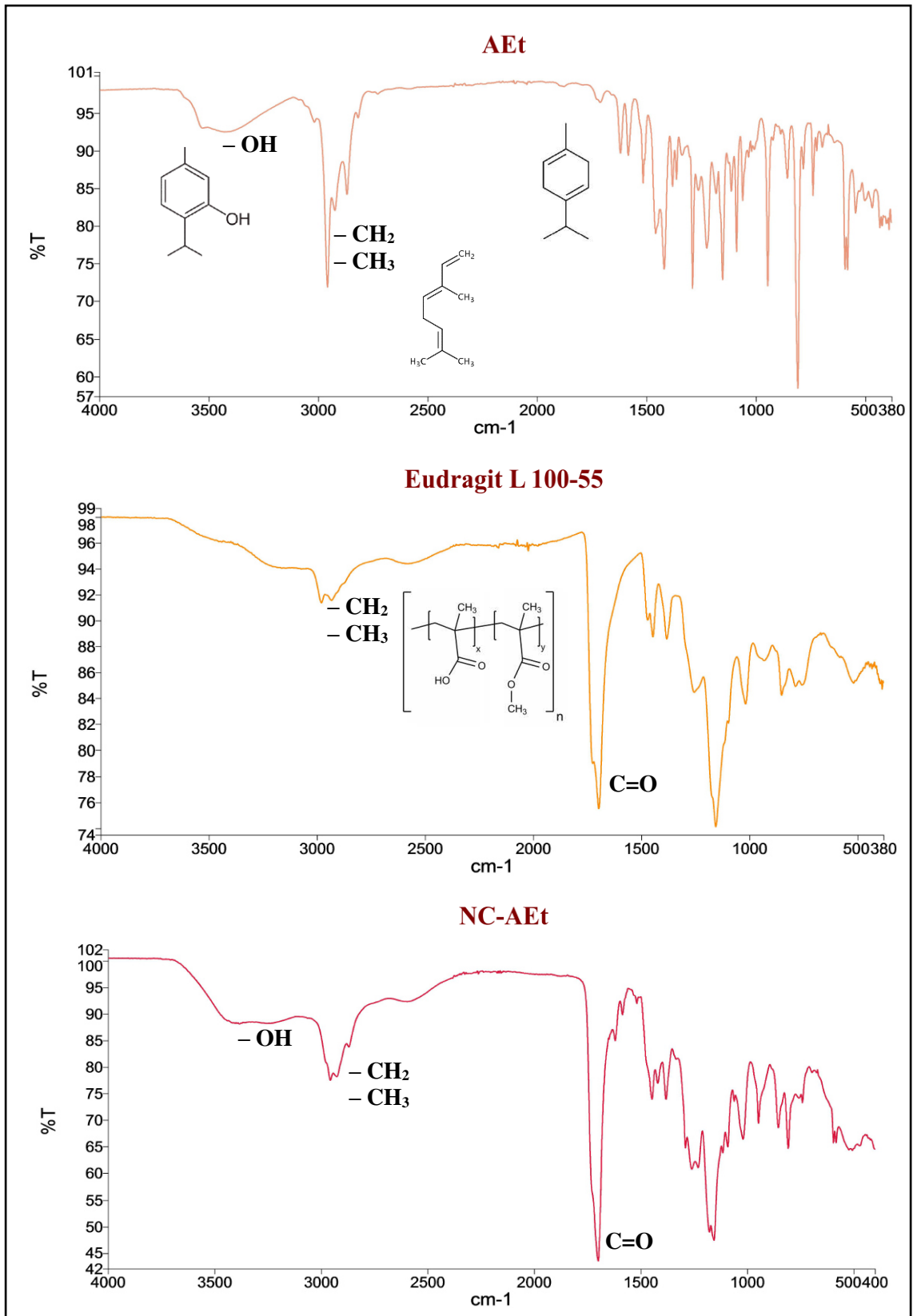


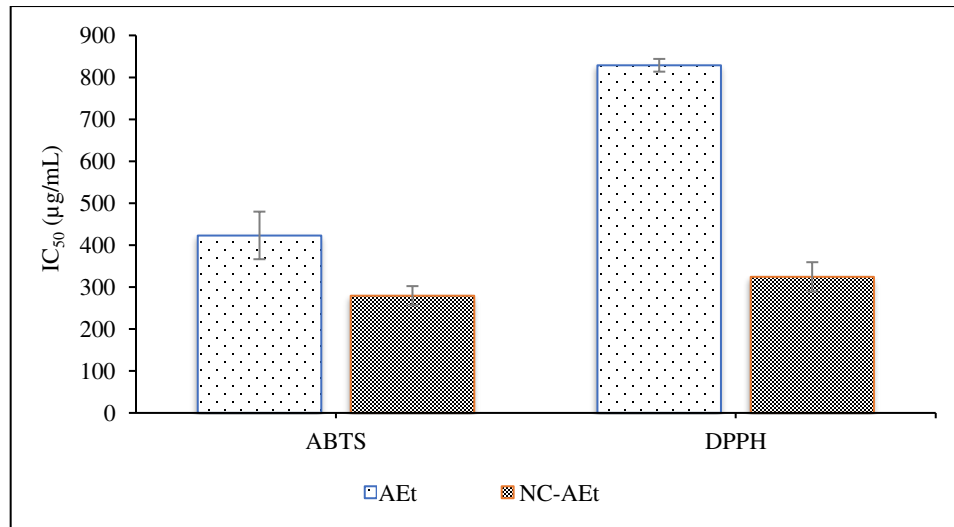
Figura 2.5. Espectro MID-FTIR del AEt, Eudragit L 100-55 y NC-AEt.

En el espectro de las NC-AEt se pueden observar las bandas antes mencionadas, tanto del AEt y el polímero, pero con una diferencia en cuanto su intensidad. Es posible observar que la banda de vibración de estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub> aproximadamente a los 2900 cm<sup>-1</sup> aumentó con la incorporación del AEt en las NC. De igual manera puede observarse un aumento en la intensidad de la banda presente entre los 3500–3200 cm<sup>-1</sup> correspondientes a los grupos -OH de los grupos fenólicos del AE. Por lo tanto, se puede afirmar que el incremento de la intensidad de estas bandas (-CH y -OH) es el resultado de la incorporación del AEt en las NC.

Para completar la caracterización fisicoquímica de las NC-AEt, se cuantificó por CG-FID el AEt incorporado en las NC y se calculó el % EE utilizando la fórmula (2). La EE se determinó considerando solo los tres componentes mayoritarios en el AEt y correspondió a 52.81 ± 2.69 % para el *o*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y el timol. Estos resultados coinciden con los reportados por Marcet *et al.* (2018), quienes obtuvieron NC de PLA con timol incorporado con un tamaño medio próximo a 260 nm y una EE de 60.3 ± 8 %. Además, demostraron que el las NC de PLA cargadas con timol había mejorado sus propiedades antimicrobianas en comparación con el timol no encapsulado. En otro estudio, Sotelo-Boyás *et al.* (2017b) prepararon dos tipos de NP a base de quitosano cargadas con AEt. Particularmente, la EE del timol fue del 68 % para las nanoesferas de quitosano cargadas con AEt, mientras que fue del 72 % para NC de quitosano cargado con AEt. En este estudio, el análisis por GC-FID reveló la presencia de timol en las NC-AEt, lo cual fue relevante, ya que varios autores han reportado que las actividades antimicrobianas y antioxidantes del AEt se deben en gran medida a este compuesto.

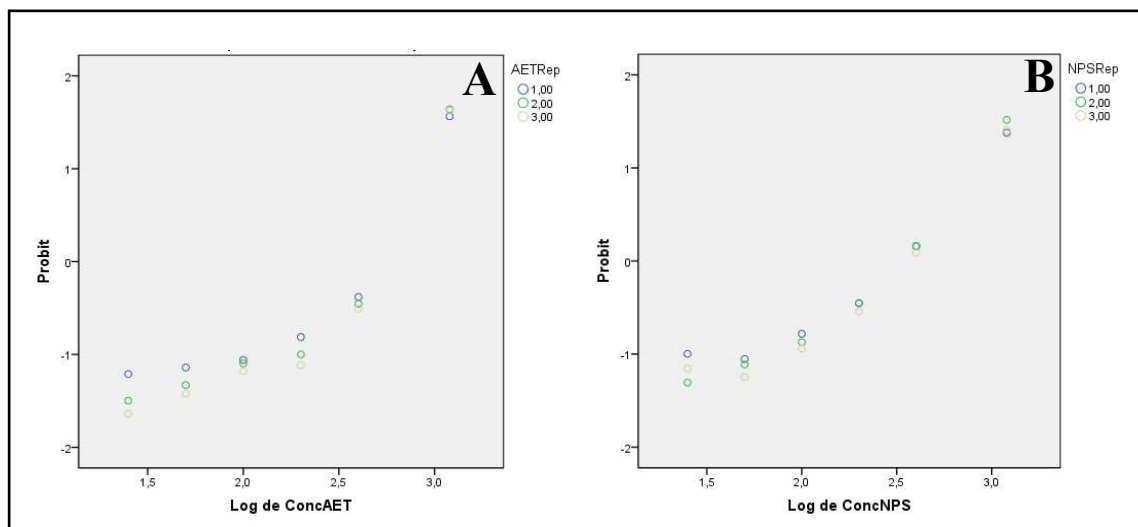
Por lo tanto, teniendo en cuenta que más del 50 % del AEt agregado durante la preparación de las NC se encapsuló, era probable que sus compuestos principales (e.g. timol) se liberarán gradualmente desde las NC a la superficie de la fruta.

Con respecto a las propiedades antioxidantes de las NC-AEt se procedió a determinar el IC<sub>50</sub> para las NC-AEt y el AEt no encapsulado. Se observó que la capacidad antioxidante del AEt se mejoró después de su incorporación en las NC. Como se muestra en la Figura 2.6, la actividad antioxidante fue mayor para las NC-AEt, ya que para el ensayo de ABTS<sup>+</sup> se obtuvo un valor de IC<sub>50</sub> de 279 ± 22.82 µg/mL, en comparación con el valor de 423.16 ± 56.69 µg/mL de IC<sub>50</sub> para el AEt no encapsulado.

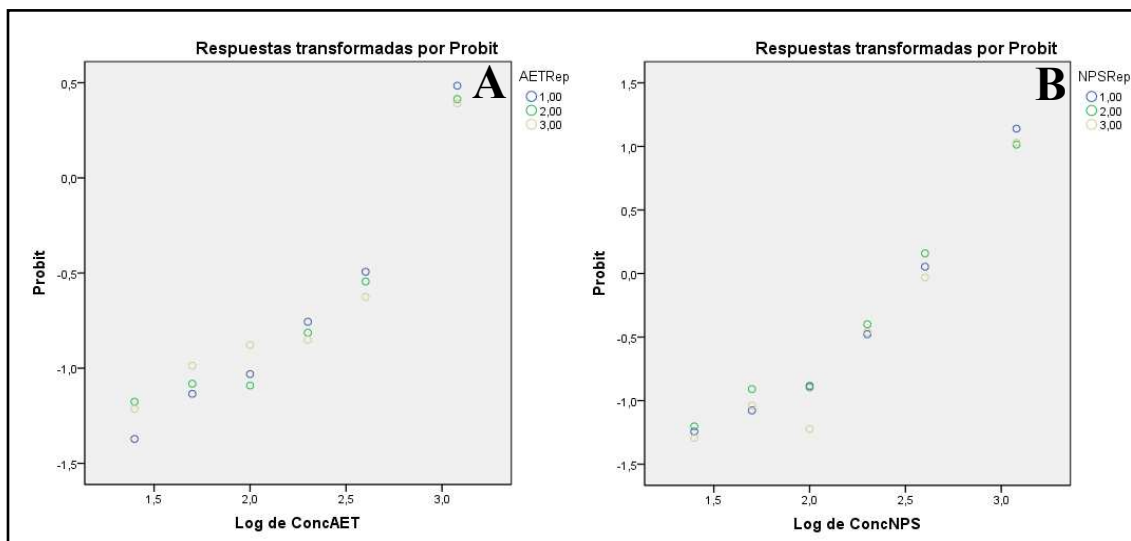


**Figura 2.6.** Determinación de la capacidad antioxidante ( $IC_{50}$ ) del AEt no encapsulado y las NC-AEt por los ensayos ABTS<sup>+</sup> y DPPH. ( $n=3$ ;  $\bar{X} \pm DS$ ).

De igual manera, para el ensayo DPPH, las NC-AEt presentaron un valor menor de  $IC_{50}$  de  $324.54 \pm 34.76 \mu\text{g/mL}$  en comparación al valor de  $IC_{50}$  de  $828.74 \pm 15.17 \mu\text{g/mL}$  obtenido para el AEt no encapsulado. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Las NC-BCO, es decir NC sin AEt, no mostraron actividad antioxidante para ninguno de los dos ensayos (Figura 2.7 y 2.8).



**Figura 2.7.** Gráficos de análisis PROBIT para capacidad antioxidante del AEt no encapsulado (A) y NC-AEt (B) por el ensayo ABTS<sup>+</sup>. ( $n=3$ ;  $\bar{X} \pm DS$ ).



**Figura 2.8.** Gráficos de análisis PROBIT para capacidad antioxidante del AEt no encapsulado (A) y NC-AEt (B) por el ensayo DPPH. ( $n=3$ ;  $\bar{X}\pm DS$ ).

Algunos autores han propuesto que al incorporar el AEt en las NC evita o disminuye la interacción de sus componentes con el medio ambiente, evitando la pérdida por volatilidad y aumentando su efecto. Además, se ha planteado que una buena interacción entre el radical (i.e. ABTS<sup>+</sup> y DPPH) y la pared polimérica de la NC puede promover la actividad de eliminación de radicales para los compuestos encapsulados (Nenadis & Tsimidou, 2017; Shahidi & Zhong, 2015).

Estos resultados son similares a los reportados por Shetta, Kegere, & Mamdouh (2019), quienes encontraron que las NP de quitosano con AE de *Mentha piperita* y *Camellia sinensis* presentaron una actividad antioxidante entre ~2 y 2.4 veces más, en comparación a los AE no encapsulados. Los autores mencionan que la mejora de la actividad antioxidante después de la encapsulación en las NP podría deberse al efecto protector de la encapsulación, a la disminución de la velocidad de evaporación y a la liberación controlada del AE durante el ensayo. En otro estudio, Zhang *et al.* (2008) informaron que la actividad antioxidante de la quercetina se mantuvo cuando se incorporó a las NP de quitosano. Esto se atribuyó a los complejos formados entre la red polimérica de la NP y la quercetina, que permitieron retener y proteger las moléculas de este activo.

No obstante, Jemaa *et al.* (2018) reportaron una pérdida de la capacidad antioxidante del AE de *Thymus capitatus* después de incorporarlo en una nanoemulsión (NE). Los valores de IC<sub>50</sub> de AE *T. capitatus* libre ( $300 \pm 3.06 \mu\text{g/mL}$ ) fueron más bajos que los de la forma

nanoemulsionada ( $390 \pm 2.65 \mu\text{g/mL}$ ). Lo autores mencionan que esta disminución está relacionada con la protección del AE del *T. capitatus* por parte de las gotas lipídicas en la NE, lo que podría interferir en la reacción entre el radical y los componentes del AE. Por lo tanto, el método de obtención de las NC puede influir de manera importante en las propiedades bioactivas de los activos nanoencapsulados.

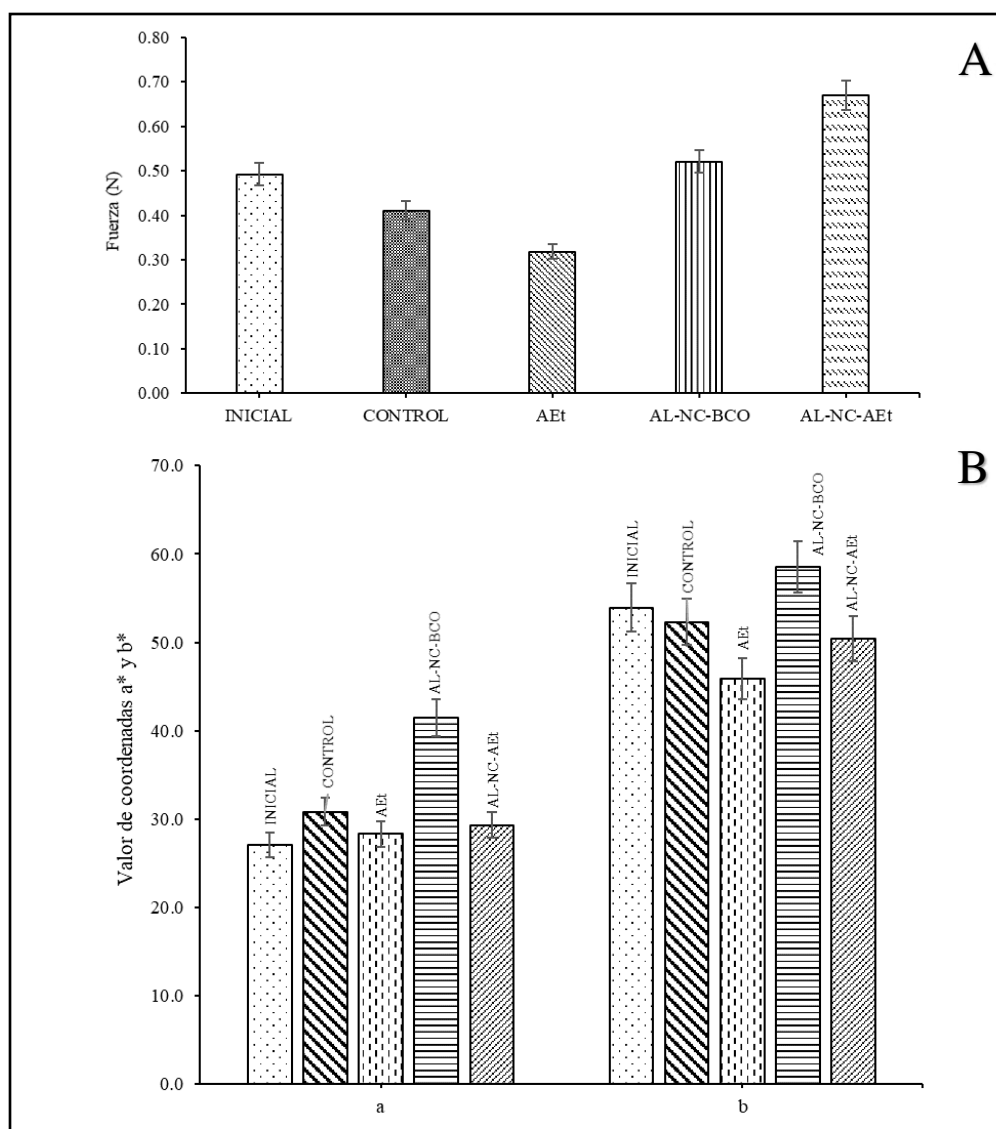
Considerando estos aspectos, las ventajas de incorporar el AEt en las NC, la actividad antioxidante determinada y la actividad antimicrobiana reportada para el AEt, se estableció que la formulación de NC-AEt tenía características adecuadas para ser parte del multisistema de recubrimiento destinado a la conservación de la fruta de papaya.

### **Efecto del multisistema de recubrimiento (AL-NC-AEt) sobre la calidad postcosecha y la vida útil de papaya (*Carica papaya* L.)**

La firmeza de la fruta es un atributo de calidad importante. La firmeza (Figura 2.9A) de las papayas fue de  $0.492 \pm 0.063$  N al comienzo del experimento. Después de 13 días de almacenamiento, este parámetro aumentó para los grupos de papayas tratadas con el multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt ( $0.669 \pm 0.153$  N) y el AL-NC-BCO ( $0.521 \pm 0.163$ ) debido, posiblemente, a la presencia de un recubrimiento sobre la superficie del fruto. En la figura 2.10 se puede apreciar el RC sobre el fruto después del análisis de firmeza

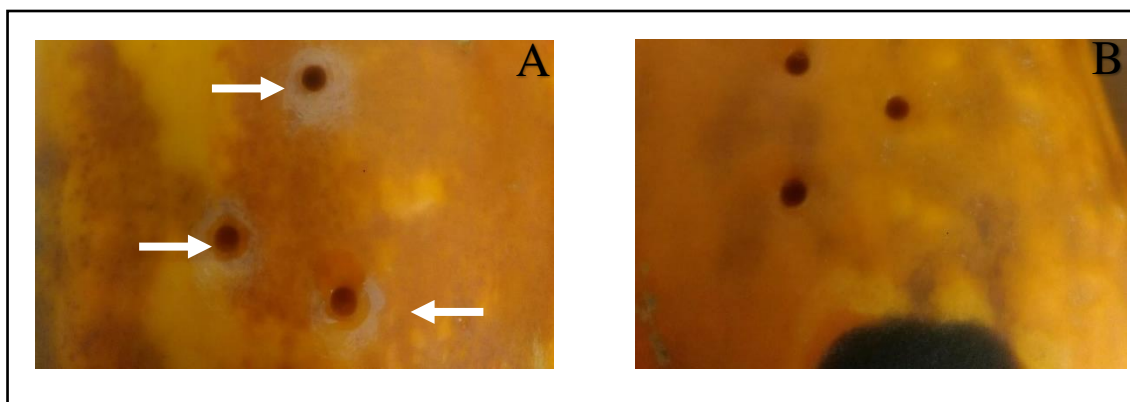
Los frutos control ( $0.411 \pm 0.090$  N) y los tratados con el AEt no encapsulado ( $0.319 \pm 0.099$  N), presentaron una pérdida del 16 y 35 % de la firmeza, respectivamente, en comparación con el valor inicial ( $0.492 \pm 0.063$  N). La disminución de la firmeza de las papayas está relacionada con el aumento en la actividad de las hidrolasas sobre los polisacáridos de la pared celular de la fruta durante la maduración que conduce a una modificación en su composición. Esta actividad enzimática es baja durante la primera etapa del desarrollo del fruto, luego aumenta y alcanza un máximo en la etapa climatérica del proceso de maduración (Yao *et al.*, 2014). Una pérdida de agua también está relacionada con la pérdida de turgencia de las células del mesocarpio, disminuyendo la firmeza del fruto (Vicente, Saladié, Rose, & Labavitch, 2007).





**Figura 2.9.** Firmeza (A) y color (B) de las papayas después del almacenamiento durante 13 días a 25 °C. Las barras corresponden a la medición inicial (inicial) así como a grupos de papayas sin tratamiento (control), con emulsión de AEt (AEt), con nanocápsulas sin AEt (AL-NC-BCO) y con el multisistema de recubrimiento (AL-NC-AEt). ( $n=3$ ;  $\bar{x}\pm DS$ ).

Resultados similares fueron reportados por Narsaiah *et al.* (2015) donde un RC de alginato a diferentes concentraciones (i.e. 1.0, 1.5 y 2.0 % p/v) mantuvo la firmeza de trozos de papaya almacenados por 21 días a 4 °C, en comparación con los frutos no tratados. Los autores mencionan que la firmeza de los frutos cambia, principalmente, por el rompimiento de los carbohidratos poliméricos complejos (i.e. celulosa, pectina) de las paredes celulares y por la respiración natural de fruto.



**Figura 2.10.** Fruta de papaya con el multisistema de recubrimiento (AL-NC-AEt) (A) y papaya sin ningún tratamiento (B).

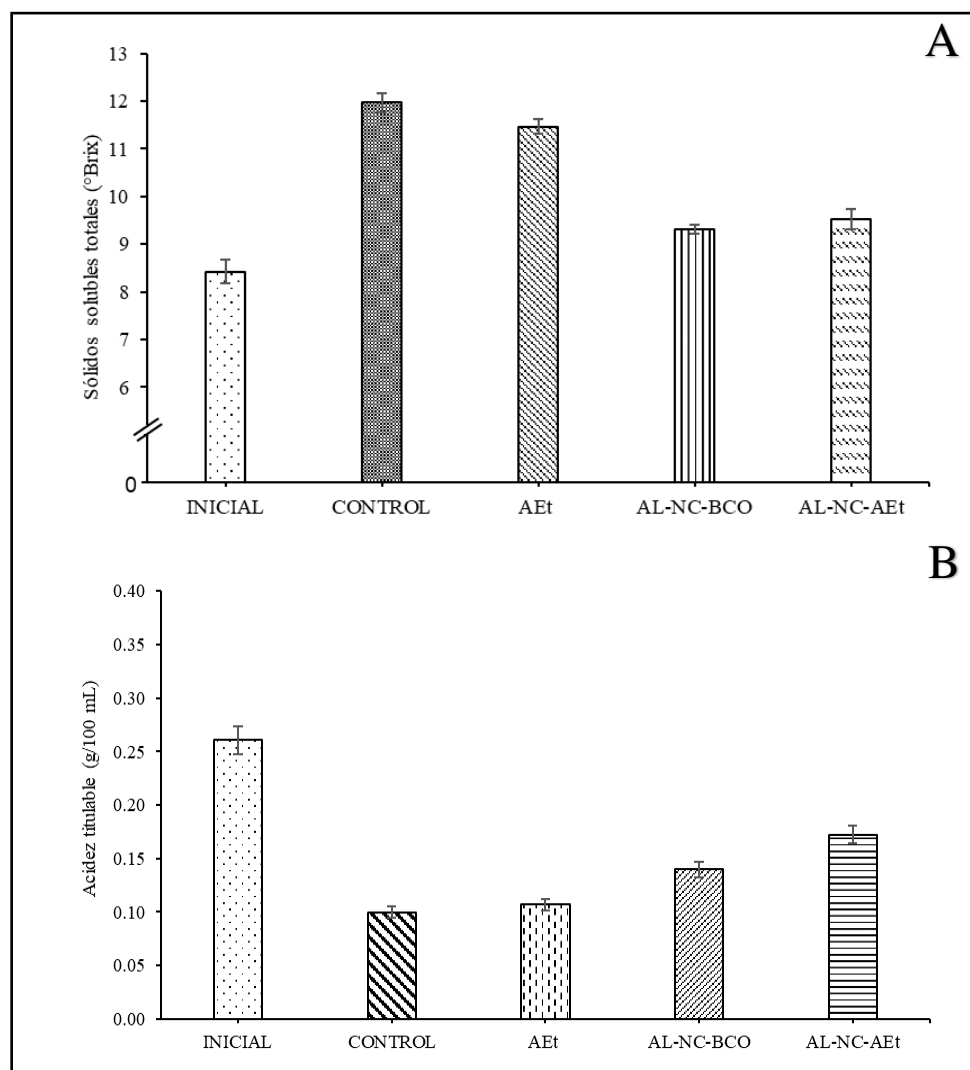
Por otra parte, los recubrimientos de alginato pueden actuar como portadores de compuestos activos para prolongar la vida útil de fruta mínimamente procesada. Maqbool *et al.* (2011) reportaron que la combinación de un RC de goma guar con AE de zacate limón y de canela mantuvo la firmeza de frutos de papaya por más tiempo en comparación a los frutos no tratados. Lo autores atribuyeron este efecto a la presencia del RC con los AE aplicado sobre la fruta, lo cual retrasó la maduración de la papaya, resultando en una fruta más firme.

En el presente estudio, el RC de AL tuvo la capacidad de actuar como una barrera que interfiere en el intercambio gaseoso, lo cual conduce a la reducción de la tasa de respiración de la fruta y evita la pérdida de agua; además, es posible que la actividad antioxidante de los componentes del AEt disminuyera la actividad enzimática del fruto, dando como resultados una maduración más lenta de la papaya.

Por otro lado, los cambios de color fueron determinados por la escala de color CIE L a\* b\*, donde a\* es la coordenada roja/verde (+a\* indica más rojo y -a\* indica más verde), mientras que b\* es la coordenada amarilla/azul (+b\* indica más amarillo y -b\* indica más azul). Como se muestra en la Figura 2.9B, todos los grupos (i.e. control, AEt, AL-NC-BCO y AL-NC-AEt) presentaron valores de a\* más positivos que los medidos al comienzo del estudio de vida útil ( $27.07 \pm 2.6$ ). Los valores de a\* positivos indican una acumulación de carotenoides (e.g. licopeno) y otros pigmentos que son responsables el color característico de la papaya durante el proceso de maduración. Se ha informado que la pérdida de clorofila produce una combinación de tonos amarillos y rojos en la piel de la

papaya (Fabi & do Prado, 2019). Los valores de la coordenada  $b^*$  disminuyeron, con excepción del AL-NC-BCO, para los demás tratamientos y las frutas control en comparación con el valor  $b^*$  inicial ( $53.94 \pm 8.9$ ). Se ha sugerido que las papayas en madurez fisiológica al ser almacenadas pueden presentar afectaciones en su tonalidad o desarrollar un color irregular (Barragán-Iglesias, Méndez-Lagunas, & Rodríguez-Ramírez, 2018). Con respecto a las frutas tratadas con el multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt, los valores de  $a^*$  y  $b^*$  fueron ligeramente más bajos que los de las frutas sin tratamiento (papayas de control), lo que indica una pérdida ligera de la coloración característica de la papaya. Esto se debe a que una vez que la papaya alcanza una maduración óptima, los cambios en la coloración son mínimos. Resultados similares fueron obtenidos por Almeida Castro *et al.* (2011) quienes informaron que un recubrimiento a base de almidón de yuca a 2 % indujo un comportamiento similar en papayas (*Carica papaya* L.) almacenadas 6 días a 25 °C. En dicho estudio los autores reportan que la coordenada  $a^*$  presentó un aumento significativo en todas las muestras durante el almacenamiento y la coordenada  $b^*$  tuvo primero un aumento en sus valores y después una ligera disminución.

Los SST de las frutas tienden a aumentar durante la maduración. El valor de SST (Figura 2.11A) para las papayas al comienzo del experimento fue de  $8.42 \pm 0.248$  °Brix. Después de 13 días de almacenamiento, este parámetro aumentó para las papayas control ( $11.97 \pm 0.200$  °Brix), así como para las papayas tratadas con el AEt sin encapsular ( $11.47 \pm 0.153$  °Brix), AL-NC-BCO ( $9.32 \pm 0.090$  °Brix) y el multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt ( $9.52 \pm 0.219$  °Brix). El aumento de los SST durante el almacenamiento es debido a la respiración, a la inversión de compuestos insolubles en formas solubles y a la síntesis de sacarosa durante la maduración del fruto (Fabi *et al.*, 2007). Además, la actividad metabólica continúa como resultado de la maduración de la fruta, lo que conduce a la conversión de carbohidratos y ácidos orgánicos en azúcares para ser utilizados en varios procesos metabólicos (Guerreiro *et al.*, 2015). En el presente estudio, el aumento de los SST en las papayas con tratamientos y papayas control se debió a la síntesis de sacarosa a partir de fuentes de carbono proveniente de la pared celular.



**Figura 2.11.** Sólidos solubles totales (A) y acidez titulable (B) de las papayas después del almacenamiento durante 13 días a 25 °C. Las barras corresponden a la medición inicial (inicial) así como a grupos de papayas sin tratamiento (control), con emulsión de AEt (AEt), con nanocápsulas sin AEt (AL-NC-BCO) y con el multisistema de recubrimiento (AL-NC-AEt). ( $n=3$ ;  $\bar{x} \pm DS$ ).

El mayor cambio en la composición de la pared celular, relacionado con la maduración de muchas frutas, es la pérdida de cantidades significativas de azúcares neutros, especialmente galactosa y arabinosa para la producción de sacarosa (Gomez, Lajolo, & Cordenunsi, 2002)

Por otro lado, comparando el grupo control, el RC de AL-NC-BCO y el multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt, mostraron valores más bajos de SST. Este comportamiento podría atribuirse a la presencia del RC de AL en los multisistemas, lo que ayudó a reducir la respiración de las papayas, retrasando su maduración (Narsaiah *et al.*, 2015). Resultados

similares fueron encontrados por Ali, Muhammad, Sijam, & Siddiqui (2011), quienes reportaron que papayas tratadas con recubrimientos de quitosano mantuvieron la concentración de SST almacenadas durante 5 semanas a  $12 \pm 1$  °C y 85-90 % de humedad relativa. Los autores atribuyeron el resultado al efecto del RC en la desaceleración de la respiración y la actividad metabólica, lo que retrasó el proceso de maduración de los frutos. Se observó una diferencia importante de los SST entre el multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt ( $9.32 \pm 0.090$  °Brix) y el AEt ( $11.47 \pm 0.153$  °Brix). Esto podría deberse a la corta residencia del AEt en la superficie de la fruta debido a su rápida evaporación cuando no estaba nanoencapsulado. Esto limitó su efecto protector para retrasar la maduración de las papayas. En contraste, además de las propiedades de barrera del multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt, la liberación sostenida del AEt de las NC-AEt podría haber extendido la actividad antioxidante de AEt en la superficie de la fruta, lo que contribuyó a tener una mejor conservación de las papayas.

Además, como se muestra en la Figura 2.11B, la AT de las papayas fue de  $0.261 \pm 0.009$  g/100 mL al comienzo del experimento y disminuyó durante el almacenamiento para todos los grupos. Después de 13 días de almacenamiento, los valores de AT fueron  $0.100 \pm 0.010$ ,  $0.107 \pm 0.008$ ,  $0.140 \pm 0.008$  y  $0.172 \pm 0.013$  g/100 mL para papayas del grupo control, AEt, AL-NC-BCO y el multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt, respectivamente. Esta reducción de los valores de AT está asociada al metabolismo de los ácidos orgánicos en las papayas durante el proceso de maduración. Los ácidos orgánicos son responsables de la acidez de la fruta que se expresa como AT. Durante la maduración de las papayas, la cantidad de ácidos orgánicos disminuye, y esto es debido a que los ácidos orgánicos son metabolizados, principalmente, para asegurar el suministro adicional de carbono para la obtención de sacarosa, glucosa y fructosa en la fruta (Fabi *et al.*, 2007). En cuanto a los grupos de papayas con tratamientos, los resultados de AT tuvieron la misma tendencia que los obtenidos para SST. Después de 13 días de almacenamiento, las papayas del grupo control tuvieron la disminución más significativa de AT, mientras que el multisistema de recubrimiento AL-NC-Et la disminución más baja de AT. Esto significa que el multisistema AL-NC-AEt fue el tratamiento más efectivo para retrasar la maduración de la papaya, lo que puede atribuirse a un doble efecto. Primero, el recubrimiento de AL actuó como una barrera y disminuyó la tasa de respiración

(metabolismo) de la papaya. En segundo lugar, las NC-AEt prolongaron la permanencia del AEt en la superficie de la fruta, lo que condujo a aprovechar mejor su actividad antioxidante. Estos resultados son similares a los obtenidos por Maqbool *et al.* (2011) que aplicaron goma arábica en combinación AE de hierba de limón y de canela en papayas. La maduración de las papayas se retrasó de manera importante en términos de la AT y otros parámetros (i.e. porcentaje de pérdida de peso, firmeza de la fruta, SST). En el estudio realizado por Espitia *et al.* (2012) se incorporaron AE de *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Cymbopogon flexuosus* a un empaque para preservar frutos de papaya, reportando que mientras el contenido de SST aumentó con el tiempo, la AT de la papaya sufrió una reducción durante el tiempo de almacenamiento. Narsaiah *et al.* (2015) mencionan que la respiración metabólica del fruto de papaya tiene una relación directamente proporcional con la acidez de la fruta. En su estudio, reportan una disminución de la AT 2.7 veces menor en muestras de papaya recubiertas con alginato en comparación muestras no recubiertas.

Finalmente, a todos los grupos analizados (i.e. control, AEt, AL-NC-BCO y multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt) se les dio seguimiento para observar la presencia o ausencia de daño macroscópico causado por microorganismos. Con excepción de las papayas tratadas con el multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt, todos los grupos de papayas mostraron daños causados por microorganismos, probablemente hongos (Figuras 2.12A, B y C). Se observaron varios tipos de patrones de crecimiento en las papayas infectadas. Las colonias fueron de color gris pálido a negro con masas conidiales de color beige que forman anillos concéntricos (Torres-Calzada, Tapia-Tussell, Higuera-Ciapara, & Perez-Brito, 2013). Algunas de estas características podrían corresponder a la enfermedad llamada “antracnosis” causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Las frutas de papaya que tienen el multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt no mostraron daño macroscópico (Figura 2.12D). Esta protección se debe a la capacidad antimicrobiana y el efecto sobre fitopatógenos del AEt y sus componentes (Carezzano *et al.*, 2017; Eguchi *et al.*, 2016; Granata *et al.*, 2018; Habbadi *et al.*, 2018; Marchese *et al.*, 2016). En particular, el timol y el carvacrol se identificaron en el AEt mediante el análisis por CG-EM (Tabla II.1). Se ha sugerido que el AEt altera la superficie y la estructura de

la pared celular fúngica reduciendo la síntesis de la pared celular y causando la muerte del microorganismo (Grande-Tovar *et al.*, 2018).



**Figura 2.12.** Evaluación de la protección antimicrobiana en papayas después de 13 días de almacenamiento a 25 °C. Las imágenes corresponden a las papayas sin tratamiento (control, A), con emulsión de AEt (AEt, B), con nanocápsulas sin AEt (AL-NC-BCO, C) y con el multisistema de recubrimiento (AL-NC-AEt, D).

En presente estudio, la incorporación del AEt en NC proporcionó ventajas, que incluyen una liberación sostenida y un aumento del tiempo de residencia en la superficie de la papaya por parte del AEt, lo que favoreció la interacción de los compuestos del AEt con microorganismos que causan daños en la fruta (e.g. *Colletotrichum gloeosporioides*) (Torres-Calzada *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron la funcionalidad del multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt como un conservador efectivo para la fruta de papaya (*Carica papaya* L.).

## 2.4 Conclusión

En este estudio, se aplicó un multisistema de recubrimiento basado en AL y NC poliméricas que contenían aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. (AL-NC-AEt) para aumentar la vida útil de la papaya (*Carica papaya* L.). Los resultados demostraron el

potencial del multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt como alternativa a los métodos tradicionales de conservación de frutas. El estudio de vida útil demostró que las papayas con multisistema de recubrimiento mantuvieron por más tiempo sus características de firmeza, AT y SST que aquellas sin el multisistema. Además, las papayas con el multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt no mostraron signos de daño microbiológico. Las propiedades fisicoquímicas de los componentes individuales del multisistema de recubrimiento contribuyeron positivamente a retrasar la maduración de las papayas y protegerlas del daño de los microorganismos. En primer lugar, el RC de AL actuó como una barrera que redujo la transpiración y el metabolismo de las frutas. En segundo lugar, los compuestos del AEt con actividad antimicrobiana evitaron el crecimiento de microorganismos, mientras que aquellos con actividad antioxidante pudieron reducir el estrés oxidativo causado por la postcosecha de la papaya. En particular, debido a su tamaño y carácter multiparticulado, las nanopartículas cargadas con AEt se distribuyeron de manera más uniforme en las frutas y luego, gradualmente, liberaron componentes del AEt. Además, la estructura polimérica de las NC impidió la rápida evaporación del AEt, aumentando así su tiempo de residencia en la fruta. Con base en estos resultados, podemos concluir que la presencia del AL-NC-AEt en la superficie de la papaya fue efectiva para mantener la calidad postcosecha y extender la vida útil de las papayas. Este tipo de multisistemas podrían ser una alternativa viable para preservar productos hortofrutícolas por períodos más largos.

## 2.5 Bibliografía

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, 24(2), e51–e56. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>
- Agili, F. A. (2014). Chemical composition, antioxidant and antitumor activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 21(10), 1670–1676. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2014.21.10.85182>
- Ali, A., Muhammad, M. T. M., Sijam, K., & Siddiqui, Y. (2011). Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 124(2), 620–626. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.085>
- Almeida Castro, A., Reis Pimentel, J. D., Santos Souza, D., Vieira de Oliveira, T., & da Costa Oliveira, M. (2011). Estudio de la conservación de la papaya (*Carica papaya* L.) asociado a la aplicación de películas comestibles. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2(1), 49–60. Retrieved from <http://ri.ufs.br:8080/bitstream/123456789/719/1/EstudioConservacionPapaya.pdf>



- Amiri, H. (2012). Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2012/728065>
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Elaissari, A. (2015a). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Addi, E. H. A., Bitar, A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Elaissari, A. (2015b). Antimicrobial activity of nano-encapsulated essential oils: Comparison to non-encapsulated essential oils. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 4(1), 39-38. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2015.1118>
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>
- Badri, W., El Asbahani, A., Miladi, K., Baraket, A., Agusti, G., Nazari, Q. A., Elaissari, A. (2018). Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella Sativa* L. essential oil for the topical treatment of inflammation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46(December 2017), 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.022>
- Baker, B. P., Grant, J. A., & Malakar-Kuenen, R. (2008). Thyme and thyme oil profile. Active ingredient eligible for minimum risk pesticide use. *Integrated Pest Management Cornell University Extension*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/1813/56143>
- Baldissera, M. D., Grando, T. H., Souza, C. F., Gressler, L. T., Stefani, L. M., da Silva, A. S., & Monteiro, S. G. (2016). *In vitro* and *in vivo* action of terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinene, and  $\alpha$ -terpinene against *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology*, 162, 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.004>
- Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, 50, 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.052>
- Bareras-Urbina, C. G., Ramírez-Wong, B., López-Ahumada, G. A., Burruel-Ibarra, S. E., Martínez-Cruz, O., Tapia-Hernández, J. A., & Rodríguez Félix, F. (2016). Nano- and micro-particles by nanoprecipitation: Possible application in the food and agricultural industries. *International Journal of Food Properties*, 19(9), 1912-1923. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1089279>
- Barragán-Iglesias, J., Méndez-Lagunas, L. L., & Rodríguez-Ramírez, J. (2018). Ripeness indexes and physicochemical changes of papaya (*Carica papaya* L. cv. Maradol) during ripening on-tree. *Scientia Horticulturae*, 236, 272-278. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.012>
- Barrera Necha, L. L., & García Barrera, L. J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista Científica UDO Agrícola*, 8(1), 33-41.
- Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., Bello-Pérez, A., Villanueva-Arce, R., & Hernández-López, M. (2013). A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection*, 49, 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>
- Benchabane, O., Hazzit, M., Mouhouche, F., & Baaliouamer, A. (2015). Influence of extraction duration on the chemical composition and biological activities of essential oil of *Thymus pallescens* de Noé. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(7), 1855-1865. <https://doi.org/10.1007/s13369-015-1694-x>
- Boehm, A. L., Martinon, I., Zerrouk, R., Rump, E., & Fessi, H. (2003). Nanoprecipitation technique for the encapsulation of agrochemical active ingredients. *Journal of Microencapsulation*, 20(4), 433-441. <https://doi.org/10.1080/0265204021000058410>
- Bosquez-Molina, E., Jesús, E. R. de, Bautista-Baños, S., Verde-Calvo, J. R., & Morales-López, J. (2010). Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology*,

- 57(2), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.008>
- Camele, I., Altieri, L., de Martino, L., de Feo, V., Mancini, E., & Rana, G. L. (2012). *In vitro* control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 2290–2300. <https://doi.org/10.3390/ijms13022290>
- Carezzano, M. E., Sotelo, J. P., Primo, E., Reinoso, E. B., Paletti Rovey, M. F., Demo, M. S., Oliva, M. de las M. (2017). Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on virulence factors of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Biology*, 19(4), 599–607. <https://doi.org/10.1111/plb.12572>
- Carrasco Ruiz, A., Tomas, V., Tudela, J., & Miguel, M. G. (2016). Comparative study of GC-MS characterization, antioxidant activity and hyaluronidase inhibition of different species of *Lavandula* and *Thymus* essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(1), 57–69. <https://doi.org/10.1002/ffj.3283>
- Choudhary, D. K., Sharma, A. K., Agarwal, P., Varma, A., & Tuteja, N. (2017). *Volatiles and food security: Role of volatiles in agro-ecosystems*. (D. K. Choudhary, A. K. Sharma, P. Agarwal, A. Varma, & N. Tuteja, Eds.), *Volatiles and Food Security: Role of Volatiles in Agro-Ecosystems*. Singapore: Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5553-9>
- Diao, W. R., Hu, Q. P., Zhang, H., & Xu, J. G. (2014). Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*, 35(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.056>
- Eça, K. S., Sartori, T., & Menegalli, F. C. (2014). Films and edible coatings containing antioxidants - a review. *Brazilian Journal of Food Technology*, 17(2), 98–112. <https://doi.org/10.1590/bjft.2014.017>
- Eguchi, Y., Widiastuti, A., Odani, H., Chinta, Y. D., Shinohara, M., Misu, H., Sato, T. (2016). Identification of terpenoids volatilized from *Thymus vulgaris* L. by heat treatment and their *in vitro* antimicrobial activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.05.004>
- Espitia, P. J. P., Soares, N. de F. F., Botti, L. C. M., Melo, N. R. de, Pereira, O. L., & Silva, W. A. da. (2012). Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(4), 333–342. <https://doi.org/10.1590/s1981-67232012005000027>
- Fabi, J. P., Cordenunsi, B. R., Barreto, G. P. D. M., Mercadante, A. Z., Lajolo, F. M., & Do Nascimento, J. R. O. (2007). Papaya fruit ripening: Response to ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6118–6123. <https://doi.org/10.1021/jf070903c>
- Fabi, J. P., & do Prado, S. B. R. (2019). Fast and furious: Ethylene-triggered changes in the metabolism of papaya fruit during ripening. *Frontiers in Plant Science*, 10, 535. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00535>
- FAO. (2011). *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0126>
- FAO. (2015). *Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe* (Boletín 2). FAO (Vol. 2). Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i5504s.pdf>
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammourey, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1–R4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)
- Feyzioglu, G. C., & Tornuk, F. (2016). Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.037>
- Galindo-Rodríguez, S., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428–1439. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036917.75634.be>
- Gomez, M., Lajolo, F., & Cordenunsi, B. (2002). Evolution of soluble sugars during ripening of papaya

- fruit and its relation to sweet taste. *Journal of Food Science*, 67(1), 442–447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11426.x>
- Granata, G., Stracquadiano, S., Leonardi, M., Napoli, E., Consoli, G. M. L., Cafiso, V., Geraci, C. (2018). Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chemistry*, 269, 286–292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.140>
- Grande-Tovar, C. D., Chaves-Lopez, C., Serio, A., Rossi, C., & Paparella, A. (2018). Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involve in fruit decay and mechanisms of action. *Trends in Food Science and Technology*, 78(May), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.019>
- Guerra-Boone, L., Alvarez-Román, R., Salazar-Aranda, R., Torres-Cirio, A., Rivas-Galindo, V. M., Waksman de Torres, N., Pérez-López, L. A. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 363–369.
- Guerreiro, A. C., Gago, C. M. L., Faleiro, M. L., Miguel, M. G. C., & Antunes, M. D. C. (2015). The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.002>
- Habbadi, K., Meyer, T., Vial, L., Gaillard, V., Benkirane, R., Benbouazza, A., Lavire, C. (2018). Essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus vulgaris* exert a protective effect against the phytopathogen *Allorhizobium vitis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), 29943–29952. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1008-9>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Jemaa, M. Ben, Falleh, H., Serairi, R., Neves, M. A., Snoussi, M., Isoda, H., Ksouri, R. (2018). Nanoencapsulated *Thymus capitatus* essential oil as natural preservative. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.017>
- Lemes, G. F., Marchiore, N. G., Moreira, T. F. M., Da Silva, T. B. V., Sayer, C., Shirai, M. A., Leimann, F. V. (2017). Enzymatically crosslinked gelatin coating added of bioactive nanoparticles and antifungal agent: Effect on the quality of Benitaka grapes. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.050>
- Liakos, I., Grumezescu, A., Holban, A., Florin, I., D’Autilia, F., Carzino, R., Athanassiou, A. (2016). Polylactic acid—lemongrass essential oil nanocapsules with antimicrobial properties. *Pharmaceuticals*, 9(3), 42. <https://doi.org/10.3390/ph9030042>
- Limaverde, P. W., Campina, F. F., da Cunha, F. A. B., Crispim, F. D., Figueredo, F. G., Lima, L. F., Tintino, S. R. (2017). Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 957–961. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.031>
- Lozada Ordóñez, M. I., Pereira da Silva, P., Borges Pereira, R., & Marcos Nascimento, W. (2019). Essential oils in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae* in onion seeds. *Revista Ciência Agronômica*, 50(3), 510–518. Retrieved from <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/6131/1831>
- Lugo-Estrada, L., Galindo-Rodríguez, S. A., Pérez-López, L. A., Waksman de Torres, N., & Álvarez-Román, R. (2019). Headspace–solid-phase microextraction gas chromatography method to quantify *Thymus vulgaris* essential oil in polymeric nanoparticles. *Pharmacognosy Magazine*, 15(January), 473–478. <https://doi.org/10.4103/pm.pm>
- Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P. G., Mohamed, M. T. M., Siddiqui, Y., & Zahid, N. (2011). Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 62(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.04.002>

- Marcet, I., Weng, S., Sáez-Orviz, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2018). Production and characterisation of biodegradable PLA nanoparticles loaded with thymol to improve its antimicrobial effect. *Journal of Food Engineering*, 239, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.06.030>
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402–414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Nabavi, S. M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., & Nabavi, S. F. (2015). Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*, 173, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.042>
- Narsaiah, K., Wilson, R. A., Gokul, K., Mandge, H. M., Jha, S. N., Bhadwal, S., Vij, S. (2015). Effect of bacteriocin-incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 100, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.10.003>
- Nenadis, N., & Tsimidou, M. Z. (2017). DPPH (2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) radical scavenging mixed-mode colorimetric assay(s). In *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications* (pp. 141–164). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch8>
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.006>
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- Perdones, A., Escriche, I., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chemistry*, 197, 979–986. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.054>
- Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P. P., & Dubey, N. K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*, 89, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.018>
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., & Sanches-Silva, A. (2017). Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Current Opinion in Food Science*, 14, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.012>
- Riquelme, N., Herrera, M. L., & Matiacevich, S. (2017). Active films based on alginate containing lemongrass essential oil encapsulated: Effect of process and storage conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 104, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.05.005>
- SAGARPA. (2018). *Atlas Agroalimentario 2012-2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)*. SAGARPA (Vol. 1). <https://doi.org/10.1111/resp.12002>
- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. del M., Segura-Carretero, A., Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1688–1706. <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>
- Satyal, P., Murray, B., McFeeters, R., & Setzer, W. (2016). Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*, 5(4), 70. <https://doi.org/10.3390/foods5040070>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Shen, Z., & Kamdem, D. P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.046>
- Shetta, A., Kegere, J., & Mamdouh, W. (2019). Comparative study of encapsulated peppermint and green

- tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, *in-vitro* release, antioxidant and antibacterial activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126(1), 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.161>
- Sivakumar, D., & Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Sotelo-Boyás, M. E., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., & Corona-Rangel, M. L. (2017a). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.022>
- Sotelo-Boyás, M., Correa-Pacheco, Z., Bautista-Baños, S., & Gómez y Gómez, Y. (2017b). Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.063>
- Sozer, N., & Kokini, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010>
- Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H., & Masoudpour-Behabadi, M. (2016). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 137, 360–374. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.074>
- Thakre, A. D., Mulange, S. V., Kodgire, S. S., Zore, G. B., & Karuppayil, S. M. (2016). Effects of Cinnamaldehyde, ocimene, camphene, curcumin and farnesene on *Candida albicans*. *Advances in Microbiology*, 6(9), 627–643. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.69062>
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I., & Perez-Brito, D. (2013). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.). *European Journal of Plant Pathology*, 135(1), 67–79. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0065-7>
- Vicente, A. R., Saladié, M., Rose, J. K., & Labavitch, J. M. (2007). The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: Looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(8), 1435–1448. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2837>
- Vilaplana, R., Pazmiño, L., & Valencia-Chamorro, S. (2018). Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil. *Postharvest Biology and Technology*, 138, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.12.008>
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Wattanasatcha, A., Rengpipat, S., & Wanichwecharungruang, S. (2012). Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1–2), 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.017>
- Werdin González, J. O., Gutiérrez, M. M., Ferrero, A. A., & Fernández Band, B. (2014). Essential oils nanoformulations for stored-product pest control - Characterization and biological properties. *Chemosphere*, 100, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.056>
- Yao, B. N., Tano, K., Konan, H. K., Bédié, G. K., Oulé, M. K., Koffi-Nevry, R., & Arul, J. (2014). The role of hydrolases in the loss of firmness and of the changes in sugar content during the post-harvest maturation of *Carica papaya* L. var solo 8. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3309–3316. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0858-x>
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8(1), 6–14. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>
- Yela, A. V., Jimenez, V. J., Rodriguez, D. V., & Quishpe, G. P. (2016). Evaluation of the antifungal activity of sulfur and chitosan nanocomposites with active ingredients of *Ruta graveolens*, *Thymus vulgaris*

and *Eucalyptus melliodora* on the growth of *Botrytis fabae* and *Fusarium oxysporum*. *Biology and Medicine*, 8(3). <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000291>

Zhang, Y., Yang, Y., Tang, K., Hu, X., & Zou, G. (2008). Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2), 891–897. <https://doi.org/10.1002/app.26402>

# **CAPÍTULO 3**

**APPLICATION OF A MULTISYSTEM COATING BASED  
ON POLYMERIC NANOCAPSULES CONTAINING  
ESSENTIAL OIL OF *Thymus vulgaris* L. TO INCREASE  
THE SHELF LIFE OF TABLE GRAPES (*Vitis vinifera* L.)**

# APPLICATION OF A MULTISYSTEM COATING BASED ON POLYMERIC NANOCAPSULES CONTAINING ESSENTIAL OIL OF *Thymus vulgaris* L. TO INCREASE THE SHELF LIFE OF TABLE GRAPES (*Vitis vinifera* L.)

(Published in *IEEE Transactions on NanoBioscience*)

<b>Volume/Issue:</b>	Volume 18, Issue 4
<b>Digital Object Identifier:</b>	10.1109/TNB.2019.2941931
<b>Page(s):</b>	549 - 557

## 3.1 Introduction

Fruits are perishable products because of their inherent tendency to deteriorate. During the postharvest period of fruit, it is necessary to guarantee a longer useful life of the vegetable. Reports from the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) mention that, in developing countries, there is a great deficiency in marketing infrastructure, therefore, postharvest losses of fresh products reach up to 50 % of total production (FAO, 2011). Losses of this magnitude trigger a considerable economic damage for food productive chain, especially, for primary producers. In addition, the presence of pests represents a serious health risk for the consumer. FAO, in collaboration with the Latin American Integration Association (ALADI) and the Economic Commission for Latin America and the Caribbean (ECLAC), prepared the Food Losses and Waste Plan (FLW) which promotes the development of innovative technologies that contribute to reduce food loss at all stages of the food production chain (FAO, 2015a). In recent years, different alternatives have been proposed in order to preserve the horticultural products, including the use of protective coatings. An edible coating is a thin layer of edible material formed as a coating on a food product. Using coatings modifies the interaction of the fruit with the environment due to their physicochemical properties, prolonging the shelf life of the treated fruits (Eça *et al.*, 2014). Different coating-forming compounds have been used, including chitosan, alginate, starch, and pullulan (Atarés & Chiralt, 2016; Grande-Tovar *et al.*, 2018; Lemes *et al.*, 2017; Perdonés *et al.*, 2016).

Pullulan is a polysaccharide produced by *Aureobasidium pullulans*; it can form edible coatings with several advantages over other polysaccharides. Concerning its properties, it



has limited permeability to oxygen and carbon dioxide, has good adhesive properties, is colorless, and has no flavor (Diab, Biliaderis, Gerasopoulos, & Sfakiotakis, 2001; Kraśniewska *et al.*, 2017; Niu, Shao, Chen, & Sun, 2019). The pullulan coating can influence on the physiology of fruit since it acts as a barrier between the environment and fruit. The protective effect of this coating can also be improved by adding compounds that exhibit some biological activity, such as essential oils (EO). Due to their antioxidant and antimicrobial activities, EO have emerged as an important and innovative alternative for the control and reduction of postharvest losses (Pandey, Kumar, Singh, Tripathi, & Bajpai, 2017a). In fact, the antimicrobial properties of EO have been used to control fungi and phytopathogenic bacteria (Choudhary, Sharma, Agarwal, Varma, & Tuteja, 2017). In particular, the EO obtained from the *Thymus vulgaris* L. (EOt) plant have been widely used as additives in food, pharmaceutical and cosmetics. For example, in the alternative medicine, EOt have been useful for their antiseptic, carminative, expectorant, antimicrobial and antioxidative effects (Amiri, 2012; Ballester-Costa *et al.*, 2013; Nabavi *et al.*, 2015; Salehi *et al.*, 2018). On the other hand, in the food industry, EOt and their constituents, are used as flavoring agents, aroma additives, antioxidants and preservatives. In addition, FDA has classified EOt as GRAS (Generally Recognized As Safe) (Sivakumar & Bautista-Baños, 2014; Vilaplana, Pazmiño, & Valencia-Chamorro, 2018). In general, the application of EO as additives is often troublesome because they can be deteriorated by environmental factors, such as light and oxygen, and are prone to evaporation (Asbahani, Miladi, Badri, *et al.*, 2015). In addition, EO have low solubility in water, which makes difficult to incorporate them into commercial products (Feyzioglu & Tornuk, 2016). To overcome these effects, nanoencapsulation of EO in polymeric nanoparticles has become an interesting alternative. Nanoencapsulation is a process in which the active ingredient (e.g. essential oils, extract plants, drugs, vitamins) is surrounded by a coating wall of polymer to form nanocapsules or is embedded in a polymeric matrix to form nanospheres. Therefore, besides protecting the encapsulated EO against harsh environments, nanoencapsulation can offer a controlled release and improves the handling of the EO (Granata *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 2018; Sozer & Kokini, 2009). For example, nanoparticles of *Lippia sidoides* EO were prepared via spray-drying using biopolymer blends of alginate/cashew gum. Formulations of nanoparticles

exhibited different release profiles of *Lippia sidoides* EO dependent on the alginate/cashew gum ratio. The most significant *in vitro* release profile showed that between 45 and 95 % of oil was released within 30–50 h (de Oliveira *et al.*, 2014). In another study, eugenol, a volatile constituent of EO, was nanoencapsulated by an emulsion–diffusion method. The study of oxidation stability revealed that eugenol loaded polycaprolactone nanoparticles were effective to protect eugenol from light oxidation, enhancing then its stability. The protective effect was attributed to the polymer wall that was surrounding the eugenol core (M. J. Choi, Soottitantawat, Nuchuchua, Min, & Ruktanonchai, 2009). Finally, nanocapsules (NC) containing lemongrass EO were prepared using polylactic acid as polymer. This formulation was more efficient in inhibiting bacteria growth than non-encapsulated EO. In addition, a biofilm formation assay demonstrated that lemongrass EO nanocapsules reduced the ability of microorganisms to develop biofilms. This could be explained by a more efficient delivery of the active compounds of EO from nanocapsules (Liakos *et al.*, 2016).

In order to introduce a novel strategy to prevent quality and quantity losses in postharvest storage of horticultural products, in this work, a multisystem coating based on pullulan and polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. (NC-EOt-C) was evaluated to increase the shelf life of the table grapes (*Vitis vinifera* L.).

## **3.2 Methodology**

### **Plant collection and identification**

Fresh stems and leaves of the *Thymus vulgaris* L. plants were purchased from the local market in Monterrey, México in June 2016. The plants were identified with the number 010970 and deposited at the herbarium of the School of Biological Sciences of the Autonomous University of Nuevo León, Monterrey, México.

### **Essential oil extraction**

The EOt was obtained by hydrodistillation (Benchabane *et al.*, 2015). Briefly, fresh-cut plant was hydrodistilled using a Clevenger-type apparatus (100 g·L<sup>-1</sup> water) for 4 h. The oil was collected and kept at 4 °C until use. The yield of EOt was calculated by using (1):

$$Yield = (EOt / F. plant) \times 100 \quad (1)$$

Where *EOt* are the grams of obtained oil and *F. plant* is the total weight, in grams, of fresh *Thymus vulgaris* L.

### **Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Gas Chromatography with Flame Ionization Detection (GC-FID) analysis**

The composition of volatile constituents of *EOt* was analyzed using a gas chromatograph 6890N (Agilent Technologies, USA) equipped with a 5973 INERT mass selective spectrometer (ionization energy 70 eV) and a HP-5MS capillary column (5 % phenylmethylpolysiloxane, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, Agilent J and W). The ionization-source temperature was 230 °C, the quadrupole temperature was 150 °C and the injector temperature was 220 °C. Data acquisition was performed in the scan mode. The oven temperature was programmed as follows: 35 °C for 9 min, increased to 150 °C at 3 °C·min<sup>-1</sup> and held for 10 min, increased to 250 °C at 10 °C·min<sup>-1</sup>, and increased to 270 °C at 3 °C·min<sup>-1</sup> and held for 10 min. The flow rate of the helium carrier gas (99.999 % purity) was 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. *EOt* components were identified by comparing retention indices relative to C8-C20 n-alkanes (Sigma-Aldrich), and MS were compared with the mass spectra from the US National Institute of Standards and Technology (NIST) library and reference data (Guerra-Boone *et al.*, 2015). To determine the proportion of each component, a quantitative analysis was performed with a GC-FID (Autosystem XL, Perkin Elmer, USA) using the same HP-5MS column. The injector temperature was 270 °C, the oven temperature program was same as the GC-MS analysis. The percentage composition of *EOt* was calculated using the peak normalization method.

### **Formulation of the multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing *Thymus vulgaris* L. essential oil (NC-*EOt*-C)**

The NC were prepared by the nanoprecipitation method as described by Lugo-Estrada *et al.* (2019). Briefly, an organic phase (5 mL) composed of a mixture of acetone:isopropanol (1:1), Eudragit L 100-55 (60 mg), and *EOt* (90 mg) was prepared. This was injected into

an aqueous phase (10 mL) containing 0.5 % (w/w) of poly(vinyl alcohol) (Mowiol 4-88 with a MW 26,000 and a hydrolysis degree of 88 %) under magnetic stirring. Diffusion of the organic phase into the aqueous phase induced the aggregation of polymer and encapsulation of EOt into nanocapsules (NC-EOt). The solvent was then evaporated under reduced pressure (Laborota 4003 control, Heidolph Instruments, GER). Unloaded NC (NC-BCO), without EOt, were obtained following the same procedure described above. The physicochemical characterization of the formulations was determined in an aqueous suspension of NC-EOt. The mean particle size, and polydispersity index (PI) were measured at 90 degree scattering angle using Dynamic Light Scattering, while the zeta potential measurement was by Laser Doppler Microelectrophoresis (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, UK).

For the formation of the multisystem coating, pullulan was used as film-coating. Pullulan powder was incorporated into an aqueous suspension of NC-EOt under magnetic stirring. The final concentration of pullulan was of 1.5 % (w/v). On the other hand, an emulsion of EOt ( $700 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in 3 % (w/v) Tween 80<sup>®</sup> was prepared at 11000 rpm (Homogeniser VDI 12, VWR, USA) to be used as a control.

### **Analysis of nanocapsules by GC-FID**

The NC-EOt were centrifuged at 25,000 rpm for 2 h (Allegra 64R centrifuge, Beckman Coulter, USA), and then the pellet was dissolved in methanol (TEDIA<sup>®</sup>). The quantitative analysis of *o*-cymene, thymol, and  $\gamma$ -terpinene in NC-EOt was performed with a GC-FID (Clarus 480, PerkinElmer, USA) using a capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ) (Elite-5, PerkinElmer, USA). The injector and detector temperatures were 280 °C and 260 °C, respectively. The oven temperature was programmed as follows: 70 °C for 1 min, increased to 116 °C at 4 °C $\cdot$ min<sup>-1</sup> and held for 1 min, increased to 200 °C at 20 °C $\cdot$ min<sup>-1</sup>, and increased to 230 °C at 14 °C $\cdot$ min<sup>-1</sup>. The flow rate of the helium carrier gas (99.999 % purity) was 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. This temperature program was used during the validation of the method. *o*-cymene, thymol, and  $\gamma$ -terpinene were selected as test compounds because they were the main components of the EOt. Subsequently, encapsulation efficiency percentage (EE%) was calculated by using (2):

$$EE\% = (C_e/C_t) \times 100 \quad (2)$$

Where  $C_e$  is the amount of a component in the NC-EOt (mg), and  $C_t$  is the amount of the component in the total EOt (mg) used in organic phase.

#### *Antioxidant activity*

The radical scavenging activities of NC-EOt and non-encapsulated EOt were first determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich) method (Amiri, 2012). Briefly, solutions of NC-EOt, EOt and carvacrol (positive control) were prepared in methanol (TEDIA®) at a concentration of  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A volume of 1 mL of each solution was mixed with 1 mL of freshly prepared DPPH methanol solution ( $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). These systems were left at room temperature in the dark for 30 min. Absorbances of these solutions were measured at 517 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, USA). On the other hand, the ABTS<sup>+</sup> method (Otmane Benchabane *et al.*, 2015) is based on the reduction of the green ABTS<sup>+</sup> radical cation. A volume of 25  $\mu\text{L}$  of each solution (NC-EOt, EOt or carvacrol, at a concentration of  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was added to 1 mL of ABTS<sup>+</sup> methanol solution (7 mM). After 7 min, absorbances were measured at 734 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, USA). In both cases, the percentage inhibition of free radical (I%) was calculated by using (3):

$$I\% = [(ABS_o - ABS_{sample})/ABS_o] \times 100 \quad (3)$$

Where  $ABS_o$  is the absorbance of the radical (DPPH or ABTS<sup>+</sup>) in methanol and  $ABS_{sample}$  is the absorbance of the sample with the radical.

#### **Effect of NC-EOt-C multisystem on postharvest quality and shelf life of grapes fruits (*Vitis vinifera* L.)**

Grapes with homogeneous characteristics of color, size, and without mechanical damage were selected. They were washed with distilled water and dried. Fruits were distributed in four groups. The first group was used as a control (without treatment), while the second one was immersed for 1 min in the EOt emulsion ( $700 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Then, the third group was immersed in an aqueous dispersion of pullulan (1.5 %, w/v), which contained NC-BCO (NC-BCO-C). Finally, the fourth group was immersed for 1 min in an aqueous dispersion containing the components of the multisystem, the pullulan and NC-EOt (NC-

E0t-C); E0t was at the same concentration of E0t group. All groups were maintained at 25 °C for 13 days.

Titrateable acidity (TA) was determined by titration of grape juice using 0.1 N NaOH solution until the end of titration (pH= 8.2). It was expressed as grams of tartaric acid per 100 mL.

The total soluble solid content (SSC) of grape juice was obtained by refractometry (Abbemat 200, AntonPaar, AUT). The color values (CIE L\*a\* and b\*) of grapes were determined by using a colorimeter (ColorFlex EZ, HunterLab, USA). The firmness of grapes was measured by using a texture analyser (CT3 Texture Analyzer, Brookfield-Ametek, USA), which was equipped with a cylindrical probe having 4 mm diameter. The firmness was expressed in Newton (N). All parameters were determined at the beginning and at the end of the shelf life study.

In another evaluation, the presence of microbiological damage on the fruits stored at 4 °C was monitored for 6 months.

### **3.3 Results and discussion**

#### **Chemical characterization of *Thymus vulgaris* L. essential oil**

E0t had a yield of  $0.378 \pm 0.159$  % fresh weight. Chemical analysis of the E0t by GC-MS led to identification of 20 compounds (Table III.1). As is shown in Figure 3.1, the major components were *o*-cymene (32.68 %), thymol (31.90 %), and  $\gamma$ -terpinene (15.69 %). In general, the E0t was composed of 56.69 % of aliphatic terpenes and 43.31 % of oxygenated terpenes. Guerra-Boone *et al.*, (2015) found the same components in E0t, but with different percentages, 62.6 % of aliphatic terpenes and 35.6 % oxygenated terpenes. Results of chemical characterization of E0t by GC-MS were also similar to those reported by Satyal *et al.* (2016), who found that the main components were thymol (23-60 %),  $\gamma$ -terpinene (18-50 %), *p*-cymene (8-44 %), carvacrol (2-8 %), and linalool (3-4 %); percentages of these components may vary depending on harvest season and habitat of plant, as well as the extraction method of EO (Amiri, 2012).

Several studies are focused on showing the antimicrobial and antioxidant activities of E0t (Carrasco Ruiz *et al.*, 2016; Nabavi *et al.*, 2015).

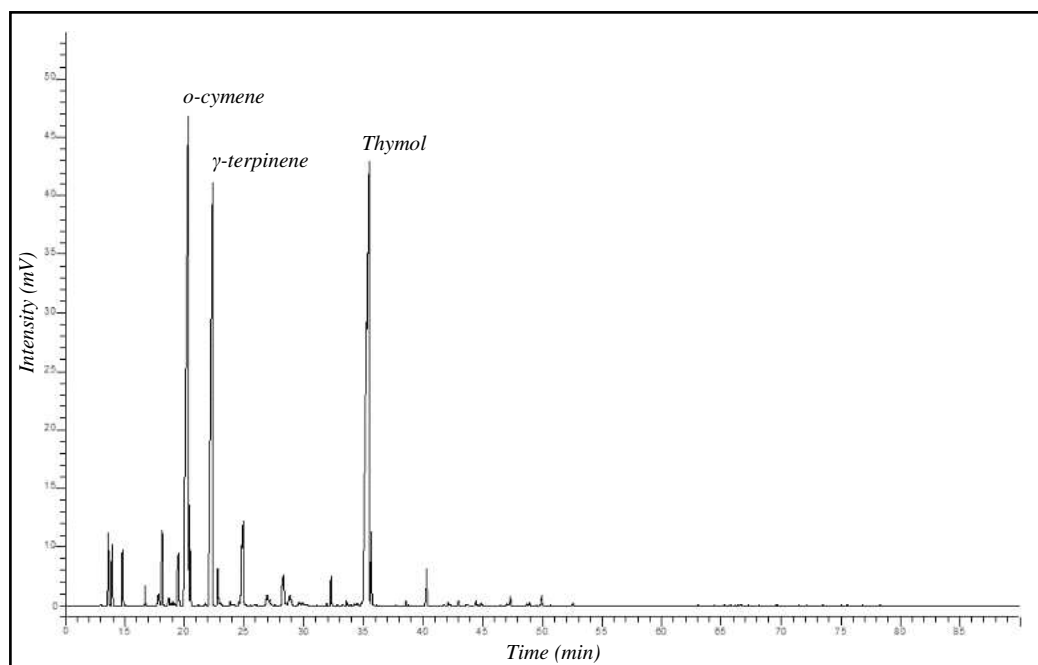
**Table III.1.** Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. essential oil by gas chromatography coupled to mass spectrometry<sup>a</sup>.

NO. <sup>a</sup>	T <sub>r</sub> <sup>b</sup> (min)	AREA (%)	COMPOUND
1	13.79	0.78	<i>α-thujene</i>
2	13.93	0.95	<i>α-pinene</i>
3	14.75	1.55	<i>Camphene</i>
4	16.76	0.40	<i>β-pinene</i>
5	17.81	0.40	<i>1-octen-3-ol</i>
6	18.03	1.52	<i>Myrcene</i>
7	19.35	1.03	<i>α-terpinene</i>
8	20.26	32.68	<i>o-cymene</i>
9	20.36	0.75	<i>Sylvestrene</i>
10	20.59	0.58	<i>1,8-cineole</i>
11	22.35	15.69	<i>γ-terpinene</i>
12	22.68	0.47	<i>cis-sabinene hydrate</i>
13	24.78	3.54	<i>Linalool</i>
14	26.78	1.25	<i>Camphor</i>
15	28.06	2.75	<i>Borneol</i>
16	28.70	0.75	<i>Terpinen-4-ol</i>
17	32.16	0.98	<i>Carvacrol methyl ether</i>
18	35.44	31.90	<i>Thymol</i>
19	35.58	1.16	<i>Carvacrol</i>
20	40.14	0.88	<i>E- caryophyllene</i>
<b>Total area</b>		<b>100</b>	
<b>Aliphatic terpenes</b>		<b>56.69</b>	
<b>Oxygenated Terpenes</b>		<b>43.31</b>	

<sup>a</sup> 6890N gas chromatograph coupled to 5973 INERT selective mass spectrometer; <sup>a</sup> Elution order; <sup>b</sup> Retention time.

Some authors have suggested that the antimicrobial effects of EO could mainly be attributed to their major constituents. Regarding our study, it has been reported thymol to

be active against a broad spectrum of microorganisms, including phytopathogen (Hyldgaard *et al.*, 2012; Salehi *et al.*, 2018; Sivakumar & Bautista-Baños, 2014; Wattanasatcha *et al.*, 2012). Furthermore, *o*-cymene, and  $\gamma$ -terpinene have also shown antimicrobial activity (Baldissera *et al.*, 2016; Nabavi *et al.*, 2015; Thakre *et al.*, 2016).



**Figure 3.1.** Chromatogram by gas chromatography with a flame ionization detector of *Thymus vulgaris* L. essential oil.

However, there is not much information about the application of these two compounds for fruit conservation. In general, fruits are products that easily deteriorate due to different types of microorganisms. Particularly, grapes of *Vitis vinefera* L. are susceptible to fungal decomposition by the genus *Aspergillus*, and more importantly, by the *Botrytis cinerea* species (de Sousa *et al.*, 2013; Mirdehghan & Rahimi, 2016). In our study, it was important to find that the major compounds of EOt (i.e. thymol and carvacrol) had previously demonstrated relevant antifungal activities.

### **Physicochemical characterization of NC-EOt**

EOt has a great potential as a natural preservative of fruits and vegetables, mainly due to the biological activities reported for many of its components. In fact, EOt is included in the GRAS list of the FDA (Baker, Grant, & Malakar-Kuenen, 2008). However, its use and



application have some limitations as a food additive because it has low solubility in water, and it is susceptible to degradation by environmental factors (e.g. oxygen and UV radiations) (Prakash *et al.*, 2018). Using the nanoprecipitation technique, EOt was nanoencapsulated into a polymeric structure to protect it from such natural agents (Bareras-Urbina *et al.*, 2016). The formation of NC by the nanoprecipitation technique is explained in terms of an interfacial turbulence. This occurs when an organic phase containing polymer, EOt, and an organic solvent miscible in water diffuses into an aqueous phase under slight magnetic stirring (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004). This technique has been successfully used for the nanoencapsulation of natural products, such as EO (Badri *et al.*, 2018; Sotelo-Boyás *et al.*, 2017a). In the present study, polymeric nanoparticles containing EOt (NC-EOt) were obtained with the physicochemical characteristics showed in Table III.2.

**Table III.2.** Physicochemical characterization of the formulation of nanoparticles loaded with *Thymus vulgaris* L. essential oil.

MEAN SIZE (nm)	PI <sup>1</sup>	ZETA POTENTIAL (mV)	EE % <sup>2</sup>
153.9 ± 4.7	0.186 ± 0.011	-4.11 ± 0.170	52.81 ± 2.69

<sup>1</sup> Polydispersity index which ranges from 0 to 1, a higher value corresponds to less homogeneous NC size distribution.

<sup>2</sup> Encapsulation efficiency percentage.

(n=3;  $\bar{x} \pm DS$ ).

Formulation of NC-EOt showed a mean size of 153.9 ± 4.7 nm. When compared to non-encapsulated EOt, its incorporation into NC can offer several advantages for its application as preservative of fruit. First, due to their size and multiparticulate character, EOt-loaded nanoparticles can be more uniformly distributed on the fruits and then, they can gradually release EOt for covering all fruit surface (Boehm *et al.*, 2003; Sotelo-Boyás *et al.*, 2017b). Particularly, the size next to 150 nm offers advantages in comparison with large particles (e.g. microparticles). As particle size smaller, their surface area to volume ratio gets larger. Then, it is possible to have more surface of the NC directly in contact with the fruit surface, allowing a local delivery of the EOt, specially where the microorganism are preferably found (Granata *et al.*, 2018). Secondly, polymer wall of NC allows retaining the EOt inside the structure, thus reducing its evaporation rate.

The mean size of NC-EOt was similar to that reported by Asbahani *et al.* (2015) who obtained NC (110-150 nm) with EO from two species of *Thymus* genus. Additionally, they found similar antimicrobial activities of nanoencapsulated and non-nanoencapsulated EO against bacteria (i.e. *E. Coli*, *Kliebsella Pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomons aeruginosa*, and *Salmonella typhimurium*), yeast (i.e. *Candida albicans* and *Candida glabrata*) and fungi (i.e. *Aspergillus niger* and *Penicillium funiculosum*). In another study, Granata *et al.* (Granata *et al.*, 2018) prepared nanoparticles of *Thymus capitatus* EO and *Origanum vulgare* EO with mean sizes of  $175 \pm 1.0$  and  $171 \pm 2.0$  nm, respectively. In addition, an improvement in the antimicrobial activity of EO-loaded nanoparticles was reported, showing a greater activity against foodborne pathogens compared with non-nanoencapsulated EO.

On the other hand, the PI is a parameter associated to homogeneity of the NC dispersion. For Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments) PI, values range from 0 to 1; a value lower than 0.200 indicates a homogeneous nanoparticle size distribution (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004). For this study, the PI value of NC-EOt formulation corresponded to  $0.186 \pm 0.011$ , indicating high nanoparticle homogeneity which would allow that the individual interactions of NC (e.g. bioadhesion, EOt release) to be also homogeneous on fruit surface.

Electrokinetic properties of NC-EOt were also considering in this study. The zeta potential is the electrostatic potential at the boundary dividing the compact layer and the diffuse layer of the colloidal particles. Zeta potential value for NC-EOt corresponded to -4.11 mV. The negative sign indicates that negative charges are dominant at the surface of NC and it can be attributed to Eudragit L 100-55, which is an anionic copolymer based on methacrylic acid and ethyl acrylate. Thus, during NC-EOt formation, the polymer chains surrounded the oily core to form the polymer wall and their anionic functional groups were exposed to the external aqueous media. This negative charge is important because it could facilitate the interaction of NC-EOt with the membrane of phytopathogenic microorganisms (e.g. *Botrytis cinerea* species), which would ensure that the delivery of the EOt compounds could be directly from the NC to the bacteria cells, increasing thus their antimicrobial effectiveness (Wang *et al.*, 2017).

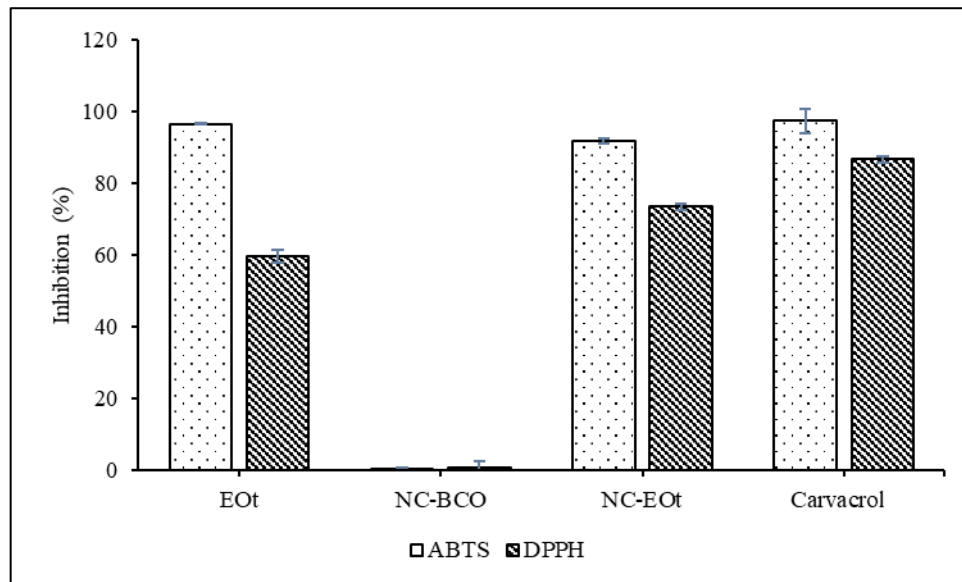
In order to complete the physicochemical characterization of NC-EOt, the EOt entrapped in NC was quantified by GC-FID and the EE% was calculated by using (2). The EE% was determined considering only the three major components of EOt and it corresponded to  $52.81 \pm 2.69$  % (Table III.2) for *o*-cymene,  $\gamma$ -terpinene, and thymol. These results are consistent with those of Marcet *et al.* (2018), who obtained thymol-loaded PLA NC with a mean size next to 260 nm and an EE of  $60.3 \pm 8$  %. In addition, they demonstrated that thymol-loaded PLA NC had improved antimicrobial properties in comparison with the non-encapsulated thymol. In another study, Sotelo-Boyás *et al.* (2017b) prepared two types of chitosan based nanoparticles loaded with EOt. Particularly, the EE% of thymol was of 68 % for EOt-loaded chitosan nanospheres, whereas it was of 72 % for EOt-loaded chitosan NC. In our study, GC-FID analysis revealed the presence of thymol into EOt-NC, which was relevant because several studies have reported that the antimicrobial and antioxidant activities of EOt were due partially to this compound. Thus, considering that more than 50 % of the EOt added during the preparation of the NC was encapsulated, it is possible that its major compounds (i.e. thymol) could be gradually released from NC to the fruit surface.

Now, concerning the antioxidant properties of NC-EOt, we observed that the antioxidant capacity of EOt was maintained, or even improved, after its incorporation into NC. First, as is shown in Figure 3.2, the radical scavenging activity were similar for NC-EOt ( $91.86 \pm 0.79$  %) and for EOt ( $96.66 \pm 0.26$  %) by using the ABTS<sup>+</sup> assay. Nevertheless, the radical scavenging activity was slightly higher for NC-EOt ( $73.50 \pm 0.76$  %) than for non-encapsulated EOt ( $59.62 \pm 1.77$  %) by the DPPH method. The NC-BCO, it means nanoparticles without EOt, showed no antioxidant activity by any radical scavenging assay. Some authors have proposed that a good interaction between radical DPPH and the polymeric wall of NC can promote the radical scavenging activity for the encapsulated compounds (Nenadis & Tsimidou, 2017; Shahidi & Zhong, 2015).

For instance, Zhang *et al.* (2008) reported that the antioxidant activity of quercetin was maintained when it was incorporated into chitosan nanoparticles. This was attributed to the complexes formed between the polymeric network of nanoparticles and quercetin, which allowed to retain and protect the quercetin molecules. Likewise, Kumar *et al.* (2015) determined the antioxidant capacity of naringenin-loaded chitosan nanoparticles,

a flavonoid with an anti-inflammatory activity. They found that the ability to scavenge DPPH free radicals was significantly higher (84 %) for nanoencapsulated naringenin than for free naringenin (~65 %). It was relevant to verify that the antioxidant activity of EOt was maintained after its nanoencapsulation because it had been established, as a hypothesis, that the oxidative stress induced during postharvest of grapes would be delayed or avoided for the NC-EOt.

So, considering all these aspects, the antimicrobial activity previously reported for EOt, the antioxidant activity tested for EOt as well as the advantages of its incorporation into NC, we established that the NC-EOt formulation had adequate characteristics to be a part of the multisystem coating intended for fruit conservation.

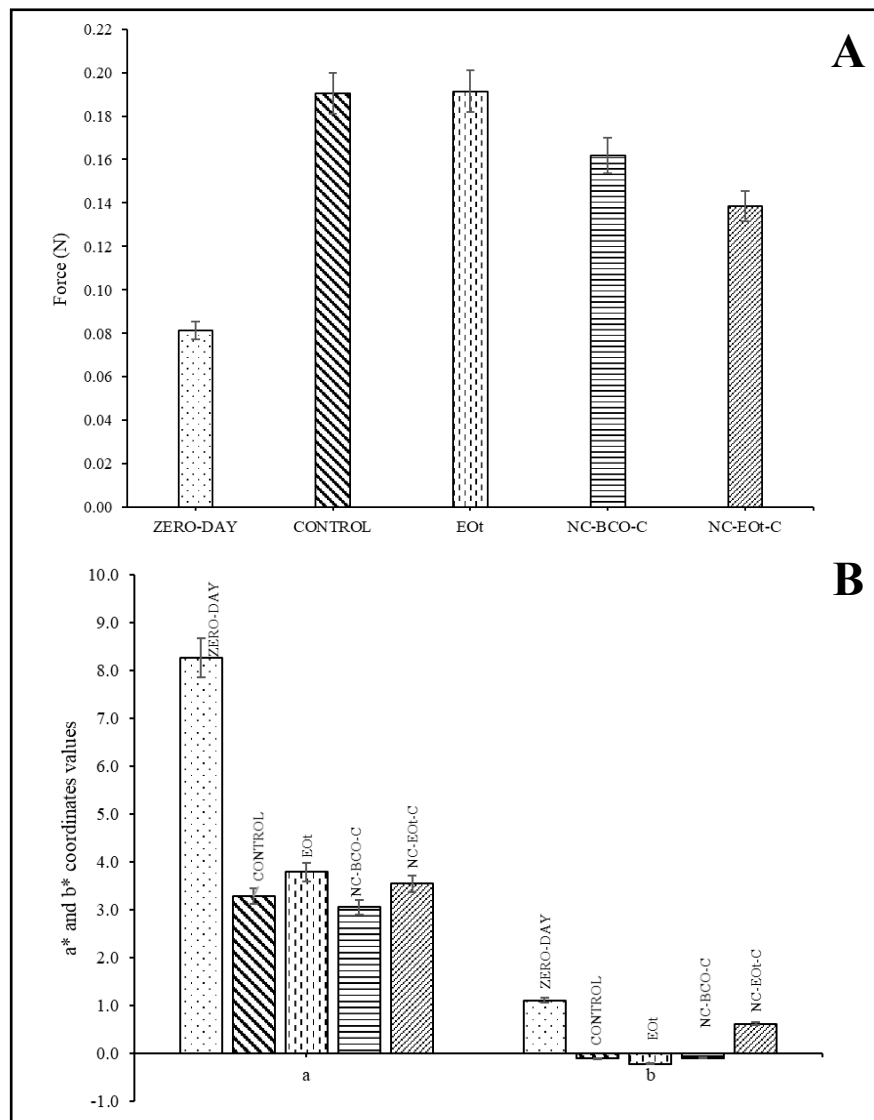


**Figure 3.2.** Radical scavenging activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil (EOt), nanocapsules without EOt (NC-BCO), nanocapsules with EOt (NC-EOt), and standard (carvacrol) at 1000 µg·mL<sup>-1</sup> by the DPPH and ABTS<sup>+</sup> methods. (n=3;  $\bar{X} \pm DS$ ).

### Effect of NC-EOt-C multisystem on postharvest quality and shelf life of grape fruits

Fruit firmness is an important quality attribute. The firmness (Figure 3.3A) of the grapes was  $0.082 \pm 0.030$  N at the beginning of the experiment. This parameter increased for all groups of grapes after 13 days of storage. The water loss is related to an increase of firmness of grapes because it induces a turgor loss of the mesocarp cells, making the exocarp (skin) a more flexible structure (Vicente, Saladié, Rose, & Labavitch, 2007).

Considering our results, the control ( $0.19 \pm 0.051$  N) and non-encapsulated EOt ( $0.19 \pm 0.037$  N) groups showed the highest values of firmness while the NC-BCO-C ( $0.16 \pm 0.043$  N) and NC-EOt-C multisystem ( $0.14 \pm 0.022$  N) had the lowest ones. In this case, the pullulan coating acted as a barrier, avoiding loss of water from grapes. Similar results were obtained by Krasniewska *et al.* (2017), who reported that a pullulan coating protected the blueberry fruits from loss of firmness, when they were stored at  $4 \pm 1$  °C for 28 days and at  $16 \pm 2$  °C for 14 days.



**Figure 3.3.** Firmness (A) and color (B) of grapes after storage at 25 °C for 13 days. Bars correspond to the initial measurement (zero day) as well as groups of grapes without treatment (control), with EOt emulsion (EOt), with nanocapsules without EOt (NC-BCO-C), and with the multisystem coating (NC-EOt-C). ( $n=10$ ;  $\bar{x} \pm DS$ ).

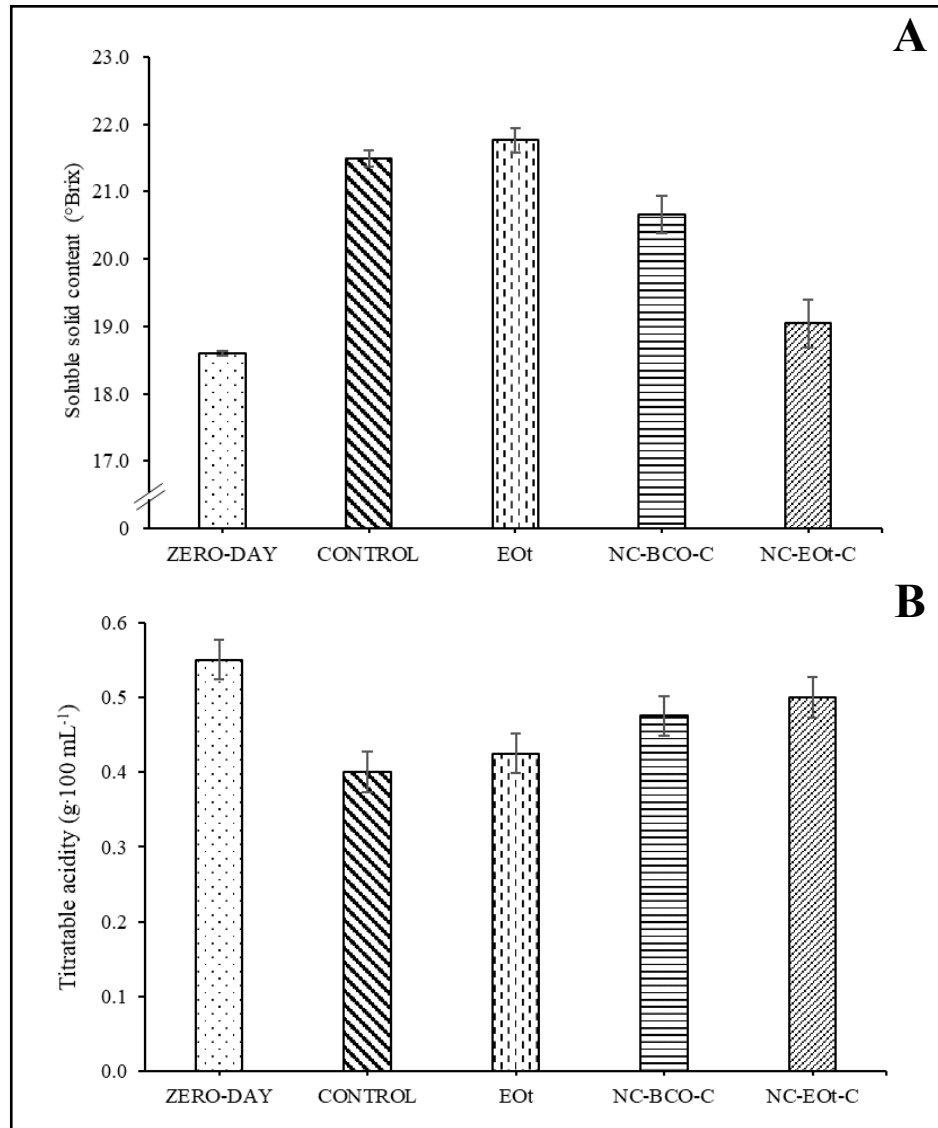
Authors mentioned that the pullulan coating avoided the excessive transpiration of fruits. On the other hand, the NC-EOT-C multisystem group had a lower firmness value than that of NC-BCO-C group. Considering that breaking down of complex carbohydrate polymers (e.g. pectin) by enzymes led to loosening of cell walls and softening of fruit (Eroglu, Torun, Dincer, & Topuz, 2014), the constituents of EOT released from NC could have interfered with enzymatic activity, delaying then the softening effect.

Furthermore, color changes were determined by the CIE L a\* b\* color scale, where a\* is the red/green coordinate (+a\* indicates redder and -a\* indicates greener), while b\* is the yellow/blue coordinate (+b\* indicates yellower and -b\* indicates bluer). As is shown in Figure 3.3B, all treatments (i.e. EOT, NC-BCO-C, and NC-EOT-C) and control grapes showed a\* values less positives (~3) than that measured at the beginning of the shelf life study ( $8.27 \pm 2.6$ ).

When values of a\* are positive and close to zero, this indicates an anthocyanin accumulation in grapes, which is related to ripening of fruits (Castelo Branco Melo *et al.*, 2018). Values of b\* coordinate also decreased for all treatments compared to the b\* initial value, although they had minor differences. Changes of color were due to enzymatic and chemical changes during ripening (Baraiya, Ramana Rao, & Thakkar, 2016). In particular, the contents of anthocyanins and acylated anthocyanins change during ripening and are responsible of the color of grape peel (Balík, Kumšta, & Rop, 2013), which can range from light red to dark blue and almost black. Concerning fruits treated with the NC-EOT-C multisystem, values of a\* and b\* were slightly higher than those for fruits without treatment (control grapes), showing that red color of fruits was not altered by the NC-EOT-C multisystem during ripening. Similar results were obtained by Lemes *et al.* (2017) who reported that a coating based on gelatin hydrogel added with curcumin-loaded nanoparticles maintained the color of *Benitaka* grapes after storage of 7 days at 25 °C. Particularly for b\* coordinate, there was a significant difference between the NC-EOT-C multisystem ( $0.614 \pm 0.7$ ) and EOT ( $-0.221 \pm 0.9$ ). This could be due to a rapid evaporation of molecules of non-encapsulated EOT, which avoided that their components could delayed the fruit ripening. The incorporation of EOT into the NC could have prolonged the interaction of EOT components on fruit surface. The SSC of the grapes tends to increase during ripening.

The SSC (Figure 3.4A) of the grapes was  $18.60 \pm 0.042$  °Brix at the beginning of the experiment. This parameter increased for control grapes ( $21.49 \pm 0.036$  °Brix) as well as grapes tested with EOt ( $21.76 \pm 0.116$  °Brix), NC-BCO-C ( $20.66 \pm 0.181$  °Brix) and the NC-EOt-C multisystem ( $19.05 \pm 0.274$  °Brix) after 13 days of storage. The increase of SSC during storage are due to respiration, the inversion of insoluble compounds to soluble forms and the moisture loss by evaporation (Rahman, Moniruzzaman, Ahmad, Sarker, & Khurshid Alam, 2016). In addition, metabolic activity continues as a result of fruit ripening, which leads to converting carbohydrates and organic acids into sugars to be used in several metabolic processes (Guerreiro *et al.*, 2015). In our study, the increase of SSC in grapes with treatments and control grapes was due to conversion of sucrose into glucose and fructose (Kambiranda, Vasanthaiah, & Basha, 2011). Now, comparing with control grape, the NC-BCO-C and the NC-EOt-C multisystem showed lower values of SSC. This behavior could be attributed to the pullulan coating present in both multisystem, which helped to reduce the respiration of the grapes, delaying their ripening (Trinetta & Cutter, 2016). Similar results were reported by Diab *et al.* (2001), who reported that Strawberry treated with a pullulan coating maintained the SSC values lower than the uncovered fruits after 12 days of storage at 20 °C. They attribute this result to the beneficial effects of the pullulan coatings to decrease the respiration rate of the fruits. A significant difference of SSC was observed between the NC-EOt-C multisystem ( $19.05 \pm 0.274$  °Brix) and the EOt ( $21.49 \pm 0.036$  °Brix). In fact, the EOt had 2.71 more °Brix than the NC-EOt-C multisystem. This could be due to the short residence of the EOt on the fruit surface because of its rapid evaporation when it was not nanoencapsulated. This limited its protective effect to delay the ripening of grapes. In contrast, besides to barrier properties of the NC-EOt-C multisystem, the sustained release of EOt from NC-EOt could have extended the antioxidant activity of EOt on fruit surface, which contributed to have a better conservation of grapes.

Moreover, as is shown in Figure 3.4B, the TA of the grapes was  $0.555 \pm 0.086$  g·100 mL<sup>-1</sup> at the beginning of the experiment and decreased slightly during storage for all groups. After 13 days of storage, the TA values were  $0.400 \pm 0.042$ ,  $0.425 \pm 0.045$ ,  $0.475 \pm 0.043$ , and  $0.500 \pm 0.044$  g·100 mL<sup>-1</sup> for control grapes, EOt, the NC-BCO-C, and the NC-EOt-C multisystem, respectively.



**Figure 3.4.** Total soluble solid content (A) and titratable acidity (B) of grapes after storage at 25 °C for 13 days. Bars correspond to the initial measurement (zero day) as well as groups of grapes without treatment (control), with EOt emulsion (EOt), with nanocapsules without EOt (NC-BCO-C), and with the multisystem coating (NC-EOt-C). ( $n=3$ ;  $\bar{X} \pm DS$ ).

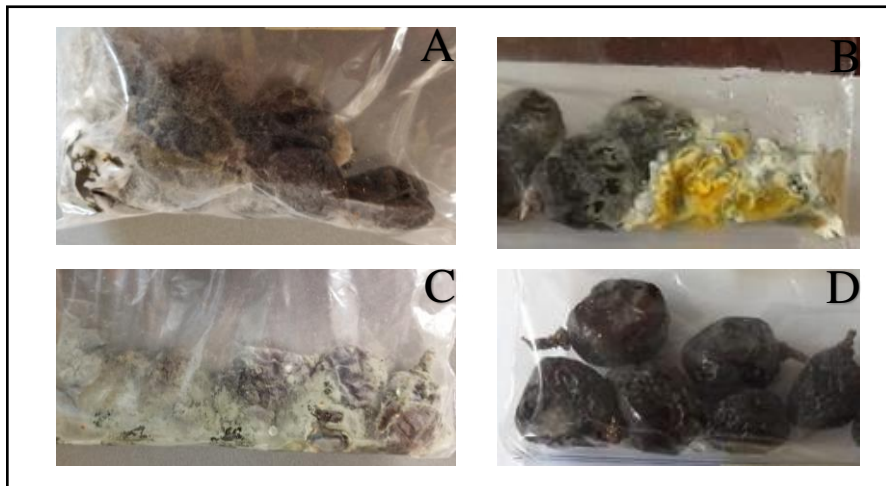
This reduction of TA values is associated to the metabolism of organic acids in grapes. Next to sugars, organic acids are the most abundant solids present in grapes. They are responsible of fruit acidity which is expressed as TA. The main organic acids found in grapes are tartaric, malic and to a small extent, citric. During the ripening of grapes, the amount of malate/citrate decreases, and this means that organic acids are being metabolized. The possible fates for these compounds are the Krebs cycle (respiration),



gluconeogenesis, amino acid synthesis, production of ethanol by fermentation and synthesis of secondary metabolites (e.g. pigments) (Franco; Famiani, Battistelli, Moscatello, & Cruz-Castillo, Juan Guillermo; Walker, 2015; Franco Famiani *et al.*, 2014). Concerning the groups of grapes with treatments, results of TA had the same trend that those obtained for SSC. After 13 days of storage, control grapes had the most significant decrease of TA, while the NC-EOt-C multisystem the lowest decrease of TA.

It means that the NC-EOt-C multisystem was the most effective treatment to delay the grape ripening, which can be attributed to a double effect. First, the pullulan coating acted as a barrier and decreased the respiration rate (metabolism) of grape. Second, the NC-EOt prolonged the residence of EOt on the surface of the fruit, which led to improve its antioxidant activity. These results are consistent with those obtained by Castelo Branco Melo *et al.* (2018), who reported that, after 12 days of storage, grape fruits coated with gel and chitosan nanoparticles had lower SSC values as well as few changes in the TA content than uncoated fruits. They also attributed that trend to a slowdown in the metabolic activity of the fruit caused by the coating gel and the chitosan nanoparticles.

Finally, control grapes and groups of grapes with treatments (i.e. EOt, NC-BCO-C, and NC-EOt-C multisystem) were stored for 6 months in order to observe the presence or absence of macroscopic damage caused by microorganisms. With exception of grapes treated with the NC-EOt-C multisystem, all groups of grapes showed damage caused by microorganisms, probably, fungi (Figure 3.5A, B, and C). Various kinds of growth patterns were observed on the infected grapes. Mycelia displayed powdery, cottony, and radial characteristics. Colonies were varied, from white and dirty white in color to grayish and orange; some of these characteristics could correspond to the disease called “gray mold” caused by *B. cinerea*. The grapes fruits having the NC-EOt-C multisystem showed no macroscopic damage (Figure 3.5D). This protection can be due to EOt components with antimicrobial activity (Eguchi *et al.*, 2016; Granata *et al.*, 2018). Particularly, thymol and carvacrol were identified in the EOt by the gas chromatography analysis (Table III.1). It has been suggested that EO alter the surface and structure of fungal cell wall reducing the cell wall synthesis (Grande-Tovar *et al.*, 2018).



**Figure 3.5.** Evaluation of antimicrobial protection of grapes after storage at 4 °C for 6 months. Image correspond to the grapes without treatment (control, A), with EOt emulsion (EOt, B), with nanocapsules without EOt (NC-BCO-C, C), and with the multisystem coating (NC-EOt-C, D).

In addition, EOt compounds are able to interact with outer cell membrane, increasing fluidity and permeability, and to cause structural and functional damages to cytoplasmic membrane of the microorganism (Granata *et al.*, 2018). On the other hand, the incorporation of EOt into NC provided advantages, including its sustained release and an increase of its residence time on the surface of the grape, which favored the interaction of EOt compounds with microorganisms that cause damage to the fruit. These advantages of the NC have been also observed in other areas such as medicine, pharmacology, and agriculture (Kamaly, Yameen, Wu, & Farokhzad, 2016; Werdin González *et al.*, 2017). These results demonstrated the functionality of the NC-EOt-C multisystem as an effective preservative for the fruit of *Vitis vinifera* L. grapes.

### 3.4 Conclusion

In this study, a multisystem coating based on pullulan and polymeric NC containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. (NC-EOt-C) was applied to increase the shelf life of the table grape (*Vitis vinifera* L.). The results demonstrated the potential of the NC-EOt-C multisystem as an alternative to traditional methods of fruit preservation. The shelf life study showed that grapes having the NC-EOt-C multisystem maintained their characteristics such as color, firmness, TA, and SSC for longer time than those without

the multisystem. Additionally, grapes with the NC-EOt-C multisystem did not show signs of microbiological damage. The physicochemical properties of the multisystem components contributed positively to delay the ripening of grapes and protect them from the damage of microorganisms. First, the pullulan coating acted as a barrier which reduced the transpiration and the respiration rate (metabolism) of fruits. Second, the compounds of EOt with antimicrobial activity avoided microorganism growth, while those with antioxidant activity reduced the oxidative stress induced during postharvest of grapes. In particular, due to their size and multiparticulate character, EOt-loaded nanoparticles were more uniformly distributed on the fruits and then, they gradually released EOt for covering all fruit surface; in addition, polymeric structure of NC prevented the rapid evaporation of volatile compounds of EOt, increasing then their residence time on fruit. Based on these results, we can conclude that the presence of the NC-EOt-C multisystem on the surface of the grape was effective to maintain the postharvest quality and to extend the shelf life of grapes. This kind of multisystem can be a viable alternative to preserve horticultural products for longer periods.

### 3.5 References

- Amiri, H. (2012). Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2012/728065>
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Elaissari, A. (2015a). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Addi, E. H. A., Bitar, A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Elaissari, A. (2015b). Antimicrobial activity of nano-encapsulated essential oils: Comparison to non-encapsulated essential oils. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 4(1), 39-38. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2015.1118>
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>
- Badri, W., El Asbahani, A., Miladi, K., Baraket, A., Agusti, G., Nazari, Q. A., Elaissari, A. (2018). Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella Sativa* L. essential oil for the topical treatment of inflammation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46(December 2017), 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.022>
- Baker, B. P., Grant, J. A., & Malakar-Kuenen, R. (2008). Thyme and thyme oil profile. Active ingredient eligible for minimum risk pesticide use. *Integrated Pest Management Cornell University Extension*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/1813/56143>
- Baldissera, M. D., Grando, T. H., Souza, C. F., Gressler, L. T., Stefani, L. M., da Silva, A. S., & Monteiro, S. G. (2016). *In vitro* and *in vivo* action of terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinene, and  $\alpha$ -terpinene against *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology*, 162, 43-48.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.004>

- Balík, J., Kumšta, M., & Rop, O. (2013). Comparison of anthocyanins present in grapes of *Vitis vinifera* L. varieties and interspecific hybrids grown in the Czech Republic. *Chemical Papers*, 67(10), 1285–1292. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0378-9>
- Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, 50, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.052>
- Baraiya, N. S., Ramana Rao, T. V., & Thakkar, V. R. (2016). Composite coating as a carrier of antioxidants improves the postharvest shelf life and quality of table grapes (*Vitis vinifera* L. var. Thompson seedless). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(1), 93–107. Retrieved from [http://ir.jkuat.ac.ke/bitstream/handle/123456789/4187/JAST\\_Volume\\_18\\_Issue\\_1\\_Pages\\_93-107.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://ir.jkuat.ac.ke/bitstream/handle/123456789/4187/JAST_Volume_18_Issue_1_Pages_93-107.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Bareras-Urbina, C. G., Ramírez-Wong, B., López-Ahumada, G. A., Burruel-Ibarra, S. E., Martínez-Cruz, O., Tapia-Hernández, J. A., & Rodríguez Félix, F. (2016). Nano- and micro-particles by nanoprecipitation: Possible application in the food and agricultural industries. *International Journal of Food Properties*, 19(9), 1912–1923. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1089279>
- Benchabane, O., Hazzit, M., Mouhouche, F., & Baaliouamer, A. (2015). Influence of extraction duration on the chemical composition and biological activities of essential oil of *Thymus pallescens* de Noé. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(7), 1855–1865. <https://doi.org/10.1007/s13369-015-1694-x>
- Boehm, A. L., Martinon, I., Zerrouk, R., Rump, E., & Fessi, H. (2003). Nanoprecipitation technique for the encapsulation of agrochemical active ingredients. *Journal of Microencapsulation*, 20(4), 433–441. <https://doi.org/10.1080/0265204021000058410>
- Carrasco Ruiz, A., Tomas, V., Tudela, J., & Miguel, M. G. (2016). Comparative study of GC-MS characterization, antioxidant activity and hyaluronidase inhibition of different species of *Lavandula* and *Thymus* essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(1), 57–69. <https://doi.org/10.1002/ffj.3283>
- Castelo Branco Melo, N. F., de MendonçaSoares, B. L., Marques Diniz, K., Ferreira Leal, C., Canto, D., Flores, M. A. P., Montenegro Stamford, T. C. (2018). Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.014>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.09.011>
- Choudhary, D. K., Sharma, A. K., Agarwal, P., Varma, A., & Tuteja, N. (2017). *Volatiles and food security: Role of volatiles in agro-ecosystems*. (D. K. Choudhary, A. K. Sharma, P. Agarwal, A. Varma, & N. Tuteja, Eds.), *Volatiles and Food Security: Role of Volatiles in Agro-Ecosystems*. Singapore: Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5553-9>
- de Oliveira, E. F., Paula, H. C. B., & de Paula, R. C. M. (2014). Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.038>
- de Sousa, L. L., de Andrade, S. C. A., Athayde, A. J. A. A., de Oliveira, C. E. V., de Sales, C. V., Madruga, M. S., & de Souza, E. L. (2013). Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic Aspergilli and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.001>
- Diab, T., Biliaderis, C. G., Gerasopoulos, D., & Sfakiotakis, E. (2001). Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(10), 988–1000. <https://doi.org/10.1002/jsfa.883>

- Eça, K. S., Sartori, T., & Menegalli, F. C. (2014). Films and edible coatings containing antioxidants - a review. *Brazilian Journal of Food Technology*, 17(2), 98–112. <https://doi.org/10.1590/bjft.2014.017>
- Eguchi, Y., Widiastuti, A., Odani, H., Chinta, Y. D., Shinohara, M., Misu, H., Sato, T. (2016). Identification of terpenoids volatilized from *Thymus vulgaris* L. by heat treatment and their *in vitro* antimicrobial activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.05.004>
- Eroglu, E., Torun, M., Dincer, C., & Topuz, A. (2014). Influence of pullulan-based edible coating on some quality properties of strawberry during cold storage. *Packaging Technology and Science*, 27(10), 831–838. <https://doi.org/10.1002/pts.2077>
- Famiani, Franco; Battistelli, A., Moscatello, S., & Cruz-Castillo, Juan Guillermo; Walker, R. P. (2015). The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: Occurrence, metabolism and factors affecting their contents – a review. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(2), 97–128. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60941168001>
- Famiani, Franco, Farinelli, D., Palliotti, A., Moscatello, S., Battistelli, A., & Walker, R. P. (2014). Is stored malate the quantitatively most important substrate utilised by respiration and ethanolic fermentation in grape berry pericarp during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 76, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.017>
- FAO. (2011). *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0126>
- FAO. (2015). *Food Losses and Waste in Latin America and the Caribbean*. Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i4655e.pdf>
- Feyzioglu, G. C., & Tornuk, F. (2016). Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.037>
- Galindo-Rodríguez, S., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428–1439. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036917.75634.be>
- Granata, G., Stracquadiano, S., Leonardi, M., Napoli, E., Consoli, G. M. L., Cafiso, V., Geraci, C. (2018). Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chemistry*, 269, 286–292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.140>
- Grande-Tovar, C. D., Chaves-Lopez, C., Serio, A., Rossi, C., & Paparella, A. (2018). Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involve in fruit decay and mechanisms of action. *Trends in Food Science and Technology*, 78(May), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.019>
- Guerra-Boone, L., Alvarez-Román, R., Salazar-Aranda, R., Torres-Cirio, A., Rivas-Galindo, V. M., Waksman de Torres, N., Pérez-López, L. A. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 363–369.
- Guerreiro, A. C., Gago, C. M. L., Faleiro, M. L., Miguel, M. G. C., & Antunes, M. D. C. (2015). The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.002>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. *Chemical Reviews*, 116(4), 2602–2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>
- Kambiranda, D., Vasanthaiah, H., & Basha, S. M. (2011). Relationship between acid invertase activity and sugar content in grape species. *Journal of Food Biochemistry*, 35(6), 1646–1652.

<https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00483.x>

- Kraśniewska, K., Ścibisz, I., Gniewosz, M., Mitek, M., Pobiega, K., & Cendrowski, A. (2017). Effect of pullulan coating on postharvest quality and shelf-life of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Materials*, *10*(8), 965. <https://doi.org/10.3390/ma10080965>
- Kumar, S. P., Birundha, K., Kaveri, K., & Devi, K. T. R. (2015). Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing naringenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, *78*, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.045>
- Lemes, G. F., Marchiore, N. G., Moreira, T. F. M., Da Silva, T. B. V., Sayer, C., Shirai, M. A., Leimann, F. V. (2017). Enzymatically crosslinked gelatin coating added of bioactive nanoparticles and antifungal agent: Effect on the quality of Benitaka grapes. *LWT - Food Science and Technology*, *84*, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.050>
- Liakos, I., Grumezescu, A., Holban, A., Florin, I., D'Autilia, F., Carzino, R., Athanassiou, A. (2016). Polylactic acid—lemongrass essential oil nanocapsules with antimicrobial properties. *Pharmaceuticals*, *9*(3), 42. <https://doi.org/10.3390/ph9030042>
- Lugo-Estrada, L., Galindo-Rodríguez, S. A., Pérez-López, L. A., Waksman de Torres, N., & Álvarez-Román, R. (2019). Headspace–solid-phase microextraction gas chromatography method to quantify *Thymus vulgaris* essential oil in polymeric nanoparticles. *Pharmacognosy Magazine*, *15*(January), 473–478. <https://doi.org/10.4103/pm.pm>
- Marcet, I., Weng, S., Sáez-Orviz, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2018). Production and characterisation of biodegradable PLA nanoparticles loaded with thymol to improve its antimicrobial effect. *Journal of Food Engineering*, *239*, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.06.030>
- Mirdehghan, S. H., & Rahimi, S. (2016). Pre-harvest application of polyamines enhances antioxidants and table grape (*Vitis vinifera* L.) quality during postharvest period. *Food Chemistry*, *196*, 1040–1047. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.038>
- Nabavi, S. M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., & Nabavi, S. F. (2015). Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*, *173*, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.042>
- Nenadis, N., & Tsimidou, M. Z. (2017). DPPH (2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) radical scavenging mixed-mode colorimetric assay(s). In *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications* (pp. 141–164). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch8>
- Niu, B., Shao, P., Chen, H., & Sun, P. (2019). Structural and physiochemical characterization of novel hydrophobic packaging films based on pullulan derivatives for fruits preservation. *Carbohydrate Polymers*, *208*, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.070>
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 2161. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- Perdones, A., Escriche, I., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chemistry*, *197*, 979–986. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.054>
- Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P. P., & Dubey, N. K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*, *89*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.018>
- Rahman, M. M., Moniruzzaman, M., Ahmad, M. R., Sarker, B. C., & Khurshid Alam, M. (2016). Maturity stages affect the postharvest quality and shelf-life of fruits of strawberry genotypes growing in subtropical regions. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *15*(1), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.05.002>
- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. del M., Segura-Carretero, A., Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*, *32*(9), 1688–1706. <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>

- Satyal, P., Murray, B., McFeeters, R., & Setzer, W. (2016). Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*, 5(4), 70. <https://doi.org/10.3390/foods5040070>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Sivakumar, D., & Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Sotelo-Boyás, M. E., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., & Corona-Rangel, M. L. (2017a). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.022>
- Sotelo-Boyás, M., Correa-Pacheco, Z., Bautista-Baños, S., & Gómez y Gómez, Y. (2017b). Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.063>
- Sozer, N., & Kokini, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010>
- Thakre, A. D., Mulange, S. V., Kodgire, S. S., Zore, G. B., & Karuppaiyil, S. M. (2016). Effects of Cinnamaldehyde, ocimene, camphene, curcumin and farnesene on *Candida albicans*. *Advances in Microbiology*, 6(9), 627–643. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.69062>
- Trinetta, V., & Cutter, C. N. (2016). Pullulan: A suitable biopolymer for antimicrobial food packaging applications. In *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 385–397). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00030-9>
- Vicente, A. R., Saladié, M., Rose, J. K., & Labavitch, J. M. (2007). The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: Looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(8), 1435–1448. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2837>
- Vilaplana, R., Pazmiño, L., & Valencia-Chamorro, S. (2018). Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil. *Postharvest Biology and Technology*, 138, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.12.008>
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Wattanasatcha, A., Rengpipat, S., & Wanichwecharungruang, S. (2012). Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1–2), 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.017>
- Werdin González, J. O., Jesser, E. N., Yeguerman, C. A., Ferrero, A. A., & Fernández Band, B. (2017). Polymer nanoparticles containing essential oils: New options for mosquito control. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(20), 17006–17015. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9327-4>
- Zhang, Y., Yang, Y., Tang, K., Hu, X., & Zou, G. (2008). Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2), 891–897. <https://doi.org/10.1002/app.26402>

## CONCLUSIÓN GENERAL

En el marco de la búsqueda de alternativas para la disminución y el control de pérdidas postcosechas de frutas y hortalizas, en este estudio, se diseñaron nanoingredientes constituidos por un multisistema de recubrimiento con NC que contenían AEt. En un primer intento, las NC-AEt se combinaron con un RC de AL. El estudio de calidad postcosecha y vida útil demostró que las papayas que contenían el multisistema de recubrimiento AL-NC-AEt mantuvieron por más tiempo sus características de firmeza, AT y SST. En un segundo estudio, un multisistema de recubrimiento a base de pululano y NC-AEt- C fue aplicado a uvas y se observó que, después de 13 días de almacenamiento, los frutos mantuvieron sus características de color, firmeza, AT y SST, en comparación con los frutos no tratados. Además, ni las papayas ni las uvas tratadas con los multisistemas mostraron signos de daño microbiológico. Las propiedades fisicoquímicas de los componentes individuales de los multisistemas contribuyeron positivamente a retrasar la maduración de los frutos y protegerlos del daño de los microorganismos. En primer lugar, el recubrimiento actuó como una barrera que redujo el metabolismo de las frutas. En segundo lugar, los compuestos del AEt con actividad antimicrobiana (i.e. timol, carvacrol) evitaron el crecimiento de microorganismos, mientras que aquellos con actividad antioxidante pudieron reducir el estrés oxidativo causado por la postcosecha de los frutos. Y, en tercer lugar, debido a su tamaño (153.9 nm) y carácter multiparticulado, las NC-AEt se distribuyeron de manera más uniforme en las frutas y luego, gradualmente, liberaron componentes del AEt. Además, la estructura polimérica de las NC impidió la rápida evaporación del AEt, aumentando así su tiempo de residencia en la fruta. Por lo tanto, se concluye que la presencia del nanoingrediente en la superficie de la fruta fue efectiva para mantener la calidad postcosecha y extender su vida útil.

Los resultados de estos estudios demostraron el potencial de los multisistemas de recubrimiento NC-AEt-C y AL-NC-AEt como alternativa a los métodos tradicionales de conservación para aumentar la vida útil de productos hortofrutícolas, aprovechando las propiedades fisicoquímicas de cada componente individual del multisistema.


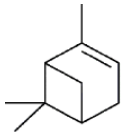
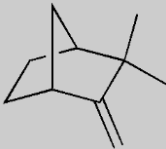
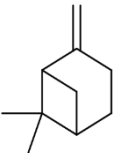
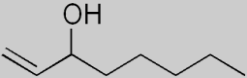
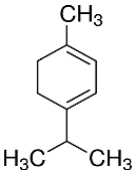
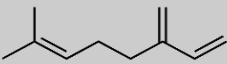
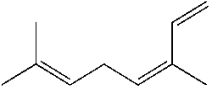
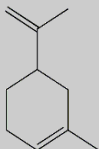





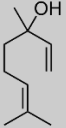
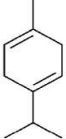
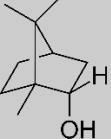
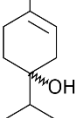
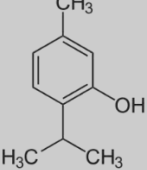
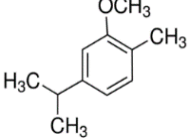
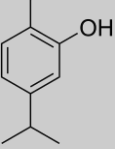
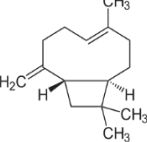
## PERSPECTIVAS

- Desarrollar nuevas formulaciones con polímeros de diferentes características para mejorar % EE de los componentes del AEt.
- Determinar perfil de liberación del AEt a partir de las NC y asociarlo a su velocidad de liberación y residencia en el fruto.
- Realizar ensayos de permanencia de NC poliméricas con AEt sobre superficie de frutos con el fin de determinar el tiempo total de residencia de los componentes en el fruto.
- Realizar caracterización exhaustiva del multisistema de recubrimiento por medio de Microscopía Electrónica de Barrido, Espectroscopía Raman y Difracción de Rayos X para dilucidar la interacción entre las NC y el RC.

**ANEXO I**

**ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES FÍSICAS DE  
LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL ACEITE  
ESENCIAL DE *Thymus vulgaris* L.**

COMPUESTO <sup>a</sup>	ESTRUCTURA QUÍMICA <sup>a</sup>	PESO MOLECULAR <sup>b</sup> (g/mol)	DENSIDAD <sup>c</sup> (g/mL a 25 °C)	PRESIÓN DE VAPOR <sup>c</sup> (mmHg a 25 °C)
<i>α-tujeno</i>		136.24	0.858	4.772
<i>α-pineno</i>		136.24	0.858	3.489
<i>Camfeno</i>		136.24	0.850	3.380
<i>β-pineno</i>		136.24	0.866	2.399
<i>1-octen-3-ol</i>		128.22	0.837	0.531
<i>α-terpineno</i>		136.24	0.837	1.638
<i>Mirceno</i>		136.24	0.791	2.290
<i>o-cimeno</i>		136.24	0.877	1.500
<i>Silvestreno</i>		136.24	0.848	1.894
<i>1,8-cineol</i>		154.25	0.921	1.900

<i>Camfor</i>		152.24	0.992	4.00
<i>cis-hidrato Sabineno</i>		154.25	0.844	0.075
<i>Linalol</i>		154.25	0.870	0.016
<i>γ-terpino</i>		136.23	0.850	1.075
<i>Borneol</i>		154.25	0.992	0.040
<i>Terpinen-4-ol</i>		154.25	0.934	0.048
<i>Timol</i>		150.22	0.965	0.038
<i>Carvacrol, metil éter</i>		164.25	0.936	0.192
<i>Carvacrol</i>		150.22	0.976	0.030
<i>E-Cariofileno</i>		204.36	0.901	0.013

<sup>a</sup> NCBI, 2018

<sup>b</sup> RSC, 2018

<sup>c</sup> TGSC, 2018

# **ANEXO II**

**ARTÍCULO PUBLICADO**

**(DOI: *10.1109/TNB.2019.2941931*)**

# Application of a Multisystem Coating Based on Polymeric Nanocapsules Containing Essential Oil of *Thymus Vulgaris* L. to Increase the Shelf Life of Table Grapes (*Vitis Vinifera* L.)

Andrés M. Piña-Barrera<sup>✉</sup>, Rocío Álvarez-Román<sup>✉</sup>, Juan G. Báez-González<sup>✉</sup>, Carlos A. Amaya-Guerra<sup>✉</sup>,  
 Catalina Rivas-Morales<sup>✉</sup>, Claudia T. Gallardo-Rivera<sup>✉</sup>, and Sergio A. Galindo-Rodríguez<sup>✉</sup>

**Abstract**—In developing countries, the incidence of postharvest losses reduces the quantity and quality of food for human consumption and causes an economical damage along the food chain, especially, for primary producers. In this study, a multisystem coating (NC-EOt-C) based on pullulan and polymeric nanocapsules containing EO of *Thymus vulgaris* L. (EOt) was applied to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.). The major components of EOt, chemically characterized by GC-MS, were *o*-cymene (32.68%), *thymol* (31.90%), and  $\gamma$ -*terpinene* (15.69%). The NC-EOt were prepared by nanoprecipitation and showed a particle mean size of 153.9 nm, a polydispersity index of 0.186, a zeta potential of  $-4.11$  mV, and an encapsulation efficiency of 52.81%. The antioxidant capacity (DPPH and ABTS<sup>+</sup> methods) of EOt was maintained, or even improved, after its incorporation into NC. The shelf life study showed that grapes having the NC-EOt-C multisystem maintained their characteristics of color, firmness, TA, and SSC for longer time than those without the multisystem. NC-EOt-C multisystem acted as a barrier which reduced the metabolism of fruits. In addition, the compounds of EOt with antimicrobial activity avoided microorganism growth, while those with antioxidant activity reduced the oxidative stress induced during postharvest of grapes. Additionally, the polymeric structure of NC prevented the rapid evaporation of volatile compounds of EOt, increasing then their residence time on the fruit. Our study demonstrated that NC-EOt-C multisystem can be a viable alternative to preserve horticultural products for longer storage periods.

**Index Terms**—Edible coatings, essential oils, food preservation, polymeric nanoparticles, and *Thymus vulgaris* L.

## I. INTRODUCTION

FRUITS are perishable products because of their inherent tendency to deteriorate. During the postharvest period of fruit, it is necessary to guarantee a longer useful life of the vegetable. Reports from the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) mention that, in developing countries, there is a great deficiency in marketing infrastructure, therefore, postharvest losses of fresh products reach up to 50% of total production [1]. Losses of this magnitude trigger a considerable economic damage for food productive chain, especially, for primary producers. In addition, the presence of pests represents a serious health risk for the consumer. FAO, in collaboration with the Latin American Integration Association (ALADI) and the Economic Commission for Latin America and the Caribbean (ECLAC), prepared the Food Losses and Waste Plan (FLW) which promotes the development of innovative technologies that contribute to reduce food loss at all stages of the food production chain [2]. In recent years, different alternatives have been proposed in order to preserve the horticultural products, including the use of protective coatings. An edible coating is a thin layer of edible material formed as a coating on a food product. Using coatings modifies the interaction of the fruit with the environment due to their physicochemical properties, prolonging the shelf life of the treated fruits [3]. Different coating-forming compounds have been used, including chitosan, alginate, starch, and pullulan [4]–[7].

Pullulan is a polysaccharide produced by *Aureobasidium pullulans*; it can form edible coatings with several advantages over other polysaccharides. Concerning its properties, it has limited permeability to oxygen and carbon dioxide, has good adhesive properties, is colorless, and has no flavor [8]–[10]. The pullulan coating can influence on the physiology of fruit since it acts as a barrier between the environment and fruit. The protective effect of this coating can also be improved

Manuscript received December 31, 2018; revised June 18, 2019 and June 26, 2019; accepted June 26, 2019. This work was supported by UANL-PAICYT 2019, Mexico. The work of A. M. Piña-Barrera was supported by CONACYT Scholarship, Mexico, under Grant 273928. (Corresponding author: Sergio A. Galindo-Rodríguez.)

A. M. Piña-Barrera, C. Rivas-Morales, and S. A. Galindo-Rodríguez are with the Laboratorio de Nanotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza 66455, Mexico (e-mail: sagrod@yahoo.com.mx).

R. Álvarez-Román is with the Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey 64460, Mexico.

J. G. Báez-González, C. A. Amaya-Guerra, and C. T. Gallardo-Rivera are with the Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, 66455, Mexico.

Digital Object Identifier 10.1109/TNB.2019.2941931

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 License. For more information, see <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



by adding compounds that exhibit some biological activity, such as essential oils (EO). Due to their antioxidant and antimicrobial activities, EO have emerged as an important and innovative alternative for the control and reduction of postharvest losses [11]. In fact, the antimicrobial properties of EO have been used to control fungi and phytopathogenic bacteria [12]. In particular, the EO obtained from the *Thymus vulgaris* L. (EOT) plant have been widely used as additives in food, pharmaceutical and cosmetics. For example, in the alternative medicine, EOT have been useful for their antiseptic, carminative, expectorant, antimicrobial and antioxidative effects [13]–[16]. On the other hand, in the food industry, EOT and their constituents, are used as flavoring agents, aroma additives, antioxidants and preservatives. In addition, FDA has classified EOT as GRAS (Generally Recognized As Safe) [17], [18].

In general, the application of EO as additives is often troublesome because they can be deteriorated by environmental factors, such as light and oxygen, and are prone to evaporation [19]. In addition, EO have low solubility in water, which makes difficult to incorporate them into commercial products [20]. To overcome these effects, nanoencapsulation of EO in polymeric nanoparticles has become an interesting alternative. Nanoencapsulation is a process in which the active ingredient (e.g. essential oils, extract plants, drugs, vitamins) is surrounded by a coating wall of polymer to form nanocapsules or is embedded in a polymeric matrix to form nanospheres. Therefore, besides protecting the encapsulated EO against harsh environments, nanoencapsulation can offer a controlled release and improves the handling of the EO [21]–[23]. For example, nanoparticles of *Lippia sidoides* EO were prepared via spray-drying using biopolymer blends of alginate/cashew gum. Formulations of nanoparticles exhibited different release profiles of *Lippia sidoides* EO dependent on the alginate/cashew gum ratio. The most significant *in vitro* release profile showed that between 45 and 95% of oil was released within 30–50 h [24]. In another study, eugenol, a volatile constituent of EO, was nanoencapsulated by an emulsion–diffusion method. The study of oxidation stability revealed that eugenol loaded polycaprolactone nanoparticles were effective to protect eugenol from light oxidation, enhancing then its stability. The protective effect was attributed to the polymer wall that was surrounding the eugenol core [25]. Finally, nanocapsules (NC) containing lemongrass EO were prepared using polylactic acid as polymer. This formulation was more efficient in inhibiting bacteria growth than non-encapsulated EO. In addition, a biofilm formation assay demonstrated that lemongrass EO nanocapsules reduced the ability of microorganisms to develop biofilms. This could be explained by a more efficient delivery of the active compounds of EO from nanocapsules [26].

In order to introduce a novel strategy to prevent quality and quantity losses in postharvest storage of horticultural products, in this work, a multisystem coating based on pullulan and polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. (NC-EOT-C) was evaluated to increase the shelf life of the table grapes (*Vitis vinifera* L.).

## II. METHODOLOGY

### A. Plant Collection and Identification

Fresh stems and leaves of the *Thymus vulgaris* L. plants were purchased from the local market in Monterrey, México in June 2016. The plants were identified with the number 010970 and deposited at the herbarium of the School of Biological Sciences of the Autonomous University of Nuevo León, Monterrey, México.

### B. Essential Oil Extraction

The EOT was obtained by hydrodistillation [27]. Briefly, fresh-cut plant was hydrodistilled using a Clevenger-type apparatus (100 g·L<sup>-1</sup> water) for 4 h. The oil was collected and kept at 4 °C until use. The yield of EOT was calculated by using (1):

$$Yield = (EOT/F.plant) \times 100 \quad (1)$$

where *EOT* are the grams of obtained oil and *F. plant* is the total weight, in grams, of fresh *Thymus vulgaris* L.

### C. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and GC With Flame Ionization Detection (GC-FID) Analysis

The composition of volatile constituents of EOT was analyzed using a gas chromatograph 6890N (Agilent Technologies, USA) equipped with a 5973 INERT mass selective spectrometer (ionization energy 70 eV) and a HP-5MS capillary column (5% phenylmethylpolysiloxane, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, Agilent J and W). The ionization-source temperature was 230 °C, the quadrupole temperature was 150 °C and the injector temperature was 220 °C. Data acquisition was performed in the scan mode. The oven temperature was programmed as follows: 35 °C for 9 min, increased to 150 °C at 3 °C·min<sup>-1</sup> and held for 10 min, increased to 250 °C at 10 °C·min<sup>-1</sup>, and increased to 270 °C at 3 °C·min<sup>-1</sup> and held for 10 min. The flow rate of the helium carrier gas (99.999% purity) was 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. EOT components were identified by comparing retention indices relative to C8-C20 n-alkanes (Sigma-Aldrich), and MS were compared with the mass spectra from the US National Institute of Standards and Technology (NIST) library and reference data [28]. To determine the proportion of each component, a quantitative analysis was performed with a GC-FID (Autosystem XL, Perkin Elmer, USA) using the same HP-5MS column. The injector temperature was 270 °C, the oven temperature program was same as the GC-MS analysis. The percentage composition of EOT was calculated using the peak normalization method.

### D. Formulation of the Multisystem Coating Based on Polymeric Nanocapsules Containing *Thymus Vulgaris* L. Essential Oil (NC-EOT-C)

The NC were prepared by the nanoprecipitation method as described by Lugo-Estrada *et al.* [29]. Briefly, an organic phase (5 mL) composed of a mixture of acetone:isopropanol (1:1),

Eudragit L 100-55 (60 mg), and EOt (90 mg) was prepared. This was injected into an aqueous phase (10 mL) containing 0.5% (w/w) of poly(vinyl alcohol) (Mowiol 4-88 with a MW 26,000 and a hydrolysis degree of 88%) under magnetic stirring. Diffusion of the organic phase into the aqueous phase induced the aggregation of polymer and encapsulation of EOt into nanocapsules (NC-EOt). The solvent was then evaporated under reduced pressure (Laborota 4003 control, Heidolph Instruments, GER). Unloaded NC (NC-BCO), without EOt, were obtained following the same procedure described above.

The physicochemical characterization of the formulations was determined in an aqueous suspension of NC-EOt. The mean particle size, and polydispersity index (PI) were measured at 90 degree scattering angle using Dynamic Light Scattering, while the zeta potential measurement was by Laser Doppler Microelectrophoresis (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, UK).

For the formation of the multisystem coating, pullulan was used as film-coating. Pullulan powder was incorporated into an aqueous suspension of NC-EOt under magnetic stirring. The final concentration of pullulan was of 1.5% (w/v). On the other hand, an emulsion of EOt (700  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) in 3% (w/v) Tween 80<sup>®</sup> was prepared at 11000 rpm (Homogeniser VDI 12, VWR, USA) to be used as a control.

#### E. Analysis of Nanocapsules by GC-FID

The NC-EOt were centrifuged at 25,000 rpm for 2 h (Allegra 64R centrifuge, Beckman Coulter, USA), and then the pellet was dissolved in methanol (Tedia). The quantitative analysis of *o*-cymene, thymol, and  $\gamma$ -terpinene in NC-EOt was performed with a GC-FID (Clarus 480, PerkinElmer, USA) using a capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ) (Elite-5, PerkinElmer, USA). The injector and detector temperatures were 280 °C and 260 °C, respectively. The oven temperature was programmed as follows: 70 °C for 1 min, increased to 116 °C at 4 °C  $\cdot$  min<sup>-1</sup> and held for 1 min, increased to 200 °C at 20 °C  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, and increased to 230 °C at 14 °C  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. The flow rate of the helium carrier gas (99.999% purity) was 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. This temperature program was used during the validation of the method. *o*-cymene, thymol, and  $\gamma$ -terpinene were selected as test compounds because they were the main components of the EOt. Subsequently, encapsulation efficiency percentage (EE%) was calculated by using (2):

$$EE\% = (C_e/C_t) \times 100 \quad (2)$$

where  $C_e$  is the amount of a component in the NC-EOt (mg), and  $C_t$  is the amount of the component in the total EOt (mg) used in organic phase.

#### F. Antioxidant Activity

The radical scavenging activities of NC-EOt and non-encapsulated EOt were first determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich) method [13]. Briefly, solutions of NC-EOt, EOt and carvacrol (positive control) were prepared in methanol (Tedia) at a concentration of 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . A volume of 1 mL of each solution was

mixed with 1 mL of freshly prepared DPPH methanol solution (80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). These systems were left at room temperature in the dark for 30 min. Absorbances of these solutions were measured at 517 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, USA). On the other hand, the ABTS<sup>+</sup> method [27] is based on the reduction of the green ABTS<sup>+</sup> radical cation. A volume of 25  $\mu\text{L}$  of each solution (NC-EOt, EOt or carvacrol, at a concentration of 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) was added to 1 mL of ABTS<sup>+</sup> methanol solution (7 mM). After 7 min, absorbances were measured at 734 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, USA). In both cases, the percentage inhibition of free radical (I%) was calculated by using (3):

$$I\% = [(ABS_o - ABS_{sample})/ABS_o] \times 100 \quad (3)$$

where  $ABS_o$  is the absorbance of the radical (DPPH or ABTS<sup>+</sup>) in methanol and  $ABS_{sample}$  is the absorbance of the sample with the radical.

#### G. Effect of NC-EOt-C Multisystem on Postharvest Quality and Shelf Life of Grapes Fruits (*Vitis Vinifera* L.)

Grapes with homogeneous characteristics of color, size, and without mechanical damage were selected. They were washed with distilled water and dried. Fruits were distributed in four groups. The first group was used as a control (without treatment), while the second one was immersed for 1 min in the EOt emulsion (700  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Then, the third group was immersed in an aqueous dispersion of pullulan (1.5%, w/v), which contained NC-BCO (NC-BCO-C). Finally, the fourth group was immersed for 1 min in an aqueous dispersion containing the components of the multisystem, the pullulan and NC-EOt (NC-EOt-C); EOt was at the same concentration of EOt group. All groups were maintained at 25 °C for 13 days.

Titratable acidity (TA) was determined by titration of grape juice using 0.1 N NaOH solution until the end of titration (pH = 8.2). It was expressed as grams of tartaric acid per 100 mL.

The total soluble solid content (SSC) of grape juice was obtained by refractometry (Abbemat 200, AntonPaar, AUT).

The color values (CIE L\*a\*a\* and b\*) of grapes were determined by using a colorimeter (ColorFlex EZ, HunterLab, USA). The firmness of grapes was measured by using a texture analyser (CT3 Texture Analyzer, Brookfield-Ametek, USA), which was equipped with a cylindrical probe having 4 mm diameter.

The firmness was expressed in Newton (N). All parameters were determined at the beginning and at the end of the shelf life study.

In another evaluation, the presence of microbiological damage on the fruits stored at 4 °C was monitored for 6 months.

### III. RESULTS AND DISCUSSION

#### A. Chemical Characterization of *Thymus Vulgaris* L. Essential Oil

EOt had a yield of 0.378  $\pm$  0.159% fresh weight. Chemical analysis of the EOt by GC-MS led to identification of 20 compounds (Table I). As is shown in Fig. 1, the major components



TABLE I  
CHEMICAL COMPOSITION OF *Thymus Vulgaris* L. ESSENTIAL OIL BY  
GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (GC-MS)

No. <sup>a</sup>	t <sub>r</sub> <sup>b</sup> (min)	Area (%)	Compound
1	13.79	0.78	<i>α</i> -thujene
2	13.93	0.95	<i>α</i> -pinene
3	14.75	1.55	Camphene
4	16.76	0.40	<i>β</i> -pinene
5	17.81	0.40	1-octen-3-ol
6	18.03	1.52	Myrcene
7	19.35	1.03	<i>α</i> -terpinene
8	20.26	32.68	<i>o</i> -cymene
9	20.36	0.75	Sylvestrene
10	20.59	0.58	1,8-sineole
11	22.35	15.69	<i>γ</i> -terpinene
12	22.68	0.47	<i>cis</i> -sabinene hydrate
13	24.78	3.54	Linalool
14	26.78	1.25	Camphor
15	28.06	2.75	Borneol
16	28.70	0.75	Terpinen-4-ol
17	32.16	0.98	Carvacrol methyl ether
18	35.44	31.90	Thymol
19	35.58	1.16	Carvacrol
20	40.14	0.88	<i>E</i> -caryophyllene

<sup>a</sup> Elution order.

<sup>b</sup> Retention time.

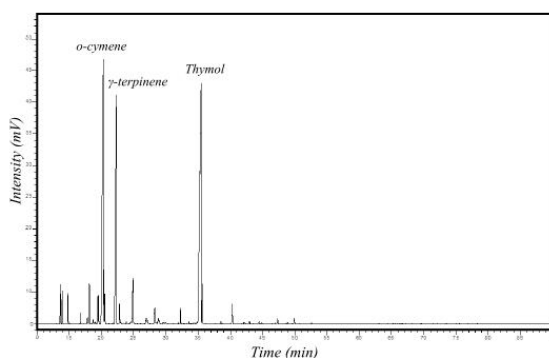


Fig. 1. Chromatogram by gas chromatography with a flame ionization detector of *Thymus vulgaris* L. essential oil.

were *o*-cymene (32.68%), thymol (31.90%), and *γ*-terpinene (15.69%). In general, the EOt was composed of 56.69% of aliphatic terpenes and 43.31% of oxygenated terpenes. Guerra-Boone *et al.* [28] found the same components in EOt, but with different percentages, 62.6% of aliphatic terpenes and 35.6% oxygenated terpenes.

Results of chemical characterization of EOt by GC-MS were also similar to those reported by Satyal *et al.* [30], who found that the main components were thymol (23-60%), *γ*-terpinene (18-50%), *p*-cymene (8-44%), carvacrol (2-8%), and linalool (3-4%); percentages of these components may vary depending on harvest season and habitat of plant, as well as the extraction method of EO [13].

Several studies are focused on showing the antimicrobial and antioxidant activities of EOt [15], [31]. Some authors

TABLE II  
PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE FORMULATION OF  
NANOPARTICLES LOADED WITH *Thymus Vulgaris* L. ESSENTIAL OIL

Mean size (nm)	pI <sup>1</sup>	Zeta potential (mV)	EE% <sup>2</sup>
153.9 ± 4.7	0.186 ± 0.011	-4.11 ± 0.170	52.81 ± 2.69

<sup>1</sup> Polydispersity index which ranges from 0 to 1, a higher value corresponds to less homogeneous NC size distribution.

<sup>2</sup> Encapsulation efficiency percentage. (n=3;  $\bar{x} \pm DS$ ).

have suggested that the antimicrobial effects of EO could mainly be attributed to their major constituents. Regarding our study, it has been reported thymol to be active against a broad spectrum of microorganisms, including phytopathogen [14], [17], [32], [33]. Furthermore, *o*-cymene, and *γ*-terpinene have also shown antimicrobial activity [15], [34], [35]. However, there is not much information about the application of these two compounds for fruit conservation.

In general, fruits are products that easily deteriorate due to different types of microorganisms. Particularly, grapes of *Vitis vinefera* L. are susceptible to fungal decomposition by the genus *Aspergillus*, and more importantly, by the *Botrytis cinerea* species [36], [37]. In our study, it was important to found that the major compounds of EOt (i.e. thymol and carvacrol) had previously demonstrated relevant antifungal activities.

### B. Physicochemical Characterization of NC-EOt

EOt has a great potential as a natural preservative of fruits and vegetables, mainly due to the biological activities reported for many of its components. In fact, EOt is included in the GRAS list of the FDA [38]. However, its use and application have some limitations as a food additive because it has low solubility in water, and it is susceptible to degradation by environmental factors (e.g. oxygen and UV radiations) [22].

Using the nanoprecipitation technique, EOt was nanoencapsulated into a polymeric structure to protect it from such natural agents [39]. The formation of NC by the nanoprecipitation technique is explained in terms of an interfacial turbulence. This occurs when an organic phase containing polymer, EOt, and an organic solvent miscible in water diffuses into an aqueous phase under slight magnetic stirring [40]. This technique has been successfully used for the nanoencapsulation of natural products, such as EO [41], [42]. In the present study, polymeric nanoparticles containing EOt (NC-EOt) were obtained with the physicochemical characteristics showed in Table II.

Formulation of NC-EOt showed a mean size of 153.9 ± 4.7 nm. When compared to non-encapsulated EOt, its incorporation into NC can offer several advantages for its application as preservative of fruit. First, due to their size and multiparticulate character, EOt-loaded nanoparticles can be more uniformly distributed on the fruits and then, they can gradually release EOt for covering all fruit surface [43], [44].

Particularly, the size next to 150 nm offers advantages in comparison with large particles (e.g. microparticles). As particle size smaller, their surface area to volume ratio gets larger. Then, it is possible to have more surface of the NC directly in contact with the fruit surface, allowing a local delivery of the EOt, specially where the microorganism are preferably found [23]. Secondly, polymer wall of NC allows retaining the EOt inside the structure, thus reducing its evaporation rate.

The mean size of NC-EOt was similar to that reported by El Asbahani *et al.* [45] who obtained NC (110-150 nm) with EO from two species of *Thymus* genus. Additionally, they found similar antimicrobial activities of nanoencapsulated and non-nanoencapsulated EO against bacteria (i.e. *E. Coli*, *Klebsella Pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomons aeruginosa*, and *Salmonella typhimurium*), yeast (i.e. *Candida albicans* and *Candida glabrata*) and fungi (i.e. *Aspergillus niger* and *Penicillium funiculosum*). In another study, Granata *et al.* [23] prepared nanoparticles of *Thymus capitatus* EO and *Origanum vulgare* EO with mean sizes of  $175 \pm 1.0$  and  $171 \pm 2.0$  nm, respectively. In addition, an improvement in the antimicrobial activity of EO-loaded nanoparticles was reported, showing a greater activity against foodborne pathogens compared with non-nanoencapsulated EO.

On the other hand, the PI is a parameter associated to homogeneity of the NC dispersion. For Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments) PI, values range from 0 to 1; a value lower than 0.200 indicates a homogeneous nanoparticle size distribution [40]. For this study, the PI value of NC-EOt formulation corresponded to  $0.186 \pm 0.011$ , indicating high nanoparticle homogeneity which would allow that the individual interactions of NC (e.g. bioadhesion, EOt release) to be also homogeneous on fruit surface.

Electrokinetic properties of NC-EOt were also considering in this study. The zeta potential is the electrostatic potential at the boundary dividing the compact layer and the diffuse layer of the colloidal particles. Zeta potential value for NC-EOt corresponded to  $-4.11$  mV. The negative sign indicates that negative charges are dominant at the surface of NC and it can be attributed to Eudragit L 100-55, which is an anionic copolymer based on methacrylic acid and ethyl acrylate. Thus, during NC-EOt formation, the polymer chains surrounded the oily core to form the polymer wall and their anionic functional groups were exposed to the external aqueous media. This negative charge is important because it could facilitate the interaction of NC-EOt with the membrane of phytopathogenic microorganisms (e.g. *Botrytis cinerea* species), which would ensure that the delivery of the EOt compounds could be directly from the NC to the bacteria cells, increasing thus their antimicrobial effectiveness [46].

In order to complete the physicochemical characterization of NC-EOt, the EOt entrapped in NC was quantified by GC-FID and the EE% was calculated by using (2). The EE% was determined considering only the three major components of EOt and it corresponded to  $52.81 \pm 2.69\%$  (Table II) for *o*-cymene,  $\gamma$ -terpinene, and thymol. These results are consistent with those of Marcet *et al.* [47], who obtained thymol-loaded PLA NC with a mean size next to 260 nm

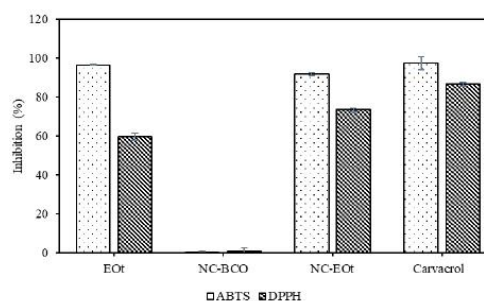


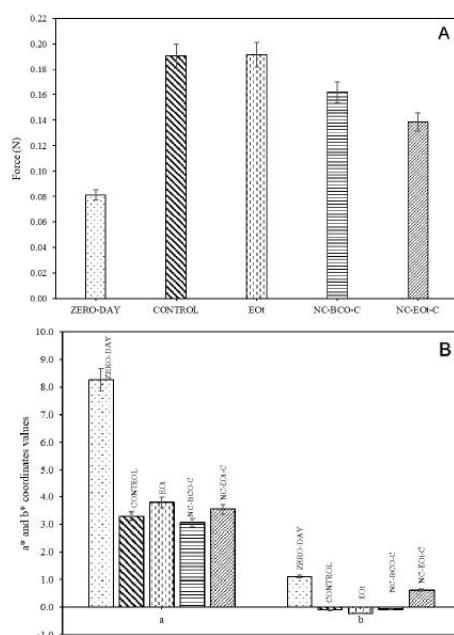
Fig. 2. Radical scavenging activity of *Thymus vulgaris* L essential oil (EOt), nanocapsules without EOt (NC-BCO), nanocapsules with EOt (NC-EOt), and standard (carvacrol) at  $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  by the DPPH and ABTS<sup>+</sup> methods. ( $n = 3$ ;  $\bar{X} \pm DS$ ).

and an EE of  $60.3 \pm 8\%$ . In addition, they demonstrated that thymol-loaded PLA NC had improved antimicrobial properties in comparison with the non-encapsulated thymol. In another study, Sotelo-Boyás *et al.* [42] prepared two types of chitosan based nanoparticles loaded with EOt. Particularly, the EE% of thymol was of 68% for EOt-loaded chitosan nanospheres, whereas it was of 72% for EOt-loaded chitosan NC. In our study, GC-FID analysis revealed the presence of thymol into EOt-NC, which was relevant because several studies have reported that the antimicrobial and antioxidant activities of EOt were due partially to this compound. Thus, considering that more than 50% of the EOt added during the preparation of the NC was encapsulated, it is possible that its major compounds (i.e. thymol) could be gradually released from NC to the fruit surface.

Now, concerning the antioxidant properties of NC-EOt, we observed that the antioxidant capacity of EOt was maintained, or even improved, after its incorporation into NC. First, as is shown in Fig. 2, the radical scavenging activity were similar for NC-EOt ( $91.86 \pm 0.79\%$ ) and for EOt ( $96.66 \pm 0.26\%$ ) by using the ABTS<sup>+</sup> assay. Nevertheless, the radical scavenging activity was slightly higher for NC-EOt ( $73.50 \pm 0.76\%$ ) than for non-encapsulated EOt ( $59.62 \pm 1.77\%$ ) by the DPPH method. The NC-BCO, it means nanoparticles without EOt, showed no antioxidant activity by any radical scavenging assay. Some authors have proposed that a good interaction between radical DPPH and the polymeric wall of NC can promote the radical scavenging activity for the encapsulated compounds [48], [49].

For instance, Zhang *et al.* [50] reported that the antioxidant activity of quercetin was maintained when it was incorporated into chitosan nanoparticles. This was attributed to the complexes formed between the polymeric network of nanoparticles and quercetin, which allowed to retain and protect the quercetin molecules. Likewise, Kumar *et al.* [51] determined the antioxidant capacity of naringenin-loaded chitosan nanoparticles, a flavonoid with an anti-inflammatory activity. They found that the ability to scavenge DPPH free radicals was significantly higher (84%) for nanoencapsulated naringenin than for free naringenin (~65%). It was relevant to verify that the antioxidant activity of EOt was maintained after





**Fig. 3.** Firmness (A) and color (B) of grapes after storage at 25 °C for 13 days. Bars correspond to the initial measurement (zero day) as well as groups of grapes without treatment (control), with EOT emulsion (EOT), with nanocapsules without EOT (NC-BCO-C), and with the multisystem coating (NC-EOT-C). (n = 10;  $\bar{X} \pm DS$ ).

its nanoencapsulation because it had been established, as a hypothesis, that the oxidative stress induced during postharvest of grapes would be delayed or avoided for the NC-EOT.

So, considering all these aspects, the antimicrobial activity previously reported for EOT, the antioxidant activity tested for EOT as well as the advantages of its incorporation into NC, we established that the NCS-EOT formulation had adequate characteristics to be a part of the multisystem coating intended for fruit conservation.

### C. Effect of NC-EOT-C Multisystem on Postharvest Quality and Shelf Life of Grape Fruits

Fruit firmness is an important quality attribute. The firmness (Fig. 3A) of the grapes was  $0.082 \pm 0.030$  N at the beginning of the experiment. This parameter increased for all groups of grapes after 13 days of storage. The water loss is related to an increase of firmness of grapes because it induces a turgor loss of the mesocarp cells, making the exocarp (skin) a more flexible structure [52]. Considering our results, the control ( $0.19 \pm 0.051$  N) and non-encapsulated EOT ( $0.19 \pm 0.037$  N) groups showed the highest values of firmness while the NC-BCO-C ( $0.16 \pm 0.043$  N) and NC-EOT-C multisystem ( $0.14 \pm 0.022$  N) had the lowest ones. In this case, the pullulan coating acted as a barrier, avoiding loss of water from grapes. Similar results were obtained by Kraśniewska *et al* [10], who reported that a pullulan coating protected the blueberry fruits from loss of firmness, when they were stored at  $4 \pm 1$  °C for 28 days and

at  $16 \pm 2$  °C for 14 days. Authors mentioned that the pullulan coating avoided the excessive transpiration of fruits. On the other hand, the NC-EOT-C multisystem group had a lower firmness value than that of NC-BCO-C group. Considering that breaking down of complex carbohydrate polymers (e.g. pectin) by enzymes led to loosening of cell walls and softening of fruit [53], the constituents of EOT released from NC could have interfered with enzymatic activity, delaying then the softening effect.

Furthermore, color changes were determined by the CIE L a\* b\* color scale, where a\* is the red/green coordinate (+a\* indicates redder and -a\* indicates greener), while b\* is the yellow/blue coordinate (+b\* indicates yellower and -b\* indicates bluer). As is shown in Fig. 3B, all treatments (i.e. EOT, NC-BCO-C, and NC-EOT-C) and control grapes showed a\* values less positives (~3) than that measured at the beginning of the shelf life study ( $8.27 \pm 2.6$ ). When values of a\* are positive and close to zero, this indicates an anthocyanin accumulation in grapes, which is related to ripening of fruits [54]. Values of b\* coordinate also decreased for all treatments compared to the b\* initial value, although they had minor differences. Changes of color were due to enzymatic and chemical changes during ripening [55]. In particular, the contents of anthocyanins and acylated anthocyanins change during ripening and are responsible of the color of grape peel [56], which can range from light red to dark blue and almost black. Concerning fruits treated with the NC-EOT-C multisystem, values of a\* and b\* were slightly higher than those for fruits without treatment (control grapes), showing that red color of fruits was not altered by the NC-EOT-C multisystem during ripening.

Similar results were obtained by Lemes *et al.* [7] who reported that a coating based on gelatin hydrogel added with curcumin-loaded nanoparticles maintained the color of *Benitaka* grapes after storage of 7 days at 25 °C. Particularly for b\* coordinate, there was a significant difference between the NC-EOT-C multisystem ( $0.614 \pm 0.7$ ) and EOT ( $-0.221 \pm 0.9$ ). This could be due to a rapid evaporation of molecules of non-encapsulated EOT, which avoided that their components could delayed the fruit ripening. The incorporation of EOT into the NC could have prolonged the interaction of EOT components on fruit surface.

The SSC of the grapes tends to increase during ripening. The SSC (Fig. 4A) of the grapes was  $18.60 \pm 0.042$  °Brix at the beginning of the experiment. This parameter increased for control grapes ( $21.49 \pm 0.036$  °Brix) as well as grapes tested with EOT ( $21.76 \pm 0.116$  °Brix), NC-BCO-C ( $20.66 \pm 0.181$  °Brix) and the NC-EOT-C multisystem ( $19.05 \pm 0.274$  °Brix) after 13 days of storage. The increase of SSC during storage are due to respiration, the inversion of insoluble compounds to soluble forms and the moisture loss by evaporation [57]. In addition, metabolic activity continues as a result of fruit ripening, which leads to converting carbohydrates and organic acids into sugars to be used in several metabolic processes [58]. In our study, the increase of SSC in grapes with treatments and control grapes was due to conversion of sucrose into glucose and fructose [59].

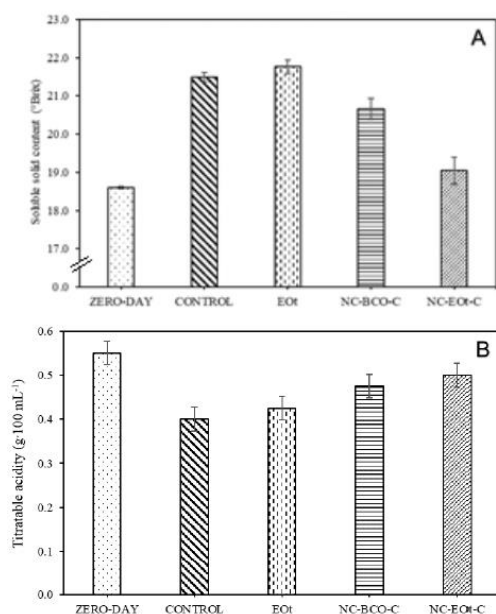


Fig. 4. Total soluble solid content (A) and titratable acidity (B) of grapes after storage at 25 °C for 13 days. Bars correspond to the initial measurement (zero day) as well as groups of grapes without treatment (control), with EOT emulsion (EOT), with nanocapsules without EOT (NC-BCO-C), and with the multisystem coating (NC-EOT-C). ( $n = 3$ ;  $\bar{X} \pm DS$ ).

Now, comparing with control grape, the NC-BCO-C and the NC-EOT-C multisystem showed lower values of SSC. This behavior could be attributed to the pullulan coating present in both multisystem, which helped to reduce the respiration of the grapes, delaying their ripening [60]. Similar results were reported by Diab *et al.* [8], who reported that Strawberry treated with a pullulan coating maintained the SSC values lower than the uncovered fruits after 12 days of storage at 20 °C. They attribute this result to the beneficial effects of the pullulan coatings to decrease the respiration rate of the fruits.

A significant difference of SSC was observed between the NC-EOT-C multisystem ( $19.05 \pm 0.274$  °Brix) and the EOT ( $21.49 \pm 0.036$  °Brix). In fact, the EOT had 2.71 more °Brix than the NC-EOT-C multisystem. This could be due to the short residence of the EOT on the fruit surface because of its rapid evaporation when it was not nanoencapsulated. This limited its protective effect to delay the ripening of grapes. In contrast, besides to barrier properties of the NC-EOT-C multisystem, the sustained release of EOT from NC-EOT could have extended the antioxidant activity of EOT on fruit surface, which contributed to have a better conservation of grapes.

Moreover, as is shown in Fig. 4B, the TA of the grapes was  $0.555 \pm 0.086$  g · 100 mL<sup>-1</sup> at the beginning of the experiment and decreased slightly during storage for all groups. After 13 days of storage, the TA values were  $0.400 \pm 0.042$ ,  $0.425 \pm 0.045$ ,  $0.475 \pm 0.043$ , and  $0.500 \pm 0.044$  g · 100 mL<sup>-1</sup> for control grapes, EOT, the NC-BCO-C, and the NC-EOT-C multisystem, respectively. This reduction of



Fig. 5. Evaluation of antimicrobial protection of grapes after storage at 4 °C for 6 months. Image correspond to the grapes without treatment (control, A), with EOT emulsion (EOT, B), with nanocapsules without EOT (NC-BCO-C, C), and with the multisystem coating (NC-EOT-C, D).

TA values is associated to the metabolism of organic acids in grapes. Next to sugars, organic acids are the most abundant solids present in grapes. They are responsible of fruit acidity which is expressed as TA. The main organic acids found in grapes are tartaric, malic and to a small extent, citric. During the ripening of grapes, the amount of malate/citrate decreases, and this means that organic acids are being metabolized. The possible fates for these compounds are the Krebs cycle (respiration), gluconeogenesis, amino acid synthesis, production of ethanol by fermentation and synthesis of secondary metabolites (e.g. pigments) [61], [62].

Concerning the groups of grapes with treatments, results of TA had the same trend that those obtained for SSC. After 13 days of storage, control grapes had the most significant decrease of TA, while the NC-EOT-C multisystem the lowest decrease of TA.

It means that the NC-EOT-C multisystem was the most effective treatment to delay the grape ripening, which can be attributed to a double effect. First, the pullulan coating acted as a barrier and decreased the respiration rate (metabolism) of grape. Second, the NC-EOT prolonged the residence of EOT on the surface of the fruit, which led to improve its antioxidant activity. These results are consistent with those obtained by Melo *et al.* [54] who reported that, after 12 days of storage, grape fruits coated with gel and chitosan nanoparticles had lower SSC values as well as few changes in the TA content than uncoated fruits. They also attributed that trend to a slowdown in the metabolic activity of the fruit caused by the coating gel and the chitosan nanoparticles.

Finally, control grapes and groups of grapes with treatments (i.e. EOT, NC-BCO-C, and NC-EOT-C multisystem) were stored for 6 months in order to observe the presence or absence of macroscopic damage caused by microorganisms. With exception of grapes treated with the NC-EOT-C multisystem, all groups of grapes showed damage caused by microorganisms, probably, fungi (Fig. 5A, B, and C). Various kinds of growth patterns were observed on the infected grapes. Mycelia displayed powdery, cottony, and radial characteristics. Colonies were varied, from white and dirty white in color to grayish and orange; some of these characteristics could



correspond to the disease called “gray mold” caused by *B. cinerea*.

The grapes fruits having the NC-EOT-C multisystem showed no macroscopic damage (Fig. 5D). This protection can be due to EOT components with antimicrobial activity [23], [63]. Particularly, thymol and carvacrol were identified in the EOT by the gas chromatography analysis (Table I). It has been suggested that EO alter the surface and structure of fungal cell wall reducing the cell wall synthesis [5].

In addition, EOT compounds are able to interact with outer cell membrane, increasing fluidity and permeability, and to cause structural and functional damages to cytoplasmic membrane of the microorganism [23]. On the other hand, the incorporation of EOT into NC provided advantages, including its sustained release and an increase of its residence time on the surface of the grape, which favored the interaction of EOT compounds with microorganisms that cause damage to the fruit. These advantages of the NC have been also observed in other areas such as medicine, pharmacology, and agriculture [64], [65]. These results demonstrated the functionality of the NC-EOT-C multisystem as an effective preservative for the fruit of *Vitis vinifera* L. grapes.

#### IV. CONCLUSION

In this study, a multisystem coating based on pullulan and polymeric NC containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. (NC-EOT-C) was applied to increase the shelf life of the table grape (*Vitis vinifera* L.). The results demonstrated the potential of the NC-EOT-C multisystem as an alternative to traditional methods of fruit preservation. The shelf life study showed that grapes having the NC-EOT-C multisystem maintained their characteristics such as color, firmness, TA, and SSC for longer time than those without the multisystem. Additionally, grapes with the NC-EOT-C multisystem did not show signs of microbiological damage. The physicochemical properties of the multisystem components contributed positively to delay the ripening of grapes and protect them from the damage of microorganisms. First, the pullulan coating acted as a barrier which reduced the transpiration and the respiration rate (metabolism) of fruits. Second, the compounds of EOT with antimicrobial activity avoided microorganism growth, while those with antioxidant activity reduced the oxidative stress induced during postharvest of grapes. In particular, due to their size and multiparticulate character, EOT-loaded nanoparticles were more uniformly distributed on the fruits and then, they gradually released EOT for covering all fruit surface; in addition, polymeric structure of NC prevented the rapid evaporation of volatile compounds of EOT, increasing then their residence time on fruit. Based on these results, we can conclude that the presence of the NC-EOT-C multisystem on the surface of the grape was effective to maintain the postharvest quality and to extend the shelf life of grapes. This kind of multisystem can be a viable alternative to preserve horticultural products for longer periods.

#### REFERENCES

- [1] *Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention*, FAO, Roma, Italy, 2011.
- [2] *Food Losses and Waste in Latin America and the Caribbean*, FAO, Roma, Italy, Apr. 2015.
- [3] K. S. Eça, T. Sartori, and F. C. Menegalli, “Films and edible coatings containing antioxidants—A review,” *Brazilian J. Food Technol.*, vol. 17, no. 2, pp. 98–112, 2014.
- [4] Á. Perdone, I. Escriche, A. Chiralt, and M. Vargas, “Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage,” *Food Chem.*, vol. 197, pp. 979–986, Apr. 2016.
- [5] C. D. Grande-Tovar, C. Chaves-Lopez, A. Serio, C. Rossi, and A. Paparella, “Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involved in fruit decay and mechanisms of action,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 78, pp. 61–71, Aug. 2018.
- [6] L. Atarés and A. Chiralt, “Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 48, pp. 51–62, Feb. 2016.
- [7] G. F. Lemes *et al.*, “Enzymatically crosslinked gelatin coating added of bioactive nanoparticles and antifungal agent: Effect on the quality of Benitaka grapes,” *LWT*, vol. 84, pp. 175–182, Oct. 2017.
- [8] T. Diab, C. G. Biliaderis, D. Gerasopoulos, and E. Sfakiotakis, “Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 81, no. 10, pp. 988–1000, Aug. 2001.
- [9] B. Niu, P. Shao, H. Chen, and P. Sun, “Structural and physicochemical characterization of novel hydrophobic packaging films based on pullulan derivatives for fruits preservation,” *Carbohydrate Polym.*, vol. 208, pp. 276–284, Mar. 2019.
- [10] K. Kraśniewska, I. Ścibisz, M. Gniewosz, M. Mitek, K. Pobięga, and A. Cendrowski, “Effect of pullulan coating on postharvest quality and shelf-life of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.),” *Materials*, vol. 10, no. 8, p. 965, Aug. 2017.
- [11] A. K. Pandey, P. Kumar, P. Singh, N. N. Tripathi, and V. K. Bajpai, “Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 2161, Jan. 2017.
- [12] D. K. Choudhary, A. K. Sharma, P. Agarwal, A. Varma, and N. Tuteja, *Volatiles and Food Security: Role of Volatiles in Agro-Ecosystems*. Singapore: Springer, 2017.
- [13] H. Amiri, “Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species,” *Evidence-Based Complementary Alternative Med.*, vol. 2012, Apr. 2012, Art. no. 728065.
- [14] B. Salehi *et al.*, “Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses,” *Phytotherapy Res.*, vol. 32, no. 9, pp. 1688–1706, Sep. 2018.
- [15] S. M. Nabavi, A. Marchese, M. Izadi, V. Curti, M. Daglia, and S. F. Nabavi, “Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy,” *Food Chem.*, vol. 173, pp. 339–347, Apr. 2015.
- [16] C. Ballester-Costa, E. Sendra, J. Fernández-López, J. A. Pérez-Álvarez, and M. Viuda-Martos, “Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 50, pp. 304–311, Oct. 2013.
- [17] D. Sivakumar and S. Bautista-Baños, “A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage,” *Crop Prot.*, vol. 64, pp. 27–37, Oct. 2014.
- [18] R. Vilaplana, L. Pazmiño, and S. Valencia-Chamorro, “Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil,” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 138, pp. 56–63, Apr. 2018.
- [19] A. El Asbahani *et al.*, “Essential oils: From extraction to encapsulation,” *Int. J. Pharm.*, vol. 483, nos. 1–2, pp. 220–243, 2015.
- [20] G. C. Feyzioglu and F. Tornuk, “Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications,” *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 70, pp. 104–110, Jul. 2016.
- [21] N. Sozer and J. L. Kokini, *Nanotechnology and Its Applications in the Food Sector*, vol. 27. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2009, no. 2, pp. 82–89.
- [22] B. Prakash, A. Kujur, A. Yadav, A. Kumar, P. P. Singh, and N. K. Dubey, “Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system,” *Food Control*, vol. 89, pp. 1–11, Jul. 2018.
- [23] G. Granata *et al.*, “Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation,” *Food Chem.*, vol. 269, pp. 286–292, Dec. 2018.
- [24] E. F. de Oliveira, H. C. B. Paula, and R. C. M. de Paula, “Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation,” *Colloids Surf. B, Biointerfaces*, vol. 113, pp. 146–151, Jan. 2014.



- [25] M.-J. Choi, A. Soottitawat, O. Nuchuchua, S.-G. Min, and U. Ruktanonchai, "Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method," *Food Res. Int.*, vol. 42, no. 1, pp. 148–156, Jan. 2009.
- [26] I. L. Liakos *et al.*, "Polylactic acid—Lemongrass essential oil nanocapsules with antimicrobial properties," *Pharmaceuticals*, vol. 9, no. 3, p. 42, Jul. 2016.
- [27] O. Benchabane, M. Hazzit, F. Mouhouche, and A. Baaliouamer, "Influence of extraction duration on the chemical composition and biological activities of essential oil of thymus pallescens de noé," *Arabian J. Sci. Eng.*, vol. 40, no. 7, pp. 1855–1865, Jul. 2015.
- [28] L. Guerra-Boone *et al.*, "Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis, and Origanum majorana from northeastern México," *Pakistan J. Pharmaceutical Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 363–369, 2015.
- [29] L. Lugo-Estrada, S. A. Galindo-Rodríguez, L. A. Pérez-López, N. W. de Torres, and R. Álvarez-Román, "Headspace–solid-phase microextraction gas chromatography method to quantify Thymus vulgaris essential oil in polymeric nanoparticles," *Pharmacogn. Mag.*, vol. 15, pp. 473–478, Jan. 2019.
- [30] P. Satyal, B. Murray, R. McFeeters, and W. N. Setzer, "Essential oil characterization of Thymus vulgaris from various geographical locations," *Foods*, vol. 5, no. 4, p. 70, Oct. 2016.
- [31] A. Carrasco, V. Tomas, J. Tudela, and M. G. Miguel, "Comparative study of GC-MS characterization, antioxidant activity and hyaluronidase inhibition of different species of Lavandula and Thymus essential oils," *Flavour Fragr. J.*, vol. 31, no. 1, pp. 57–69, Jan. 2016.
- [32] M. Hyldgaard, T. Mygind, and R. L. Meyer, "Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components," *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. 12, pp. 1–24, 2012.
- [33] A. Wattanasatcha, S. Rengpipat, and S. Wanichwecharungruang, "Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent," *Int. Pharmaceutics*, vol. 434, nos. 1–2, pp. 360–365, Sep. 2012.
- [34] M. D. Baldissera *et al.*, "In vitro and in vivo action of terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinene, and  $\alpha$ -terpinene against Trypanosoma evansi," *Exp. Parasitol.*, vol. 162, pp. 43–48, Mar. 2016.
- [35] A. D. Thakre, S. V. Mulange, S. S. Kodgire, G. B. Zore, and S. M. Karuppaiyl, "Effects of cinnamaldehyde, ocimene, camphene, curcumin and farnesene on Candida albicans," *Adv. Microbiol.*, vol. 6, no. 9, pp. 627–643, 2016.
- [36] S. H. Mirdehghan and S. Rahimi, "Pre-harvest application of polyamines enhances antioxidants and table grape (Vitis vinifera L.) quality during postharvest period," *Food Chem.*, vol. 196, pp. 1040–1047, Apr. 2016.
- [37] L. L. de Sousa *et al.*, "Efficacy of Origanum vulgare L. and Rosmarinus officinalis L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic Aspergilli and autochthonous mycoflora in Vitis labrusca L. (table grapes)," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 165, no. 3, pp. 312–318, 2013.
- [38] B. P. Baker, J. A. Grant, and R. Malakar-Kuonen, "Thyme and thyme oil profile. Active ingredient eligible for minimum risk pesticide use," *Integr. Pest Manage. Cornell Univ., Tech. Rep.*, 2008, pp. 1–11. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/1813/56143>
- [39] C. G. Bareras-Urbina *et al.*, "Nano- and micro-particles by nanoprecipitation: Possible application in the food and agricultural industries," *Int. J. Food Properties*, vol. 19, no. 9, pp. 1912–1923, 2016.
- [40] S. Galindo-Rodríguez, E. Alléman, H. Fessi, and E. Doelker, "Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods," *Pharmaceutical Res.*, vol. 21, no. 8, pp. 1428–1439, 2004.
- [41] W. Badri *et al.*, "Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and Nigella sativa L. essential oil for the topical treatment of inflammation," *J. Drug Del. Sci. Technol.*, vol. 46, pp. 234–242, Aug. 2018.
- [42] M. Sotelo-Boyás, Z. Correa-Pacheco, S. Bautista-Baños, and Y. G. Y. Gómez, "Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria," *Int. J. Biol. Macromolecules*, vol. 103, pp. 409–414, Oct. 2017.
- [43] A. L. Boehm, I. Martinon, R. Zerrouk, E. Rump, and H. Fessi, "Nanoprecipitation technique for the encapsulation of agrochemical active ingredients," *J. Microencapsulation*, vol. 20, no. 4, pp. 433–441, 2003.
- [44] M. E. Sotelo-Boyás, Z. N. Correa-Pacheco, S. Bautista-Baños, and M. L. Corona-Rangel, "Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens," *LWT*, vol. 77, pp. 15–20, Apr. 2017.
- [45] A. El Asbahani *et al.*, "Antimicrobial activity of nano-encapsulated essential oils: Comparison to non-encapsulated essential oils," *J. Colloid Sci. Biotechnol.*, vol. 4, no. 1, pp. 39–48, 2015.
- [46] L. Wang, C. Hu, and L. Shao, "The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future," *Int. J. Nanomed.*, vol. 12, pp. 1227–1249, Feb. 2017.
- [47] I. Marcet, S. Weng, S. Sáez-Orviz, M. Rendueles, and M. Díaz, "Production and characterisation of biodegradable PLA nanoparticles loaded with thymol to improve its antimicrobial effect," *J. Food Eng.*, vol. 239, pp. 26–32, Dec. 2018.
- [48] F. Shahidi and Y. Zhong, "Measurement of antioxidant activity," *J. Funct. Foods*, vol. 18, pp. 757–781, Oct. 2015.
- [49] N. Nenadis and M. Z. Tsimidou, "DPPH (2, 2-di (4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) radical scavenging mixed-mode colorimetric assay (s)," in *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*. Chichester, U.K.: Wiley, 2017, pp. 141–164.
- [50] Y. Zhang, Y. Yang, K. Tang, X. Hu, and G. Zou, "Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 107, no. 2, pp. 891–897, 2008.
- [51] S. P. Kumar, K. Birundha, K. Kaveri, and K. T. R. Devi, "Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing naringenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells," *Int. J. Biol. Macromolecules*, vol. 78, pp. 87–95, Jul. 2015.
- [52] A. R. Vicente, M. Saladié, J. K. C. Rose, and J. M. Labavitch, "The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: Looking to the future," *J. Sci. Food Agricult.*, vol. 87, no. 8, pp. 1435–1448, Jun. 2007.
- [53] E. Eroglu, M. Torun, C. Dincer, and A. Topuz, "Influence of pullulan-based edible coating on some quality properties of strawberry during cold storage," *Packag. Technol. Sci.*, vol. 27, no. 10, pp. 831–838, Oct. 2014.
- [54] N. F. C. B. Melo *et al.*, "Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 139, pp. 56–66, May 2018.
- [55] N. S. Baraiya, T. V. R. Rao, and V. R. Thakkar, "Composite coating as a carrier of antioxidants improves the postharvest shelf life and quality of table grapes (Vitis vinifera L. var. Thompson seedless)," *J. Agric. Sci. Technol.*, vol. 18, no. 1, pp. 93–107, 2016.
- [56] J. Balík, M. Kumšta, and O. Rop, "Comparison of anthocyanins present in grapes of Vitis vinifera L. varieties and interspecific hybrids grown in the Czech Republic," *Chem. Pap.*, vol. 67, no. 10, pp. 1285–1292, Jan. 2013.
- [57] M. M. Rahman, M. Moniruzzaman, M. R. Ahmad, B. C. Sarker, and M. K. Alam, "Maturity stages affect the postharvest quality and shelf-life of fruits of strawberry genotypes growing in subtropical regions," *J. Saudi Soc. Agricult. Sci.*, vol. 15, no. 1, pp. 28–37, Jan. 2016.
- [58] A. C. Guerreiro, C. M. L. Gago, M. L. Faleiro, M. G. C. Miguel, and M. D. C. Antunes, "The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on Arbutus unedo L. Fresh fruit storage," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 100, pp. 226–233, Feb. 2015.
- [59] D. Kambiranda, H. Vasanthaiah, and S. M. Basha, "Relationship between acid invertase activity and sugar content in grape species," *J. Food Biochem.*, vol. 35, no. 6, pp. 1646–1652, Dec. 2011.
- [60] V. Trinetta and C. N. Cutter, "Pullulan: A suitable biopolymer for antimicrobial food packaging applications," in *Antimicrobial Food Packaging*. New York, NY, USA: Academic, 2016, pp. 385–397.
- [61] F. Famiiani, A. Battistelli, S. Moscatello, R. P. Cruz-Castillo, and J. G. Walker, "The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: Occurrence, metabolism and factors affecting their contents—A review," *Rev. Chapingo Ser. Hortic.*, vol. 21, no. 2, pp. 97–128, 2015.
- [62] F. Famiiani, D. Farinelli, A. Palliotti, S. Moscatello, A. Battistelli, and R. P. Walker, "Is stored malate the quantitatively most important substrate utilised by respiration and ethanolic fermentation in grape berry pericarp during ripening?" *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 76, pp. 52–57, Mar. 2014.
- [63] Y. Eguchi *et al.*, "Identification of terpenoids volatilized from Thymus vulgaris L. by heat treatment and their in vitro antimicrobial activity," *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, vol. 94, pp. 83–89, Apr. 2016.
- [64] J. O. W. González, E. N. Jesser, C. A. Yeguerman, A. A. Ferrero, and B. F. Band, "Polymer nanoparticles containing essential oils: New options for mosquito control," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, no. 20, pp. 17006–17015, Jul. 2017.
- [65] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, and O. C. Farokhzad, "Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release," *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 4, pp. 2602–2663, 2016.

# **ANEXO III**

## **PRESENTACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES**

1. Evaluación y perfil de la capacidad antioxidante de cinco aceites esenciales. 12va. Reunión de Investigación en Productos Naturales. AMIPRONAT. Xalapa, Veracruz, México, 18-20 de mayo de 2016. (cartel).
2. Aplicación de nanopartículas poliméricas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* incorporado para aumentar la vida de anaquel de uva de mesa (*Vitis vinifera*). 1er. Congreso Internacional de NanoBioIngeniería. Monterrey, Nuevo León, México, 7-9 de noviembre de 2018. (presentación oral).



## RESUMEN BIOGRÁFICO

Andrés Mauricio Piña Barrera

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

*Tesis:* DESARROLLO DE NANOINGREDIENTES  
FUNCIONALES A BASE DE PRODUCTOS  
NATURALES PARA PRESERVAR PRODUCTOS  
HORTOFRUTÍCOLAS

*Campo de Estudio:* Ciencias Biológicas

Nacido en Villavicencio, Meta, Colombia el 04 de mayo de 1984.

*Datos Personales:* Hijo de Jaime Piña Suarez y Nancy Barrera Graciano. Casado con Arcelia Sandoval Vargas y padre de Andrés Emilio Piña Sandoval.

*Educación:* Universidad de Montemorelos: Licenciatura en Químico Clínico Biólogo. 2007.  
Instituto Politécnico Nacional: Maestría en Ciencias en Alimentos con mención honorífica. 2012.

*Experiencia profesional:* Docente de tiempo completo en la Universidad de Montemorelos desde 2010.