

Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol-
carvacrol nanoencapsulado en polímeros biodegradables

Raphael Portilla Restrepo

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magister en Microbiología

Directora

Claudia Cristina Ortiz López, PhD.

Profesora de la Escuela de Microbiología

Codirector

Rodrigo Gonzalo Torres Sáez, PhD.

Profesor *Ad Honorem* Universidad Industrial de Santander

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Maestría en Microbiología

Escuela de Microbiología

Bucaramanga

2024

Agradecimientos

Agradecimientos al Ministerio de Ciencias, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX, Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Marco Conceptual	19
1.1. Microorganismos patógenos	19
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	19
1.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	20
1.1.3. <i>Salmonella enterica</i> serovariedad Enteritidis (<i>S. Enteritidis</i>).....	21
1.1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	22
1.1.5. <i>Candida</i> sp.	23
1.1.5.1. <i>Candida albicans</i> (<i>C. albicans</i>)	24
1.1.5.2. <i>Candida auris</i> (<i>C. auris</i>).....	25
1.2. Aceites Esenciales (AEs)	26
1.2.1. Actividad antimicrobiana del AE LOT II	26
1.3. Polímeros biodegradables y biocompatibles.....	28
1.3.1. Ácido Poli Láctico (PLA)	28
1.3.2. Ácido Poli (Láctico-co-Glicólico) (PLGA)	30
1.3.3. Quitosano (Qs)	31
1.4. Nanoencapsulación	33
2. Pregunta de investigación	35
3. Hipótesis	36
4. Objetivos	37
4.1. Objetivo General	37

4.2.	Objetivos Específicos.....	37
5.	Materiales y Métodos.....	38
5.1.	Materiales.....	39
5.2.	Métodos.....	40
5.2.1.	Síntesis de NPs de PLA	40
5.2.1.1.	Determinación de la cantidad de PLA, PVA y AE en la síntesis de NPs de PLA....	41
5.2.1.2.	Validación de la mejor formulación de síntesis de NPs de PLA con AE LO y AE LOT II	42
5.2.1.3.	Modificación química de las NPs de PLA con PEI	42
5.2.2.	Síntesis de NPs de PLGA	42
5.2.2.1.	Determinación de la cantidad de PLGA, PVA y AE en la síntesis de NPs de PLGA 43	
5.2.2.2.	Validación de la mejor formulación de síntesis de NPs de PLGA con el AE LO y AE LOT II	44
5.2.2.3.	Modificación química de las NPs de PLGA con PEI	44
5.2.3.	Síntesis de NPs de Qs	44
5.2.3.1.	Determinación de la cantidad de AE en la síntesis de NPs de Qs	45
5.2.3.2.	Validación de la mejor formulación de síntesis de NPs de Qs cargadas de AE LO y AE LOT II	46
5.2.4.	Análisis Físicoquímico de las NPs de PLA, PLGA y Qs	46
5.2.4.1.	Determinación de la estabilidad de las NPs.....	46
5.2.4.2.	Eficiencia de encapsulación (% EE).....	46
5.2.4.3.	Interacción del AE con el polímero	47

5.2.4.4.	Perfil de liberación <i>in vitro</i>	47
5.2.4.5.	Caracterización morfológica de las NPs de PLA, PLGA y Qs.....	47
5.2.4.6.	Estabilidad térmica del AE LOT II, NPs de Qs vacías y cargadas con el AE LOT II 48	
5.2.5.	Actividad antimicrobiana del AE LOT II libre y encapsulado	48
5.2.5.1.	Actividad antibacteriana del AE LOT II libre	48
5.2.5.2.	Actividad antibacteriana de las NPs de PLA, PLGA y Qs cargadas con el AE LOT II 49	
5.2.5.3.	Actividad antifúngica del AE LOT II libre y encapsulado en NPs de PLA, PLGA, PLA-PEI, PLGA-PEI y Qs	50
6.	Resultados y Discusión.....	51
6.1.	Síntesis de NPs de PLA	51
6.1.1.	Determinación de la cantidad de PLA, PVA y AE en la síntesis de NPs de PLA....	53
6.1.2.	Validación de la mejor formulación de síntesis de NPs de PLA con AE LO y AE LOT II	55
6.1.3.	Síntesis de NPs de PLA adicionando PEI.....	56
6.2.	Síntesis de NPs de PLGA	57
6.2.1.	Determinación de la cantidad de PLGA, PVA y AE en la síntesis de las NPs de PLGA .	57
6.2.2.	Validación de la mejor formulación de síntesis de NPs de PLGA con AE LO y AE LOT II	60
6.2.3.	Síntesis de NPs de PLGA adicionando PEI.....	61
6.3.	Síntesis de NPs de Qs	61
6.3.1.	Determinación de la cantidad de AE para la síntesis de NPs de Qs	62

6.3.2.	Validación de la síntesis de NPs de Qs cargadas con AE LO y AE LOT II con la mejor formulación	63
6.4.	Determinación de la estabilidad de las NPs	63
6.4.1.	Estabilidad de las NPS de PLA cargadas con AE LOT II	63
6.4.2.	Estabilidad de las NPs de PLGA cargadas con AE LOT II.....	64
6.4.3.	Estabilidad de las NPs de Qs cargadas con AE LOT II.....	65
6.5.	Eficiencia de encapsulación (%EE)	66
6.6.	Interacción y encapsulación de las NPs y el AE LOT II	68
6.6.1.	Interacción de las NPs de PLA con el AE LOT II.....	68
6.6.2.	Interacción de las NPs de PLGA con el AE LOT II.....	69
6.6.3.	Interacción de las NPs de Qs con el AE LOT II.....	71
6.7.	Perfil de liberación <i>in vitro</i> de las NPs de PLA, PLGA y Qs	72
6.8.	Caracterización morfológica.....	73
6.9.	Determinación de la estabilidad térmica de las NPs de Qs cargadas con AE LOT II	75
6.10.	Actividad antimicrobiana del AE LOT II libre y encapsulado	76
6.10.1.	Determinación de la actividad antimicrobiana del AE LOT II libre y encapsulado en NPs de Qs frente a <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076 y <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	76
6.10.2.	Determinación de la actividad antimicrobiana del AE LOT II libre y encapsulado en NPs de Qs contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 y <i>Candida auris</i> CDC B11903.....	80
7.	Conclusiones	82
	Referencias Bibliográficas	84

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Estudios nanoencapsulación de AEs con actividad antimicrobiana en PLA</i>	29
Tabla 2. <i>Estudios de encapsulación de AEs con actividad antimicrobiana en PLGA</i>	31
Tabla 3. <i>Estudios previos de nanoencapsulación de AEs con actividad antimicrobiana en Quitosano</i>	32
Tabla 4. <i>Distribución de los niveles mínimos y máximos de los factores (PVA, PLA y AE LO) de acuerdo con el diseño experimental 2³</i>	41
Tabla 5. <i>Valores mínimos (m) y máximos (M) de las variables de respuesta (tamaño, PDI, Pz y % EE) analizadas a partir del promedio de los resultados</i>	41
Tabla 6. <i>Distribución de los niveles mínimos y máximos de los factores (PVA, PLGA y AE de LO) de acuerdo con el diseño experimental 2³</i>	43
Tabla 7. <i>Valores mínimos (m) y máximos (M) de las variables de respuesta (tamaño, PDI, Pz y % EE) analizadas a partir del promedio de los resultados</i>	44
Tabla 8. <i>Características físicas de las NPs de PLA-PEI vacías, PLA-PEI y PLA cargadas con AE LOT II</i>	57
Tabla 9. <i>Características físicas de las NPs de PLGA-PEI vacías, PLGA-PEI y PLGA cargadas con el AE LOT II</i>	61
Tabla 10. <i>Inhibición del crecimiento de S. aureus ATCC 29213, E.coli ATCC 25922, Salmonella Enteritidis ATCC 13076 y P. aeruginosa ATCC 27853 por el AE LOT II</i>	78

Tabla 11. <i>Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de PLA, PLGA, PLA-PEI, PLGA, PLGA-PEI y Quitosano cargadas con AE LOT II contra S. aureus ATCC 29213, E.coli ATCC 25922, Salmonella Enteritidis ATCC 13076 y P. aeruginosa ATCC 27853</i>	79
Tabla 12. <i>Comparación de la CMI y CMB del AE LOT II sin encapsular y las NPs de Qs cargadas con el AE LOT II contra S. aureus ATCC 29213, E. coli ATCC 25922, Salmonella Enteritidis ATCC 13076 y P. aeruginosa ATCC 27853</i>	80
Tabla 13. <i>Comparación de la CMI y CMF del AE LOT II libre y encapsulado en NPs de Qs contra C. albicans ATCC 10231 y C. auris CDC B11903</i>	81

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 <i>Esquema metodológico para desarrollar el proyecto de investigación</i>	38
Figura 2 <i>Determinación de la precipitación de NPs de PVA:PLA proporción 5:1 en masa. a. 30 mg total, b. 40 mg total y c. 50 mg total (precipitación en círculo rojo)</i>	52
Figura 3 <i>Determinación del efecto del uso de Ultra Turrax (UT) y el Rotoevaporador (RTEV) en la síntesis de NPs poliméricas. a. Uso de UT para un valor de $p \leq 0.05$ y b. Uso RTEV para un valor de $p \leq 0.05$</i>	53
Figura 4 <i>Determinación de la mejor formulación para la síntesis de NPs de PLA cargadas con AE LO. Diagramas de Pareto para Tamaño, PDI, Potencial Z y Eficiencia de encapsulación (a,c,e y g, respectivamente) y gráficos de componentes principales de tamaño, PDI, Potencial Z y Eficiencia de encapsulación (b, d, f y h, respectivamente)</i>	54
Figura 5 <i>Determinación de las diferencias estadísticamente significativas en el tamaño, PDI, Potencial Z y Eficiencia de encapsulación entre el AE de Lippia origanoides (LO) y el LOT II en NPs de PLA. a. Tamaño, b. PDI, c. Potencial Z y d. Eficiencia de encapsulación</i>	56
Figura 6 <i>Determinación de la mejor formulación para la síntesis de NPs de PLGA cargadas con AE LO. Diagramas de Pareto para Tamaño, PDI, Potencial Z y Eficiencia de encapsulación (a,c,e y g, respectivamente) y gráficos de componentes principales de tamaño, PDI, Potencial Z y Eficiencia de encapsulación (b, d, f y h, respectivamente)</i>	58
Figura 7 <i>Determinación de las diferencias estadísticamente significativas en el tamaño, PDI, Potencial Z Eficiencia de encapsulación entre el AE de Lippia origanoides (LO) y el AE LOT II en NPs de PLGA. a. Tamaño, b. PDI, c. Potencial Z y d. Eficiencia de encapsulación</i>	60

Figura 8 <i>Determinación de la mejor cantidad de AE LO en la síntesis de NPs de Qs en función de:</i> <i>a. tamaño, b. PDI y c. Potencial Z.....</i>	62
Figura 9 <i>Determinación de la encapsulación del AE LOT II en comparación con el AE LO en el</i> <i>tamaño, PDI y potencial Z.....</i>	63
Figura 10 <i>Determinación de la estabilidad en el tiempo de las NPs de PLA cargadas con el AE</i> <i>LOT II para, A. tamaño, B. PDI y C. potencial Z</i>	64
Figura 11 <i>Determinación de la estabilidad en el tiempo de las NPs de PLGA cargadas con el AE</i> <i>LOT II para, A. tamaño, B. PDI y C. potencial Z.....</i>	65
Figura 12 <i>Determinación de la estabilidad de las NPs de Qs cargadas con el AE LOT II para, A.</i> <i>Tamaño, B. PDI y C. Potencial Z</i>	66
Figura 13 <i>Eficiencia de encapsulación de las NPs de cada polímero con AE LOT II, A. Eficiencia</i> <i>de encapsulación (%) y B. Concentración en las NPs de cada polímero.....</i>	67
Figura 14 <i>Determinación de la interacción y encapsulación del AE LOT II en NPs de PLA</i>	68
Figura 15 <i>Determinación de la interacción y encapsulación del AE LOT II en NPs de PLA-PEI</i> <i>.....</i>	69
Figura 16 <i>Determinación de la interacción y encapsulación del AE LOT II en NPs de PLGA ...</i>	70
Figura 17 <i>Determinación de la interacción y encapsulación del AE LOT II en NPs de PLGA-PEI</i> <i>.....</i>	70
Figura 18 <i>Determinación de la interacción y encapsulación del AE LOT II en NPs de Qs.....</i>	71
Figura 19 <i>Determinación del perfil de liberación del AE LOT II de las NPs. A. PLA, B. PLGA y C.</i> <i>Qs</i>	72
Figura 20 <i>Determinación de la morfología mediante micrografías SEM de las nanopartículas de</i> <i>PLA Y PLGA cargadas con AE LOT II, A. PLA Micrografía general a 25000x de aumento, B. PLA</i>	

<i>Micrografía a 30000x de aumento, C. PLGA Micrografía general a 800x de aumento y D. PLGA Micrografía a 12000x de aumentos</i>	73
Figura 21 <i>Determinación de la morfología por micrografías SEM de las nanopartículas de PLA-PEI y PLGA PEI cargadas con el AE LOT II. A. Micrografía de PLA-PEI a 8000x de aumento y B. Micrografía de PLGA-PEI a 12000x de aumento</i>	74
Figura 22 <i>Determinación de la morfología mediante micrografías SEM de las nanopartículas de Quitosano cargadas con el AE LOT II. A. Micrografía de Quitosano a 1600x de aumento y B. Micrografía de Quitosano a 6000x de aumento.</i>	75
Figura 23 <i>Termogramas del AE LOT II libre, NPs de Qs vacías y NPs de Qs cargadas con AE LOT II. A. Curvas TGA y B. Curvas de la primera derivada del TGA (DTG)</i>	76
Figura 24 <i>Cinética de crecimiento a 37 °C, 200 rpm, durante 8 h con diferentes concentraciones de AE LOT II de A. S. aureus ATCC 29213, B. E.coli ATCC 25922, C. Salmonella Enteritidis ATCC 13076 y D. P. aeruginosa ATCC 2785.</i>	77

Lista de Apéndices

Apéndice A. Curvas de Calibración de UV-VIS para AE LOT II. El apéndice está adjunto y se puede descargar del Repositorio Institucional.

Apéndice B. Formula de Porcentaje de inhibición del AE LOT II en la cinética de crecimiento de los microorganismos. El apéndice está adjunto y se puede descargar del Repositorio Institucional.

Resumen

Título: Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia organoides* quimiotipo timol-carvacrol nanoencapsulado en polímeros biodegradables*

Autores: Raphael Portilla Restrepo, Claudia Cristina Ortiz López y Rodrigo Torres Sáez**

Palabras Clave: Actividad antimicrobiana, Aceites esenciales, Nanopartículas, Polímeros, Microorganismos patógenos.

Introducción: En la actualidad existe gran preocupación por el aumento de la resistencia antibacteriana frente a los antibióticos convencionales. Por esta razón, surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas como pueden ser los Aceites Esenciales. Sin embargo, su aplicación se ve limitada debido a la hidrofobicidad y volatilidad de sus compuestos. **Objetivo:** evaluar el uso de biopolímeros para la nanoencapsulación del aceite esencial de *Lippia organoides* y probarlo frente a cinco especies de bacterias y dos especies de hongos. **Metodología:** La síntesis de nanopartículas utilizando diferentes biopolímeros se hizo mediante emulsificación y evaporación de solventes, determinándose el potencial Z, tamaño, índice de polidispersidad (PDI) y la estabilidad, mediante el análisis de dispersión de luz dinámica. La eficiencia de encapsulación y la morfología de las nanopartículas se determinó por medio de espectrofotometría UV-VIS y microscopía electrónica de barrido (SEM), respectivamente. Finalmente, se evaluaron la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Microbicida (CMM) del aceite encapsulado y libre mediante la técnica de microdilución en caldo. **Resultados:** se obtuvieron nanopartículas a escala nanométrica, destacándose los resultados obtenidos con las nanopartículas de Quitosano cuyo tamaño fue de 198.3 ± 6.3 nm, PDI de 0.249 ± 0.026 y potencial Z de 18.8 ± 3.9 mV, cuyos valores se mantuvieron estables durante 30 días. La eficiencia de encapsulación fue del 27.5 %, correspondiendo a 1376 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, en los ensayos de actividad antimicrobiana, la nanoencapsulación utilizando quitosano, permitió disminuir la CMI y CMM frente a todas las cepas evaluadas (*S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida auris* CDC B11903), alcanzando valores de CMI de 43 $\mu\text{g/mL}$ y CMM de 172 $\mu\text{g/mL}$ en la mayoría de las cepas. **Conclusiones:** se logró sintetizar nanopartículas de quitosano con aceite esencial de tamaño a escala nanométrico, carga superficial positiva y estabilidad durante 30 días. Se mejoró la actividad antimicrobiana del aceite esencial encapsulado en quitosano disminuyendo la CMI contra todas las cepas evaluadas. En consecuencia, constituye una alternativa promisoriosa para el desarrollo de tratamiento de infecciones microbianas.

* Trabajo de grado

** Facultad de salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología. Directora: Claudia Cristina Ortiz López. Doctora en Bioquímica y Biología Molecular. Codirector: Rodrigo Gonzalo Torres Sáez. Doctor en Bioquímica y Biología Molecular.

Abstract

Title: Study of the antimicrobial effect of the essential oil of *Lippia organoides* chemotype thymol-carvacrol nanoencapsulated in biodegradable polymers. *

Author(s): Raphael Portilla Restrepo, Claudia Cristina Ortiz López y Rodrigo Torres Sáez **

Key Words: Antimicrobial activity, Essential oils, Nanoparticles, Polymers, Pathogenic microorganisms.

Introduction: Currently, there is great concern about the increase of antibacterial resistance to conventional antibiotics. For this reason, it is needed to find new therapeutic alternatives to control this threat. Among available antimicrobial compounds, essential oils have emerged as a promising alternative for controlling of antibiotic-resistant microorganisms. However, their application is limited due to the hydrophobicity and volatility of these compounds. **Objective:** To evaluate the use of biopolymers for the nanoencapsulation of *Lippia organoides* essential oil and test them against five species of bacteria and two species of fungi (*S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida auris* CDC B11903). **Methodology:** Synthesis of nanoparticles of different polymers was performed by emulsification and solvent evaporation technique, determining Z-potential, size, polydispersity index (PDI) and stability through dynamic light scattering (DLS). The encapsulation efficiency and morphology of the nanoparticles were determined by UV-VIS spectrophotometry and scanning electron microscopy (SEM), respectively. Finally, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Microbicidal Concentration (MMC) of both encapsulated and free oil were evaluated by broth microdilution technique. **Results:** Nanoparticles were obtained at nanometric scale, highlighting the results obtained with Chitosan nanoparticles, whose size was 198.3 ± 6.3 nm, PDI of 0.249 ± 0.026 and Z potential of 18.8 ± 3.9 mV, whose values remained stable for 30 days. The encapsulation efficiency was 27.5 %, corresponding to 1376 $\mu\text{g}/\text{mL}$. On the other hand, in the antimicrobial activity tests, the use of chitosan as a biopolymer for nanoencapsulation allowed a reduction in the MIC and MBC against all microbial strains evaluated, achieving MIC values of 43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MBC of 172 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the most microbial strains. **Conclusions:** It was possible to synthesize chitosan nanoparticles with essential oil of nanometer-scale size, positive surface charge and stability of the nanoparticles for 30 days. The antimicrobial activity of the essential oil encapsulated in chitosan was improved, decreasing the MIC against all the strains evaluated. Consequently, nanoencapsulation of antimicrobial compounds constitutes a promising alternative for the development of treatment of microbial infections.

* Degree Work

**Facultad de salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología. Director: Claudia Cristina Ortiz López. Doctor in biochemistry and molecular biology. Codirector: Rodrigo Gonzalo Torres Sáez. Doctor in biochemistry and molecular biology.

Introducción

Una de las problemáticas más importantes que afectan la salud pública en el mundo es la resistencia de los microorganismos patógenos frente a los antibióticos convencionales. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) estimó que en Estados Unidos se registraron más de 2.8 millones de casos de infecciones con Microorganismos con Resistencia Antimicrobiana (RAM) y más de 35,000 personas murieron como resultado de estas infecciones (CDC, 2017). La resistencia antimicrobiana se produce debido a la adaptación de los microorganismos por factores como estrés, transferencia horizontal de genes, uso masivo e indiscriminado de antibióticos y resistencia mediada por biopelículas, entre otros (Bowler *et al.*, 2020; Giubilini, 2019; Ogawara, 2019).

Así mismo, la CDC clasificó los RAM como una amenaza seria para la salud humana, incluyendo microorganismos como Enterobacteriales productores de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), entre los que se destaca *Escherichia coli* (Chipa-Paucar, 2019). Por otro lado, se incluyeron *Candida spp* (San Miguel *et al.*, 2019; Sharafutdinov *et al.*, 2020), *Pseudomonas aeruginosa* (López-Calleja *et al.*, 2019), *Salmonella sp* (Pérez-Ardila *et al.*, 2020) y *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina (SARM) (Hernández *et al.*, 2019). Por esta razón, En la actualidad la CDC ha implementado diversas estrategias para mitigar el impacto de los RAM, como campañas de cuidado de la salud, control del uso de antibióticos y desarrollo de nuevos medicamentos (CDC, 2021).

En Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) informó en su reporte del 2019 la prevalencia de infecciones en pacientes hospitalizados a nivel nacional. Se destacaron las infecciones ocasionadas por *E. coli* con una prevalencia de 28.4 % en adultos y 31.9 % en hospitalización pediátrica. Así mismo, se notificó la problemática de resistencia antimicrobiana en

cepas de este microorganismo dado que, la resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación se presentó en un 24.0 % y 14.1 % en hospitalización de adultos y niños, respectivamente (INS, 2019). Además, *E.coli* ha sido la principal bacteria involucrada en la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA). El INS en un boletín epidemiológico del 2023 reportó que se han presentado 717,647 nuevos casos de EDA y que el riesgo de infección por este microorganismo es del 7.5% a nivel nacional. Razón por la cual, las infecciones por este microorganismo se vigilan constantemente en el territorio (INS, 2023b, 2023a).

Por otro lado, la comunidad de investigadores ha respondido frente a la problemática antes planteada, con propuestas para implementar nuevas alternativas terapéuticas, tales como el diseño y síntesis de moléculas alternativas (Ejemplo, péptidos antimicrobianos), moléculas derivadas de antibióticos, nanopartículas (NPs) y derivados de plantas aromáticas como los Aceites Esenciales, entre otros (AE), entre otros (Chousan *et al.*, 2017; Gholami-Shabani *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2020; Terreni *et al.*, 2021). Los AEs se han estudiado ampliamente en los últimos años, debido a que presentan actividad antioxidante, antimicrobiana e insecticida, lo cual despierta el interés de los investigadores para ser usados como aditivos de alimentos, preservantes, perfumes, productos para la piel y diferentes aplicaciones terapéuticas en medicina (Pandey *et al.*, 2017).

La actividad antimicrobiana de los AE se da por la combinación de sus componentes, como son el limoneno, linalool, ρ -cimeno, geraniol, eugenol, cinamaldehído, timol, carvacrol, entre otros (Cáceres *et al.*, 2020; da Silva *et al.*, 2021). Del mismo modo, los componentes con mejor actividad antimicrobiana han sido el Timol y el Carvacrol debido a que los AE con una composición relativa predominante de estos compuestos, requieren una concentración menor para inhibir el crecimiento microbiano (Cáceres *et al.*, 2020; Prakash *et al.*, 2018; Rezaei *et al.*, 2019). Uno de los AE que se destaca es el obtenido de una planta autóctona colombiana denominada *Lippia origanoides* (L.

origanoides); el AE extraído de esta planta se caracteriza por presentar en su composición relativa principalmente timol, carvacrol y ρ -cimeno y ha sido ampliamente estudiado en la Universidad Industrial de Santander, debido a que se ha comprobado actividad biológica importante (Cáceres *et al.*, 2020; Tangarife-Castaño *et al.*, 2011).

Por otro lado, desafortunadamente el uso de los AEs se ve limitado a causa de la hidrofobicidad y volatilidad de sus componentes. Estas características restringen su aplicación debido a que el tiempo de acción de los componentes es corto reduciendo la actividad antimicrobiana. Así mismo, la hidrofobicidad de los componentes del AE dificulta la interacción interfacial con la membrana de los microorganismos patógenos, reduciendo su potencial aplicación como alternativa farmacológica (Chousan *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2021; Idris *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 2018). Una opción para mitigar la hidrofobicidad y volatilidad de los AEs, es la encapsulación en polímeros biodegradables y biocompatibles como el Ácido PoliLáctico (PLA), el Ácido Poli (Láctico-co-Glicólico) (PLGA) y el Quitosano (Qs). Estos biopolímeros se encuentran aprobados por la Agencia de Medicamentos y Alimentación (FDA, por sus siglas en inglés) y han sido usados en la industria farmacéutica y alimentaria (K. B. Almeida *et al.*, 2019; Bellich *et al.*, 2016; Scaffaro *et al.*, 2018). Por su parte, K. Almeida *et al.*, en 2019 documentaron la mejora de características fisicoquímicas como la estabilidad térmica y disminución de citotoxicidad en NPs de PLGA cargadas con AE de *Cymbopogon citratus* (K. B. Almeida *et al.*, 2019). Así mismo, Shetta *et al.*, en 2019 sintetizó NPs de Qs con AE de *Mentha piperita* y con AE de *Camellia sinensis*, determinando que el proceso de encapsulación aumentó la estabilidad térmica y la actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus* respecto a los AE (Shetta *et al.*, 2019). La síntesis de NPs se realiza mediante técnicas de nanoprecipitación y emulsificación-evaporación de solventes, siendo la última la que ofrece mejores resultados en términos de

eficiencia de encapsulación, estabilidad física y solubilidad de los AEs o sus componentes (Almnhawy *et al.*, 2021; El-Hammadi *et al.*, 2021; Lastra-Vargas *et al.*, 2023).

Durante los últimos años, el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) se ha enfocado en el estudio de la actividad biológica de diferentes tipos de compuestos, incluyendo AEs y extractos vegetales. Para este estudio se utilizaron AEs que fueron suministrados por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales (CENIVAM). De acuerdo con diferentes estudios realizados, el AE que ha presentado mejores resultados de actividad antimicrobiana, anti-*Quorum Sensing* y anti-biopelículas ha sido el obtenido de *L. origanoides*, denominado para este estudio AE LOT II.

En este proyecto de investigación se determinó la mejor formulación para la síntesis de NPs utilizando los biopolímeros PLA, PLGA y Qs para la encapsulación del AE LOT II. Posteriormente se evaluaron características fisicoquímicas que incluyeron tamaño, índice de polidispersidad (PDI), Potencial Z, morfología, estabilidad térmica, interacción del AE LOT II con cada polímero y perfil de liberación. Finalmente se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana del AE LOT II libre y encapsulado, comprobándose la efectividad de las nanoestructuras en comparación con el AE libre.

1. Marco Conceptual

1.1. Microorganismos patógenos

1.1.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli es un bacilo Gram negativo con un lugar especial en el mundo microbiológico, debido a que puede causar infecciones graves en humanos y animales; también representa una parte importante de la microbiota autóctona de los diferentes huéspedes. Este microorganismo puede actuar como donante y como receptor de genes de resistencia antimicrobiana, por esta razón, el tratamiento para combatirlo se considera uno de los principales desafíos a nivel mundial (CDC, 2019; Poirel *et al.*, 2018; Pumipuntu & Pumipuntu, 2020). En *E. coli*, la adquisición de genes de resistencia esta principalmente asociada a las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y producción de Carbapenemasas, siendo estas últimas las causantes de resistencia a los antibióticos de última generación (Coricaza-Cuaresma *et al.*, 2019; Poirel *et al.*, 2018; Pumipuntu & Pumipuntu, 2020). Además, *E. coli* posee mecanismos para la formación de biopelículas, que a su vez dificultan el tratamiento de las infecciones, constituyendo un reservorio de farmacorresistencia (Zhao *et al.*, 2020), que atrae una vigilancia especial en salud pública.

En Colombia se han realizado estudios para determinar la prevalencia de cepas de *E. coli* que presentan BLEE. Martins *et al* en 2023 documentó la prevalencia de *E. coli* con presencia de genes asociados a producción de BLEE en muestras de carne del municipio de Pamplona. En este estudio se evidencio que el 19 % de las muestras evaluadas presentaron bacterias con genes de BLEE, lo cual apoya la creciente preocupación en salud pública; debido a los posibles brotes de infecciones causados por este microorganismo, así como, la posibilidad de transferencia horizontal de genes de resistencia a través de la cadena alimentaria (Martins *et al.*, 2023). Otro estudio realizado por Hurtado *et al.*, en 2023 documentó la prevalencia de *E.coli* productora de BLEE en

31 hospitales antes y durante la pandemia de COVID-19 en Valle del Cauca, Colombia. Los principales resultados sugirieron que la prevalencia de estos microorganismos disminuyó del 11 % al 9 %, Este resultado se debe a las medidas adoptadas por la emergencia sanitaria causada por COVID-19, razón por la cual es imperativo la vigilancia y acciones que ralenticen el aumento de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (Hurtado *et al.*, 2023).

1.1.2. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

La bacteria *S. aureus* es un coco Gram positivo que se puede encontrar en la microbiota normal de la piel. Es importante debido a su gran impacto en la morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Cervantes *et al.*, 2014). Este microorganismo genera diversas enfermedades infecciosas en piel y tejidos blandos que conducen a endocarditis, osteomielitis, bacteriemia y neumonía letal (Y. Guo *et al.*, 2020). *S. aureus* produce gran variedad de toxinas como la toxina α , la cual activa el dominio de metaloproteinasa que contiene la proteína 10 (ADAM10) promoviendo las infecciones en piel. Por otro lado, la toxina-1 (TSST-1) causa el síndrome de shock tóxico y la enterotoxina estafilocócica (SEs) es una de las causas más frecuentes de intoxicación alimentaria. Así mismo, la capacidad de producir biopelículas en gran variedad de superficies, se ha relacionado con las infecciones nosocomiales que son de difícil tratamiento (Cheung *et al.*, 2021).

S. aureus se caracteriza por adquirir rápidamente mecanismos de resistencia frente a diferentes antibióticos. Esto se debe a la adquisición de plásmidos que codifican para una penicilinas, la cual actúa contra el grupo de β -lactámicos. Este problema trató de evitarse mediante el diseño de penicilinas semisintéticas (metecilina) resistentes a penicilinas. Sin embargo, poco tiempo después de crear este fármaco, el microorganismo generó resistencia por medio del gen *mecA* y adquirió la denominación de *S. aureus* resistente a la metecilina (SARM) (Shajari *et al.*, 2017). Adicionalmente, este patógeno posee la capacidad de formar biopelículas

que le confieren protección frente a los antibióticos, puesto que el antibiótico que se usa llega a las células en una menor concentración afectando su actividad biológica (Parastan *et al.*, 2020). Debido al desarrollo constante de mecanismos de resistencia y a su prevalencia en todo el mundo, SARM representa un reto constante para la salud pública (CDC, 2019; Cervantes *et al.*, 2014; Gostev *et al.*, 2020; Hernández *et al.*, 2019; Poirel *et al.*, 2018).

Por otro lado, en la industria de alimentos *S. aureus* se han identificado problemáticas como la mastitis bovina que genera grandes pérdidas económicas. De esta forma, se han intensificado los estudios sobre los perfiles de resistencia y la búsqueda de nuevos tratamientos antibióticos. Además se han intensificado los controles de calidad microbiológica en la industria alimenticia, con el objetivo de mitigar las posibles infecciones causadas por *S. aureus* con diversos patrones genéticos relacionados con resistencia a antibióticos (Jiménez Velásquez *et al.*, 2020).

1.1.3. *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (*S. Enteritidis*)

Salmonella es un bacilo Gram negativo que se clasifica teniendo en cuenta la serovariedad. Se asocia principalmente a la salmonelosis en humanos. En general esta enfermedad es autolimitada y no requiere tratamiento antibiótico. Sin embargo, existe preocupación por el aumento de algunas cepas que han presentado Multiresistencia a diferentes Antibióticos (MDR, por sus siglas en inglés) en aislamientos de animales (De Toro *et al.*, 2014; Fardsanei *et al.*, 2018). Este es un factor de importancia porque las infecciones ocasionadas por el patógeno se presentan principalmente tras la ingesta de alimentos contaminados y representan un problema de salud pública al identificarse en pacientes que tienen un cuadro grave ocasionado por esta infección (Fardsanei *et al.*, 2018; Pérez-Ardila *et al.*, 2020). Por otro lado, en 2020 Romeu *et al.*, afirma que *S. Enteritidis* puede formar biopelículas que le confieren un factor protector frente a diferentes antimicrobianos y antibióticos que son usados para tratar infecciones de animales en la industria

de los alimentos. En este mismo estudio, se afirma que es posible que *Salmonella* presente resistencia a antibióticos por medio de un fenómeno denominado “resistencia cruzada” (Romeu *et al.*, 2020).

La patogenicidad de los aislamientos de *Salmonella* esta principalmente relacionada con factores de virulencia como adhesión, supervivencia intracelular y expresión de fimbrias, entre otros (Fardsanei *et al.*, 2018). Estos factores de virulencia, la adquisición mecanismos de resistencia a antibióticos y la capacidad de adquirir genes, promueve que *Salmonella* adquiera importancia en salud pública, debido a que es la tercera causa de muertes entre las enfermedades transmitidas por alimentos (Ferrari *et al.*, 2019). Además, las infecciones causadas por este grupo de bacterias son principalmente asociadas a diarrea, dolor abdominal, náuseas y fiebre. Así mismo, la sintomatología se presenta cuando se consume principalmente carnes de cerdo y pollo contaminadas con este patógeno. Como documentaron Vidal *et al.*, en 2023, el uso irracional de los antibióticos se asocia al aislamiento de cepas de *Salmonella* MDR en su análisis de los sistemas de producción de porcinos en Antioquia, Colombia, lo cual hace necesario que se refuerce la vigilancia y la mejora en las prácticas manejo de patologías de estos animales en las granjas colombianas para mitigar un eventual brote que se pueda presentar (Vidal *et al.*, 2023).

1.1.4. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo, ubicuo y es uno de los principales causantes de enfermedades nosocomiales. Además, tiene la capacidad de generar resistencia frente a una gran variedad de antibióticos, debido a mutaciones que sobre expresan β -lactamasas como AmpC, o la pérdida de la porina OprD, como un mecanismo de resistencia al Imipenem y Meropenem (López-Calleja *et al.*, 2019). Por otro lado, también se ha descrito la expresión plasmídica de BLEE. La prevalencia de este microorganismo se encuentra entre 2.6 % y 9.6 % en pacientes hospitalizados

y de consulta externa en Norteamérica, constituyendo también una seria amenaza para la salud pública (CDC, 2019; López-Calleja *et al.*, 2019). Así mismo, el INS en su informe del 2019, afirmó que los porcentajes de resistencia a carbapenémicos oscilaron en el servicio de UCI adulto en un rango entre 25.2 % y 28.7 %, en UCI pediátrica entre 17.2 % y 23.1 % y en UCI neonatal entre 17.9 % y 18.2 % (INS, 2019). Adicionalmente, otro factor relevante en la resistencia de *P. aeruginosa* es su capacidad para formar biopelículas que sirven de barrera protectora para la bacteria frente al sistema inmune del hospedero y a los antibióticos (Karami *et al.*, 2020).

Además, *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos con gran importancia en salud pública, debido a la gran cantidad de mecanismos de resistencia a los antibióticos que posee. Dentro de la resistencia intrínseca se destaca la baja permeabilidad de membrana, producción de bombas de eflujo y producción de enzimas. Por otro lado, los mecanismos de resistencia adquiridos, se asocian principalmente a transferencia horizontal de genes o cambio mutacionales, así mismo, la producción de biopelículas es el principal mecanismo de resistencia adaptativa (Pang *et al.*, 2019). Todos estos mecanismos le permiten al microorganismo sobrevivir en gran diversidad de ambientes. Por otro lado, Hurtado *et al.*, en 2023 documentó que los aislamientos de *P. aeruginosa* resistente se incrementaron con la pandemia de COVID-19 en Valle del Cauca, Colombia, debido a que se incrementó el uso de antibióticos en las UCI de esta región, resaltando la importancia de realizar control de uso de los antibióticos y el monitoreo de este microorganismo (Hurtado *et al.*, 2023).

1.1.5. *Candida sp.*

Candida sp es una levadura que se puede encontrar comúnmente en la microbiota humana y puede ocasionar enfermedades oportunistas, principalmente en pacientes inmunocomprometidos (Bezhenar & Plakhova, 2020; Sharafutdinov *et al.*, 2020). Para tratar las infecciones causadas por

este microorganismo se usa gran variedad de antifúngicos. Sin embargo, estas levaduras producen una biopelícula rígida que les proporciona una resistencia contra los antifúngicos y el sistema inmune del hospedero (Cavalheiro & Teixeira, 2018; Sharafutdinov *et al.*, 2020). Por lo tanto, *Candida sp.* se ha convertido en uno de los principales microorganismos asociados a infecciones oportunistas intrahospitalarias (CDC, 2019; San Miguel *et al.*, 2019; Sharafutdinov *et al.*, 2020). Entre las especies más prevalentes en infecciones se encuentran *Candida albicans* y *Candida auris*.

1.1.5.1. *Candida albicans* (*C. albicans*)

C. albicans se encuentra principalmente en mucosas orales, gastrointestinales y vaginales. Este microorganismo puede llegar a causar diversas patologías en individuos principalmente inmunocomprometidos. Los pacientes pueden presentar infecciones leves hasta infecciones graves generando una morbilidad significativa (Swidergall & LeibundGut-Landmann, 2022). Por lo cual, es uno de los principales microorganismos aislados de pacientes en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Uno de los factores de virulencia de *C. albicans* es su transformación morfológica, dado que existen al menos tres morfologías asociadas, las cuales son levadura, pseudohifa y forma filamentosa (Y. Li *et al.*, 2019). Adicionalmente, las patologías asociadas a *C. albicans* se tratan generalmente con fluconazol, ocasionando que, a largo plazo promuevan la aparición de cepas con susceptibilidad disminuida, dificultando el tratamiento y remisión de pacientes (Ceballos-Garzon *et al.*, 2020). En Europa entre los años 2000 y 2019 el número de candidemias fue de 79 casos por día y de acuerdo con el CDC la mortalidad de candidemia hospitalaria asciende al 25 % (Destrini *et al.*, 2023). Así mismo, las infecciones causadas por este microorganismo en Colombia se reflejan principalmente en pacientes con hospitalizaciones más prolongadas, generando mortalidades que oscilan entre el 49 % y 71 % (Motoa *et al.*, 2017).

1.1.5.2. *Candida auris* (*C. auris*).

C. auris es una levadura que fue identificada por primera vez en Japón en 2009 (Satoh *et al.*, 2009). Así mismo, es un microorganismo que se encuentra bajo vigilancia epidemiológica por el CDC (CDC, 2019), debido a que persiste en el ambiente por largo tiempo y presenta resistencia a los antifúngicos convencionales (Escandón *et al.*, 2019). Algunas de las patologías asociadas a *C. auris* son: candidemia, neumomicosis y endocarditis, entre otros (Bezhenar & Plakhova, 2020). El tratamiento de las patologías causadas por este microorganismo se ve limitado debido a la resistencia al fluconazol y susceptibilidad variable a otros azoles, dificultando el tratamiento en particular en pacientes con comorbilidades (Ahmad & Alfouzan, 2021). El CDC informó un aumento de 329 casos en 2018 a 1,012 caso en 2021 en Estados Unidos. Además, durante el 2021 se registraron 2,386 pacientes infectados por este microorganismo (Sanyaolu *et al.*, 2022). El INS informó que del 2016 al 2022 se han recibido 2,119 aislamientos de pacientes de los cuales el 81.5 % corresponden a casos clínicos y el restante a colonización (Escandón *et al.*, 2023).

Por otro lado, Kilburn *et al.*, en 2022 ha documentado que los casos de pacientes infectados con *C. auris* pan resistente aumenta con el paso de los años (Kilburn *et al.*, 2022). Además, la resistencia de los aislamientos de *C. auris* a los tratamientos actuales genera que los investigadores procuren por buscar estrategias novedosas como la combinación de fármacos para promover la supervivencia de pacientes que estén en riesgo de presentar una infección con esta levadura. Además, se debe tener en cuenta la vigilancia de estas infecciones, donde es indispensable que los pacientes sean monitoreados para detectar una mejoría clínica, así como, realizar constantemente pruebas de susceptibilidad, aumentar la conciencia sobre la infección y mejorar los métodos de diagnóstico (Ademe & Girma, 2020).

1.2. Aceites Esenciales (AEs)

Durante los últimos años se ha estudiado una gran variedad de AEs que presentan actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos patógenos. Entre ellos se encuentran los derivados de las plantas como *Citrus limon* (AE de limón) (Hasani *et al.*, 2018), *Bunium persicum* (AE de comino negro) (Yadav *et al.*, 2020), *Camellia sinensis* (AE de té verde), *Mentha piperita* (AE de menta) (Shetta *et al.*, 2019) y *L. origanoides* (AE de orégano) (Cáceres *et al.*, 2020), entre otros. El AE de limón se han usado con éxito frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *S. epidermidis*, así como, bacterias Gram negativas que incluyen *Salmonella typhimurium* y *E. coli*, con Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB) entre 1.6 y 3.2 mg/mL, respectivamente. Además, este AE se ha implementado como agente larvicida (Wu *et al.*, 2021). Por otro lado, la CMB del AE extraído de *Thymus vulgaris* L. fue de 0.5 mg/mL frente a *P. aeruginosa*, asociando el efecto biológico al timol (componente principal) (Liu *et al.*, 2021). Otros estudios han evaluado *In vitro* tratamientos contra *Candida albicans*, empleando el AE extraído de *Ruta graveolens* con Concentraciones Mínimas Fungicidas (CMF) en el rango de 8.2 a 12.3 µg/mL, a las 24 y 48 h, respectivamente (Donadu *et al.*, 2021).

1.2.1. Actividad antimicrobiana del AE LOT II

El AE derivado de la planta aromática *L. origanoides* se compone principalmente de Carvacrol (41.08%), p-cimeno (14.34%), Timol (13.06%) y γ -Terpineno (12.10%) (R. R. Almeida *et al.*, 2018). Entre estos, el timol y el carvacrol han cobrado importancia ya que poseen actividad antibacterial y antifúngica contra microorganismos patógenos. El estudio realizado por Cáceres *et al.*, describe que el AE de *L. origanoides* autóctona de Colombia, tiene en mayor proporción Timol (32.7%) y Carvacrol (18.8%), exhibiendo mejores resultados de actividad antibacteriana al ser comparados con otros AE (Cáceres *et al.*, 2020). Adicionalmente, otros estudios documentados

indicaron que, en efecto, el timol y carvacrol del AE de *L. origanoides* mostraron un efecto inhibitorio frente al crecimiento de bacterias patógenas como de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* y *Candida albicans* (Corona-Gómez *et al.*, 2022; Loaiza Oliva *et al.*, 2023). El timol y el carvacrol son moléculas que se han estudiado a profundidad debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Esto es debido a que su mecanismo es interactuar con la membrana celular, causando daños que incrementan la permeabilidad, afectando diferentes proteínas e inhibiendo la respiración o alterando los procesos de transporte de iones, entre otros (Pateiro *et al.*, 2021).

Por otro lado, para este trabajo de investigación se usó el AE LOT II, con base en el estudio de selección del mejor AE que se hizo luego de probar la actividad biológica de 55 AE en investigaciones previas realizadas por el grupo de investigación. Así mismo, el CENIVAM realizó la clasificación del AE LOT II de acuerdo con su composición relativa como quimiotipo Timol. La actividad antimicrobiana del AE se debe a los componentes mayoritarios descritos en su composición relativa (timol y carvacrol), así como también con la interacción que pueden tener con los componentes minoritarios (Cáceres *et al.*, 2020). El timol y carvacrol son compuestos fenólicos, donde los grupos hidroxilos son importantes en la actividad antimicrobiana (Kachur & Suntres, 2020). Estos compuestos fenólicos han sido descritos ampliamente en la literatura por su actividad antioxidante, antimicrobiana y antiviral, entre otros (Rathod *et al.*, 2021). Adicionalmente, por su funcionalidad dual puesto que inhibe el crecimiento de microorganismos Gram negativos y Gram positivos (Khan *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022).

1.3. Polímeros biodegradables y biocompatibles

Los biopolímeros son materiales que se caracterizan por su biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo cual le confiere la capacidad de interactuar con sistemas vivos, en aplicaciones específicas, como procedimientos terapéuticos (Ghasemi-Mobarakeh *et al.*, 2019). Así mismo, la biodegradabilidad es la capacidad de degradación biológica (transformación química a través de las vías metabólicas de los seres vivos) hasta compuestos más simples (Hayes, 2017; Rai *et al.*, 2021). Los biopolímeros se consideran “Generalmente Reconocidos Como Seguros” (GRAS, por sus siglas en inglés), de acuerdo con la descripción que ha hecho la FDA (FDA, 2019). Adicionalmente, los biopolímeros se caracterizan por presentar un potencial significativo en la encapsulación de compuestos bioactivos, como los AEs (Q. Guo *et al.*, 2021). La encapsulación de AEs mediante polímeros aumenta la solubilidad, actividad biológica y tiempo de almacenamiento (Taban *et al.*, 2020); además, protección frente a factores ambientales como la oxidación y volatilización, aumentado la estabilidad y el perfil de liberación *in vitro* (permitiendo controlar la cantidad de AE liberado) (Sagiri *et al.*, 2016). Así mismo, la capacidad de carga y liberación del AE son algunas de las limitaciones en el uso de los biopolímeros, debido a que impactan la cantidad de componente activo necesario para realizar la actividad biológica (Park, 2013). Entre los biopolímeros más utilizados se encuentran PLA, PLGA y Qs. A continuación, se presenta una breve descripción de cada uno.

1.3.1. Ácido Poli Láctico (PLA)

El Ácido Poli Láctico (PLA), se caracteriza por su resistencia mecánica, durabilidad y transparencia en comparación con otros polímeros (Jem & Tan, 2020; Singhvi *et al.*, 2019). Además, constituye un biopolímero con características de biodegradabilidad y biocompatibilidad (Kumari *et al.*, 2010; Rehman *et al.*, 2020). Uno de los usos del PLA es en la encapsulación de

fármacos. El PLA tiene la capacidad de escindirse en unidades monoméricas de ácido láctico mediante procesos metabólicos en el cuerpo humano (Kumari *et al.*, 2010). Adicionalmente, este biopolímero ha sido usado para encapsular gran variedad de moléculas con actividad biológica como péptidos, metales, antibióticos y AEs, entre otros (Assadpour & Mahdi Jafari, 2019; Jiang *et al.*, 2020; Scaffaro *et al.*, 2018). En 2019 Dusankova *et al.*, usó la técnica de evaporación de solvente de aceite-agua para sintetizar microesferas de PLA cargadas con diferentes AE. Donde obtuvieron micropartículas esféricas con tamaños entre 1.5 y 9.5 μm y una eficiencia de encapsulación de 76 % (p/p) (Dusankova *et al.*, 2019). Por otro lado, es importante resaltar que este biopolímero se ha usado para cargar AE produciendo nanofibras o películas con alto contenido de carga, eficiencia de atrapamiento del AE y actividad antimicrobiana como se observa en la Tabla 1. La presencia de PLA disminuye la velocidad de degradación del AE, por la protección contra el oxígeno, temperatura, humedad y luz; también mejora la solubilidad en agua, propiedades antioxidantes y el perfil de liberación *in vitro*, indicando que el PLA es un material prometedor para la estabilización del AE (Jiang *et al.*, 2020; Rezaei *et al.*, 2019; Wongkanya *et al.*, 2020).

Tabla 1

Estudios nanoencapsulación de AEs con actividad antimicrobiana en PLA

Aceite Esencial (AE)	Polímero	Microorganismo	Actividad Antimicrobiana	Autores
<i>Citrus bergamia, cymbopogon citratus, Salvia rosmarinus y sygium aromaticum</i>	PLA (Nanofibras)	<i>E. coli</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	Reducción de más de dos unidades logarítmicas de crecimiento bacteriano	(Qin <i>et al.</i> , 2017)
Carvacrol	PLA (NPs)	<i>E. Coli, S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>	Reducción de la CMB, excepto contra <i>S. aureus</i>	(Niza <i>et al.</i> , 2020)
Tomillo	PLA (nanofibras)	<i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	Tasa de inhibición es >99 % para ambas bacterias	(Min <i>et al.</i> , 2021)

Aceite Esencial (AE)	Polímero	Microorganismo	Actividad Antimicrobiana	Autores
Cinamaldehído	PLA (película)	<i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	Inhibe el 89.67 % y 100 % de crecimiento, respectivamente	(Q. Li <i>et al.</i> , 2023)
<i>Thymus daenensys</i>	PLA (Nanofibras)	<i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	Reduce menos del 70 % de la viabilidad celular contra <i>E. coli</i> y más del 70 % contra <i>S. aureus</i>	(Bamian <i>et al.</i> , 2023)

1.3.2. Ácido Poli (Láctico-co-Glicólico) (PLGA)

Es uno de los biopolímeros biodegradables más utilizados, está constituido por ácido láctico y ácido glicólico (Kumari *et al.*, 2010), diferenciándose del PLA por incluir en su estructura grupos glicólicos. Las propiedades como rigidez, hidrofobicidad y degradación lenta del PLGA se pueden ajustar en función de la proporción de sus monómeros ácidos láctico y ácido glicólico (Almnhawy *et al.*, 2021). El PLGA ha sido ampliamente utilizado para encapsular productos naturales debido a su excelente biocompatibilidad, biodegradación, bioseguridad, capacidad para controlar la cinética de liberación del fármaco y su posible funcionalización (Swider *et al.*, 2018). Además, es uno de los vehículos de administración de fármacos más empleado (Su *et al.*, 2021). El PLGA también ha sido documentado para la síntesis de NPs de PLGA cargadas con AEs. El PLGA cargado con AE de *Trachyspermum Ammi* ha sido documentado en un estudio para el tratamiento contra el cáncer. Las Nps exhibieron un impacto citotóxico específico, induciendo la apoptosis en células de cáncer de colon humano (Almnhawy *et al.*, 2021). También, han empleado PLGA para la síntesis NPs cargadas de cinamaldehído, AE de canela contra *Candida albicans*. En el estudio se documentó un mayor efecto fungicida al emplear las NPs que el AE libre, asociado a una menor cantidad de cinamaldehído en las NPs (Gursu *et al.*, 2022). Así mismo, se ha empleado el PLGA en la síntesis de NPs cargada de AE contra microorganismos como *S. aureus* y *S. enterica*

como se muestra en la **Tabla 2**. Al igual que el PLA, el PGLA aumenta la estabilidad de las NPs cargadas con AE, confiriéndole protección térmica y ambiental al AE (Mokhtareizadeh & Homayouni Tabrizi, 2022).

Tabla 2

Estudios de encapsulación de AEs con actividad antimicrobiana en PLGA

Aceite Esencial (AE)	Polímero	Microorganismo	Concentración Mínima Microbicida (CMM) ($\mu\text{g/mL}$)		Autores
			AE Libre	AE Encapsulado	
Extracto de corteza de canela	PLGA	<i>S. enterica</i>	1000	>549.23	(Hill <i>et al.</i> , 2013)
		<i>Listeria monocytogenes</i>	1000	>549.23	
Cinamaldehido (<i>Cinnamomum verum</i>)	PLGA	<i>S. aureus</i>	1024	>64	Pola <i>et al.</i> , 2019
		<i>S. enterica</i>	1024	>64	
Hinojo (<i>Foeniculum vulgare</i>)	PLGA	<i>S. aureus</i>	12	3	(Alam <i>et al.</i> , 2022)
Timol (<i>Thymus vulgaris</i>)	PLGA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	512	4	(Ndezo Bisso <i>et al.</i> , 2022)
Cinamaldehido	PLGA	<i>Candida albicans</i>	350	200	(Rizzo <i>et al.</i> , 2023)
		<i>Candida glabrata</i>	500	400	

1.3.3. Quitosano (Qs)

Es un biopolímero derivado de la quitina, que ha sido empleado en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y ausencia de toxicidad (Bellich *et al.*, 2016). Este biopolímero se ha usado para encapsular gran variedad de AEs que incluyen los de menta, canela, tomillo, orégano y té verde, entre otros, contra diversos microorganismos como se muestra en la Tabla 3 (Muxika *et al.*, 2017). Las NPs de quitosano cargadas con AE de clavo presentaron actividad antimicrobiana contra

L. monocytogenes y *S. aureus*. El quitosano mejoró la estabilidad del AE de clavo, mejorando la dispersión en medios acuosos (Hadidi *et al.*, 2020). También han documentado películas de quitosano con AE con potencial aplicación en la industria alimentaria. Estas biopelículas exhiben excelentes propiedades antimicrobianas, extendiendo la vida útil de los alimentos (Zhang *et al.*, 2021). Existen diversas técnicas para la elaboración de nanopartículas basadas en este material (Ghaderi-Ghahfarokhi *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2010). Una de ellas, la reticulación iónica permite la conformación de nanopartículas más homogéneas que sirven como portadoras de AE, gracias a la presencia de grupos amino que cargan positivamente la nanopartícula de QS, permitiendo reticular el polímero mediante el uso de iones cargados negativamente como el tripolifosfato de sodio (TPP) (Shetta *et al.*, 2019). En la **Tabla 3**, se presentan algunos estudios relacionados con la nanoencapsulación de AEs con actividad antimicrobiana en Quitosano.

Tabla 3

Estudios previos de nanoencapsulación de AEs con actividad antimicrobiana en Quitosano

Aceite Esencial (AE)	Polímero	Microorganismo	Concentración Mínima Microbicida (CMM) (µg/mL)		Autores
			AE Libre	AE Encapsulado	
Chintul (<i>Cyperus articulatus</i>)	Qs	<i>S. aureus</i>	25	15	Kavaz <i>et al.</i> , 2019
		<i>E. coli</i>	20	10	
Té verde (<i>Camellia sinensis</i>)	Qs	<i>S. aureus</i>	>5440	570	Shetta <i>et al.</i> , 2019
		<i>E. coli</i>	5440	1150	
Menta (<i>Mentha piperita</i>)	Qs	<i>S. aureus</i>	1360	1110	
		<i>E. coli</i>	2720	>2720	
Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	Qs	<i>P. fluorescens</i>	>1500	750	Mohammadi <i>et al.</i> , 2020
		<i>E. coli</i>	>1500	1500	
		<i>C. albicans</i>	512	256	

Aceite Esencial (AE)	Polímero	Microorganismo	Concentración Mínima Microbica (CMM) ($\mu\text{g/mL}$)		Autores
			AE Libre	AE Encapsulado	
Geranio (<i>Pelargonium graveolens</i>)		<i>C. parapsilosis</i>	128	32	dos Santos <i>et al.</i> , 2020
		<i>S. aureus</i>	4000	60	
Orégano (<i>origanum vulgare</i>)	Qs	<i>E. coli</i>	4000	120	Granata <i>et al.</i> , 2021
		<i>L. monocytogenes</i>	4000	30	
Tomillo (<i>Thymus capitatus</i>)		<i>S. aureus</i>	2000	60	
		<i>E. coli</i>	2000	60	
Timoquinona (<i>Nigella sativa</i>)	QS	<i>L. monocytogenes</i>	2000	30	
		<i>E. coli</i>	1000	292	
		<i>P. aeruginosa</i>	>1000	417	Mondéjar-López <i>et al.</i> , 2022
<i>S. aureus</i>	>1000	333			
		<i>C. albicans</i>	333	250	

1.4. Nanoencapsulación

La nanoencapsulación de diferentes moléculas se ha impulsado en los últimos años, debido a las ventajas que proporciona sobre la actividad biológica como la estabilidad frente a factores ambientales (pH, oxígeno, luz, temperatura, humedad) generando una barrera entre el componente activo y el medio ambiente. Así mismo, la nanoencapsulación le confiere estabilidad al componente activo, reduciendo la fotodegradación, volatilización y oxidación (Idris *et al.*, 2015). La nanoencapsulación de AEs utilizando polímeros naturales y sintéticos ha sido previamente documentada (Albuquerque *et al.*, 2022). Se destacan los biopolímeros PLA, PLGA y Qs, los cuales se han descrito ampliamente en la literatura por su capacidad para encapsular AEs, proporcionar estabilidad al aceite y mejorar propiedades antimicrobianas (Prakash *et al.*, 2018; Rezaei *et al.*, 2019).

La nanoencapsulación de AEs puede llevarse a cabo mediante procesos de precipitación o también llamados métodos de deposición interfacial. También técnicas como secado en frío, o utilizando aspersión, electrohilado y gelificación iónica, entre otros. El tipo de metodología a emplear depende de las propiedades de las NPs que se requieran como el tamaño, la forma, el tipo de NPs polvo o gel y la afinidad entre la matriz polimérica y el AE (Weisany *et al.*, 2022). Una de las metodologías más empleadas en la síntesis de NPs cargadas con AE es la emulsificación-evaporación de solvente. Esta metodología ha demostrado ser la más adecuada dado que proporciona una eficiencia de encapsulación mayor en comparación a la metodología de precipitación (El-Hammadi *et al.*, 2021). Consiste en emplear emulsiones simples de agua/aceite o agua/aceite/agua y es de gran utilidad para la encapsulación de compuestos hidrofóbicos en soluciones acuosas, donde se busca obtener una emulsión por medio de homogenización o sonicación (Swider *et al.*, 2018).

2. Pregunta de investigación

¿La nanoencapsulación del Aceite Esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo Timol-Carvacrol (LOT II) en polímeros biodegradables y biocompatibles aumentará la estabilidad, disponibilidad y actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida* sp?

3. Hipótesis

El Aceite Esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo Timol-Carvacrol (LOT II) nanoencapsulado en polímeros biodegradables y biocompatibles aumenta la estabilidad, disponibilidad y actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida* sp.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Estudiar el efecto de la nanoencapsulación del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo Timol-Carvacrol (LOT II) en polímeros biodegradables y biocompatibles sobre la estabilidad, disponibilidad y actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida* sp.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la nanoencapsulación del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo Timol-Carvacrol (LOT II) en polímeros biodegradables y biocompatibles aprobados por la FDA.
- Determinar las propiedades físico - químicas (tamaño, carga, forma, perfil de liberación, estabilidad térmica) y antimicrobianas (CMI, CMM) de las nanocápsulas de AE de *Lippia origanoides* quimiotipo Timol-Carvacrol.
- Comparar la actividad antimicrobiana del AE de *Lippia origanoides* quimiotipo Timol-Carvacrol (LOT II) nanoencapsulado y sin encapsular, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida* sp.

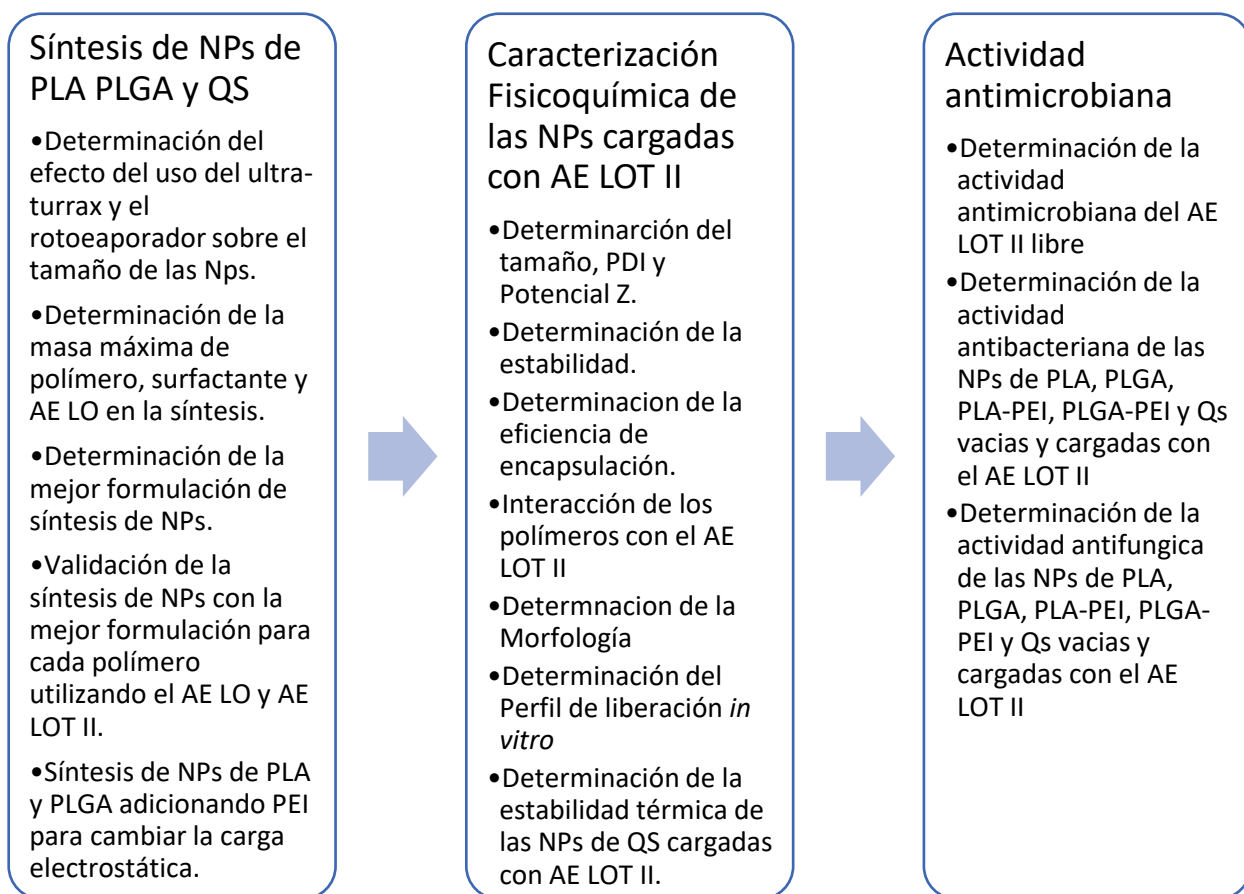
5. Materiales y Métodos

Para el desarrollo de la metodología experimental se implementó el esquema de trabajo que se presenta en la **Figura 1**. Para el primer objetivo, la metodología se centró en la determinación de las mejores condiciones experimentales y relaciones másicas entre un AE de *Lippia origanoides* (LO) y cada uno de los polímeros probados (PLA, PLGA y Quitosano) que serían usados para la síntesis de NPs poliméricas cargadas con aceite. El AE de LO se utilizó como modelo para la estandarización y obtención de la mejor formulación de síntesis, debido a que todos los trabajos de investigación del laboratorio utilizaban el mejor AE, que era el de LOT II, limitando la cantidad disponible. Por otro lado, se probó un procedimiento adicional, el cual consistió en la síntesis de NPs de PLA y PLGA adicionando Polietilenimina (PEI) para aumentar la actividad antimicrobiana mediante el cambio de la carga electrostática de las NPs.

Posteriormente, se comprobó que el proceso de síntesis no tenía variación estadísticamente significativa entre el AE de LO y el AE de LOT II. A continuación, se realizaron las caracterizaciones fisicoquímicas de las NPs de cada polímero cargado con AE de LOT II. Finalmente, se comprobó la actividad antimicrobiana del AE LOT II libre y encapsulado.

Figura 1

Esquema metodológico para desarrollar el proyecto de investigación



5.1. Materiales

Los biopolímeros (PLA, PLGA y QS), el Alcohol Polivinílico (PVA) y la Polietilenimina (PEI) fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich. El tripolifosfato de sodio (TPP) se adquirió de la casa comercial Alfa Aesar. Todos los demás reactivos y solventes utilizados para la síntesis de NPs fueron grado analítico. El AE LO usado para realizar las actividades del primer objetivo fue suministrado por el laboratorio de investigación dado que era un AE extraído de la misma planta y había mayor cantidad. El AE de *L. origanoides* Quimiotipo Timol (AE LOT II) fue suministrado por el CENIVAM. Se utilizaron las siguientes cepas: *E. coli* ATCC 25922,

S. aureus ATCC 29213, *S. enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 10231 y *C. auris* CDC B11903.

5.2. Métodos

5.2.1. Síntesis de NPs de PLA

Se realizaron síntesis preliminares para estandarizar la síntesis de las NPs biopoliméricas. Inicialmente, se determinó el efecto del uso del Ultra Turrax (UT) y el Rotoevaporador (RTEV) sobre el tamaño de las NPs; así como, la masa máxima de los componentes de tal forma que no se presentara precipitación. En este sentido, se empleó el método de evaporación de solventes para encapsular el AE de LO con algunas modificaciones (Dusankova *et al.*, 2019). Inicialmente, se preparó la Fase Acuosa (FA) disolviendo 33.34 mg de PVA en 4 mL de agua tipo I. Luego se preparó la Fase Oleosa (FO) y en esta se disolvieron 6.66 mg de PLA en 0.4 mL de cloroformo. Posteriormente, se adicionó la FO en la FA y se emulsionó mediante un sonicador de ultrasonido de punta durante 5 min (pulsos 3:7, 3 s encendido, 7 s apagado) a una amplitud del 50 % (Procesador ultrasónico Cole and Palmer CPX130). El disolvente orgánico se evaporó mediante el uso de un rotoevaporador durante 1 h, 200 rpm, 25 °C y 60 hPa. Luego, las NPs se centrifugaron (20 min., 20 °C, 9096 xg) (Thermo Scientific IEC CL31R) y se lavaron con agua tipo I tres veces. A continuación, las NPs se resuspendieron en agua tipo I y se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Las NPs cargadas con AE se sintetizaron siguiendo la metodología anteriormente descrita, donde el biopolímero y el AE fueron disueltos en la FO para posteriormente mezclarlo con la FA y continuar con la metodología (Dusankova *et al.*, 2019).

Para determinar la masa máxima de PLA, PVA y AE en la síntesis de NPs de PLA-AE evitando la precipitación, se usaron las siguientes cantidades: 5 mg de PLA – 25 mg de PVA, 6.6 mg de PLA – 33.34 mg de PVA y 8.33 mg de PLA – 41.67 mg de PVA.

5.2.1.1. Determinación de la cantidad de PLA, PVA y AE en la síntesis de NPs de PLA

Se realizó un diseño experimental 2^3 en la síntesis de NPs de PLA donde los factores de estudio fueron la cantidad de PLA, PVA y AE. Cada factor tubo dos niveles, 12 y 30 mg de PVA, 6 y 10 mg de PLA y, 0.5 y 4 mg de AE LO, de acuerdo con la **Tabla 4**. Las variables de respuesta fueron determinadas por medio de la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) en el equipo Zeta-Sizer Nano ns90 con los valores mínimos y máximos que se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 4

Distribución de los niveles mínimos y máximos de los factores (PVA, PLA y AE LO) de acuerdo con el diseño experimental 2^3

Ensayo	PVA		PLA		AE LO	
	Masa (mg)	Nivel	Masa (mg)	Nivel	Masa (mg)	Nivel
1	30	1	10	1	0.5	-1
2	30	1	6	-1	4	1
3	12	-1	6	-1	0.5	-1
4	12	-1	10	1	4	1
5	12	-1	6	-1	4	1
6	12	-1	10	1	0.5	-1
7	30	1	6	-1	0.5	-1
8	30	1	10	1	4	1

Tabla 5

Valores mínimos (m) y máximos (M) de las variables de respuesta (tamaño, PDI, Pz y % EE) analizadas a partir del promedio de los resultados

Variable	unidades	objetivo	M	M
Tamaño	nm	minimizar	250	500
PDI		minimizar	0.1	0.4
Pz	mV	minimizar	-25	-10
EE	%	maximizar	50	90

5.2.1.2. Validación de la mejor formulación de síntesis de NPs de PLA con AE LO y AE LOT II

De acuerdo con el resultado del diseño experimental se obtuvo la mejor formulación de síntesis de NPs de PLA. A partir de esta formulación, se realizaron síntesis por triplicado usando AE LO y AE LOT II y se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas entre las NPs sintetizadas con los AEs.

5.2.1.3. Modificación química de las NPs de PLA con PEI

Con el objetivo de cambiar la carga electrostática de las NPs de PLA se realizaron síntesis agregando PEI. Para esto, se adicionó 48 mg de PEI (50 % p/v) tanto a las NPs vacías como cargadas con el AE LOT II y se continuo con la metodología descrita en el numeral 5.2.1.

5.2.2. Síntesis de NPs de PLGA

La síntesis de NPs de PLGA se realizó mediante la técnica de evaporación de solventes empleada en la síntesis de NPs de PLA, con algunas modificaciones (Dusankova *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019). Inicialmente, se preparó la FA adicionando 20 mg de PVA en 4 mL de agua tipo I. Después, se preparó la FO disolviendo 15 mg de PLGA en 0.4 mL de diclorometano (DCM). Posteriormente, se emulsionó la FO en la FA mediante un emulsificador de ultrasonido de punta durante 7.5 min (pulsos 3:7, 3 s encendido, 7 s apagado) a una amplitud del 80 % (Procesador ultrasónico Cole and Palmer CPX130). El disolvente orgánico se evaporó mediante el uso de un rotoevaporador durante 20 min, 200 rpm, 25 °C y 100 hPa. Las NPs PLGA se centrifugaron (20 min., 20 °C, 3136 xg) (Thermo Scientific IEC CL31R) y lavaron con agua tipo I tres veces. A continuación, las NPs se resuspendieron en agua tipo I y se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Las NPs cargadas con AE se sintetizaron siguiendo la metodología anteriormente descrita, donde

el biopolímero y el AE fueron disueltos en la FO para posteriormente mezclarlo con la FA y continuar con la metodología (Dusankova *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019).

5.2.2.1. Determinación de la cantidad de PLGA, PVA y AE en la síntesis de NPs de PLGA

Se realizó un diseño experimental 2^3 en la síntesis de NPs de PLGA donde los factores de estudio fueron la cantidad de PLGA, PVA y AE. Cada factor tubo dos niveles, 15 y 20 mg de PVA, 5 y 15 mg de PLGA y, 1 y 4 mg de AE LO, de acuerdo con la **Tabla 6** **Tabla 7**.

Tabla 6

Distribución de los niveles mínimos y máximos de los factores (PVA, PLGA y AE de LO) de acuerdo con el diseño experimental 23. Las variables de respuesta fueron analizadas por DLS con los valores mínimos y máximos que se presentan en la **Tabla 7**.

Tabla 6

Distribución de los niveles mínimos y máximos de los factores (PVA, PLGA y AE de LO) de acuerdo con el diseño experimental 2^3

Ensayo	PVA		PLGA		AE	
	Masa (mg)	Nivel	Masa (mg)	Nivel	Masa (mg)	Nivel
1	15	-1	15	1	1	-1
2	20	1	5	-1	4	1
3	15	-1	15	1	4	1
4	15	-1	5	-1	4	1
5	20	1	15	1	1	-1
6	20	1	15	1	4	1
7	15	-1	5	-1	1	-1
8	20	1	5	-1	1	-1

Tabla 7

Valores mínimos (m) y máximos (M) de las variables de respuesta (tamaño, PDI, Pz y % EE)

analizadas a partir del promedio de los resultados

Variable	unidades	objetivo	m	M
Tamaño	nm	minimizar	250	500
PDI		minimizar	0.1	0.4
Pz	mV	minimizar	-25	-10
EE	%	maximizar	50	90

5.2.2.2. Validación de la mejor formulación de síntesis de NPs de PLGA con el AE LO y AE LOT II

De acuerdo con el resultado del diseño experimental se obtuvo la mejor formulación de síntesis de NPs de PLGA. A partir de esta formulación, se realizaron síntesis por triplicado usando AE LO Y AE LOT II y se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas entre las Nps sintetizadas con los AEs.

5.2.2.3. Modificación química de las NPs de PLGA con PEI

Con el objetivo de cambiar la carga electrostática de las NPs de PLGA se realizaron síntesis agregando PEI. Para esto, se adicionó 48 mg de PEI (50 % p/v) tanto a las NPs vacías como cargadas con el AE LOT II y se continuo con la metodología descrita en el numeral 5.2.2.

5.2.3. Síntesis de NPs de Qs

Las NPs de QS cargadas del AE se prepararon con base en el método descrito por Shetta *et al* (2019) con algunas variaciones. Para ello, se preparó la FA que consiste en una solución de quitosano (1% p/v) disolviendo el Qs en ácido acético glacial (1 % p/v) manteniendo agitación constante (200 rpm por agitador magnético Marca VELP) durante 2 h a temperatura ambiente (25 °C). Luego, se añadió Tween 80 y se agitó con 5 ml de solución de quitosano (proporción quitosano: Tween 80 de 1:1,12 p/p) durante 2 h a 45 °C formando la emulsión en fase acuosa. A

continuación, se agregó el AE LO (50 mg) en 0.5 ml de DCM para obtener una proporción de 1:1 p/p (QS:AE), formando la FO de la emulsión. Posteriormente, se homogenizaron la FO y la FA mediante agitación magnética a 1100 rpm (agitador magnético Marca VELP) durante 3 h. Para la etapa de reticulación del polímero de quitosano, se usó el método de gelificación iónica. A 5 ml de emulsión, se añadieron 5 ml de solución acuosa de TriPolifosfato de sodio (TPP, por sus siglas en inglés) (0,4% p/v) frío, manteniendo agitación magnética a 500 rpm (agitador magnético Marca VELP). Posteriormente, se homogenizó la suspensión durante 40 min a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 10000 xg, a 4 °C durante 30 min; luego, se lavó varias veces con agua tipo I. Las NPs se dispersaron en agua tipo I mediante un sonicador de punta durante 4 min (pulsos 1:2, 1 s encendido y 2 s apagado) a una amplitud del 60 % en un baño de hielo para obtener una suspensión homogénea (Procesador ultrasónico Cole and Palmer CPX130). Finalmente, la suspensión se almacenó a 4 °C. Las NPs vacías se sintetizaron del mismo modo, pero sin el AE (Shetta *et al.*, 2019).

5.2.3.1. Determinación de la cantidad de AE en la síntesis de NPs de Qs

Para el caso de la síntesis de NPs de Qs se realizó una comparación de la cantidad de AE LO usado en la síntesis. Las cantidades empleadas fueron 25, 50 y 75 mg del AE LO. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) donde se determinó la mejor formulación de síntesis de NPs de Qs, donde las variables de respuesta fueron el tamaño, PDI y Potencial Z, determinadas por DLS.

5.2.3.2. Validación de la mejor formulación de síntesis de NPs de Qs cargadas de AE LO y AE LOT II

El ANOVA arrojó la mejor cantidad de AE, la cual fue usada para la síntesis de NPs de Qs cargadas con AE LO y AE LOT II. Se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas en las características de las NPs de Qs con los AEs.

5.2.4. Análisis Físicoquímico de las NPs de PLA, PLGA y Qs

5.2.4.1. Determinación de la estabilidad de las NPs

Se determinó la estabilidad de las NPs de cada biopolímero cargado con el AE LOT II. Para esto, se determinó el tamaño, PDI y Potencial de las NPs sintetizadas con el DLS. Se realizó una dilución 1:100 de cada NPs sintetizada en agua tipo I. La medición de los parámetros se realizó cada 15 días durante dos meses o hasta que el tamaño, PDI o potencial Z presentara una diferencia estadísticamente significativa en al menos un parámetro, en relación con la medición del día cero.

5.2.4.2. Eficiencia de encapsulación (% EE)

La eficiencia de encapsulación se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis en el equipo UV-1800 Shimadzu. Para degradar las NPs y obtener el AE encapsulado, se agregó 0.5 ml de solución de NPs de PLA a 1.5 ml de Cloroformo y 0.5 ml de NPs de PLGA y QS a 1.5 ml de Diclorometano, respectivamente. Posteriormente, se realizó la cuantificación determinando la concentración de AE LOT II a una longitud de onda de 274 nm, teniendo en cuenta la curva de calibración que se elaboró para el AE LOT II en cada solvente (Apéndice A). Para determinar la % EE se usó la ecuación 1 (Shetta *et al.*, 2019).

$$(1) \quad EE(\%) = \frac{\text{Cantidad total de AE cargado}}{\text{Cantidad total de AE}} \times 100$$

5.2.4.3. Interacción del AE con el polímero

El análisis de la interacción del AE con el polímero se realizó mediante Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR) utilizando el equipo Agilent Technologies, Cary 630 FTIR. Se realizaron síntesis de las NPs de cada biopolímero cargadas con el AE LOT II. Luego, se liofilizaron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.6 hPa durante 36 h en el equipo VIRTIS adVantage Plus ES-53. Finalmente, se analizaron por FTIR en el rango de $4000\text{ a }500\text{ cm}^{-1}$, con 32 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} (Hadidi *et al.*, 2020).

5.2.4.4. Perfil de liberación *in vitro*

Para realizar esta determinación, se agregó 0.1 ml de cada solución de NPs en 1.9 ml de buffer fosfato salino (PBS) a $\text{pH }7.2$ y la suspensión se centrifugó de acuerdo con las condiciones de síntesis de cada NPs. Se extrajo el sobrenadante y se resuspendió las NPs en PBS fresco empleando vortex. Posteriormente, esta suspensión se incubó en agitación a 80 rpm y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los procesos de centrifugación, resuspensión en PBS e incubación se repitieron cada hora hasta completar las ocho horas de la metodología. Finalmente, se realizaron mediciones de absorbancia a 274 nm y se calculó la concentración de AE LOT II con la ecuación de la curva de calibración de AE LOT II en PBS (Apéndice A).

5.2.4.5. Caracterización morfológica de las NPs de PLA, PLGA y Qs

La caracterización se llevó a cabo mediante el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) Quanta 650 FEG (FEI), el cual está equipado con un detector de imágenes Everhart Thornley detector ETD. Se depositaron alrededor de $50\text{ }\mu\text{L}$ de la suspensión de las NPs de cada polímero cargadas de AE LOT II en cintas de carbón y se revistieron con una capa de oro para facilitar la visualización (Quintero Peña *et al.*, 2020).

5.2.4.6. Estabilidad térmica del AE LOT II, NPs de Qs vacías y cargadas con el AE LOT II

Se realizó el análisis de la estabilidad térmica por medio del Análisis Termogravimétrico (TGA) y análisis de la primera Derivada del análisis Termogravimétrico (DTG) utilizando el equipo STA 449 *F5 Jupiter* de NETZSCH. Para ello se emplearon dos microcrisoles, uno de referencia y otro para la muestra. Los crisoles se pesaron y el de la muestra se taró. Posteriormente, se adicionó la muestra en el crisol tarado (alrededor de 10 μ L para el AE LOT II o 10 mg para las NPs vacías y cargadas) registrándose su masa en el equipo. Se programó el equipo con las condiciones encontradas en la revisión bibliográfica y con las recomendaciones del fabricante: Rango de temperatura: 30 a 500 °C; Velocidad de incremento de temperatura: 10 °C/min; Flujo de gas: Para purgar de 30 ml/min y de protección de 50 ml/min. (Antonioli *et al.*, 2020; Silva Damasceno *et al.*, 2018; Yadav *et al.*, 2020).

5.2.5. Actividad antimicrobiana del AE LOT II libre y encapsulado

5.2.5.1. Actividad antibacteriana del AE LOT II libre

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria bacteriana (CMIB) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) se utilizó el método de microdilución en caldo en microplaca de 96 pozos, el cual está recomendado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) y se encuentra estandarizado en el laboratorio. Brevemente, se prepararon inóculos de las bacterias de las bacterias estudiadas. Se usaron 3 ml de Caldo Müller Hilton (MH) para *S. aureus* ATCC 29213 y caldo infusión Cerebro Corazón (BHI) para *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 y se llevó a incubación durante 12 h a 37 °C en agitación orbital a 200 rpm (agitador orbital con incubación THERMO SCIENTIFIC). Posteriormente, se realizaron diluciones del AE LOT II con

concentraciones entre 80 y 1500 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente, se sembraron 100 μl de cada dilución de AE LOT II y 100 μl del preinóculo en la microplaca de 96 pozos, ajustado en un rango de 10^5 y 10^6 UFC/ml (utilizando la escala Mcfarland). Se realizaron mediciones de Densidad Óptica cada hora durante 8 h en un lector de microplaca (Espectrofotómetro lector de microplacas ELISA Multiskan Sky) a una longitud de onda de 595 nm para obtener la cinética de inhibición de crecimiento para cada microorganismo (apéndice B). Como control de crecimiento se utilizaron 100 μl del preinóculo y 100 μl de agua peptonada al 0.1 % estéril. Como control negativo en lugar del preinóculo se utilizó 100 μl de medio de cultivo de acuerdo con cada bacteria (Cáceres *et al.*, 2020; Cruz *et al.*, 2014).

5.2.5.2. Actividad antibacteriana de las NPs de PLA, PLGA y Qs cargadas con el AE

LOT II

El montaje para las NPs utilizando cada uno de los biopolímeros, se realizó mediante la misma técnica utilizada para el AE libre descrita en el numeral 5.2.5.1. Inicialmente, se realizaron tres réplicas biológicas con las NPs de PLA, PLGA, PLA-PEI, PLGA-PEI y Qs vacías, así como, las NPs de PLA conteniendo concentraciones de AE 21.3 $\mu\text{g/mL}$, PLGA 15.3 $\mu\text{g/mL}$, PLA-PEI 10.8 $\mu\text{g/mL}$, PLGA-PEI 41.5 $\mu\text{g/mL}$ y Qs 344 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, frente a cada bacteria. Posteriormente, se realizaron tres réplicas biológicas con las NPs de Qs en el rango de 21.5 a 688 $\mu\text{g/mL}$ de AE LOT II. Al observar que las NPs presentaban turbidez en los pozos, se realizaron dos pasos adicionales al finalizar la cinética de crecimiento (Hora ocho) (Cáceres *et al.*, 2020; Cruz *et al.*, 2014). Primero se tomaron 10 μL de suspensión de cada pozo de la microplaca de la cinética de crecimiento de las bacterias tratadas con las NPs de Qs, se inocularon en agar MH y se incubaron durante 12 h más para determinar la CMib. Se determinó como la CMib la concentración de NPs de Qs a la cual se evidenció el crecimiento de al menos 1 UFC en el agar. Segundo paso adicional,

para determinar la CMB, se tomaron 100 μL de cada pozo de la microplaca de la cinética de crecimiento de las bacterias tratadas con las NPs de Qs y se adicionaron en 900 μL de Caldo Soja Trypticaseína (TSB, por sus siglas en inglés) y se incubaron durante 24 h. La CMB fue la concentración de NPs de Qs a la cual no se observó turbidez en el medio TSB después de las 24 h de incubación (Dusankova *et al.*, 2019; Shetta *et al.*, 2019).

5.2.5.3. Actividad antifúngica del AE LOT II libre y encapsulado en NPs de PLA, PLGA, PLA-PEI, PLGA-PEI y Qs

Para la determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) de *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida auris* CDC B11903, se utilizó la metodología descrita por el CLSI con algunas modificaciones (Gómez-Sequeda *et al.*, 2017). Para ello, se cultivaron las levaduras en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA, por sus siglas en inglés) y se incubaron a 35 °C durante 48 h. A partir de este medio de cultivo se tomaron de tres a cinco colonias y se adicionaron a una solución salina estéril ajustando el inóculo a una absorbancia de 0.08 – 0.1 escala Mc Farland en una longitud de onda de 530 nm (que corresponde al rango de 1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL). Una vez ajustada la concentración del inóculo, se realizaron diluciones seriadas en solución salina y en medio de cultivo enriquecido Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para obtener una concentración final entre 0.5×10^3 y 2.5×10^3 UFC/mL. Posteriormente, se adicionaron 100 μL del inóculo con diluciones del AE LOT II en concentraciones entre 180 - 3000 $\mu\text{g/mL}$ y se dejaron en incubación durante 48 h a 35 °C. de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 530 nm a las 24 y 48 h (Apéndice B) (Gómez-Sequeda *et al.*, 2017).

Para las NPs de PLA, PLGA, PLA-PEI, PLGA-PEI y Qs vacías y para todas las NPs cargadas de AE LOT II contra las cepas de levaduras se realizó la metodología descrita anteriormente. En esta, se emplearon las concentraciones de NPs utilizadas para determinar la

actividad antibacteriana. Posteriormente se determinó la CMif y la CMF a las NPs cargadas con AE LOT II en el rango de 2.7 a 688 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AE LOT II.

La determinación de la CMif del AE LOT II libre y encapsulado en NPs fue la concentración a la cual no se observó crecimiento a las 24 h. La CMF fue la concentración de AE LOT II libre y encapsulado en NPs donde no se observó crecimiento después de 48 h de incubación (Gómez-Sequeda *et al.*, 2017).

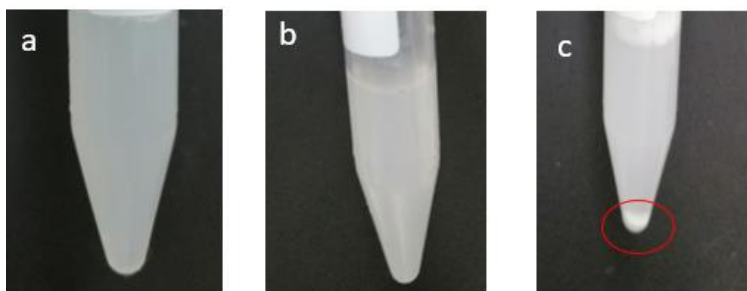
6. Resultados y Discusión

6.1. Síntesis de NPs de PLA

Inicialmente, se emplearon 50 mg de masa total entre del biopolímero PLA y y el emulsificante PVA que servía para estabilizar la mezcla, de acuerdo con lo documentado por Dusankova *et al* (Dusankova *et al.*, 2019). Sin embargo, las NPs se precipitaron, tal y como se observa en la **Figura 2**. La precipitación de NPs influye en la determinación del tamaño y PDI, aumentando estos valores. Una de las posibles causas de la precipitación es el exceso de los componentes de síntesis. La concentración de PVA es un factor clave en el tamaño de las NPs, puesto que tiende a agregarse y precipitarse (Kemala *et al.*, 2012). Razón por la cual, se implementó un diseño experimental (numeral 5.2.1.), variando la masa total de los polímeros (PLA y PLGA) y de PVA teniendo como variable de respuesta la ausencia de precipitado. La masa máxima de la mezcla PLA y PVA en la cual no se generó precipitado fue 40 mg. Por tanto, se ajustó la metodología para emplear esta masa en las síntesis de NPs.

Figura 2

Determinación de la precipitación de NPs de PVA:PLA proporción 5:1 en masa. a. 30 mg total, b. 40 mg total y c. 50 mg total (precipitación en círculo rojo).

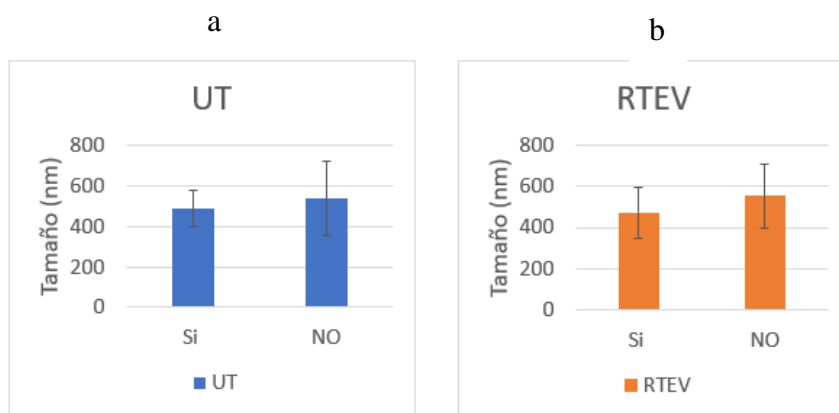


Una vez determinada la cantidad de PLA y PVA, se determinó que la ausencia de Ultra Turrax (UT) y del rotoevaporador (RTEV) en el proceso de síntesis no generaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de las NPs de acuerdo con la prueba de t student (**Figura 3**). El tamaño de las NPs de PLA fue de 487.2 y 538.8 nm con y sin UT, respectivamente. En el caso del RTEV el tamaño fue de 471.9 y 554.2 nm con y sin RTEV, respectivamente. Normalmente, estos procesos son usados en la síntesis de NPs, como ha sido reportado (Dusankova *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019). Sin embargo, la presencia de estos pasos en la síntesis de NPs, pueden generar pérdida del AE por su evaporación, puesto que los AEs son volátiles. Cabrera-Trujillo *et al.*, documentaron que el uso de UT genera emulsiones aceite/agua menos estables y con tamaño de partícula más grandes respecto al tamaño obtenido empleando otros equipos de sonicación. En este estudio documentaron que la eficiencia de homogenización por UT es baja (Cabrera-Trujillo *et al.*, 2018). Por lo cual, se implementó la emulsificación utilizando únicamente el sonicador de punta. Por lo anterior, la síntesis de NPs se realizaron usando solo el RTEV y no

el UT, considerando que es necesario el RTEV para eliminar los residuos de solvente orgánico empleados en la síntesis.

Figura 3

Determinación del efecto del uso de Ultra Turrax (UT) y el Rotoevaporador (RTEV) en la síntesis de NPs poliméricas. a. Uso de UT para un valor de $p \leq 0.05$ y b. Uso RTEV para un valor de $p \leq 0.05$.



6.1.1. Determinación de la cantidad de PLA, PVA y AE en la síntesis de NPs de PLA

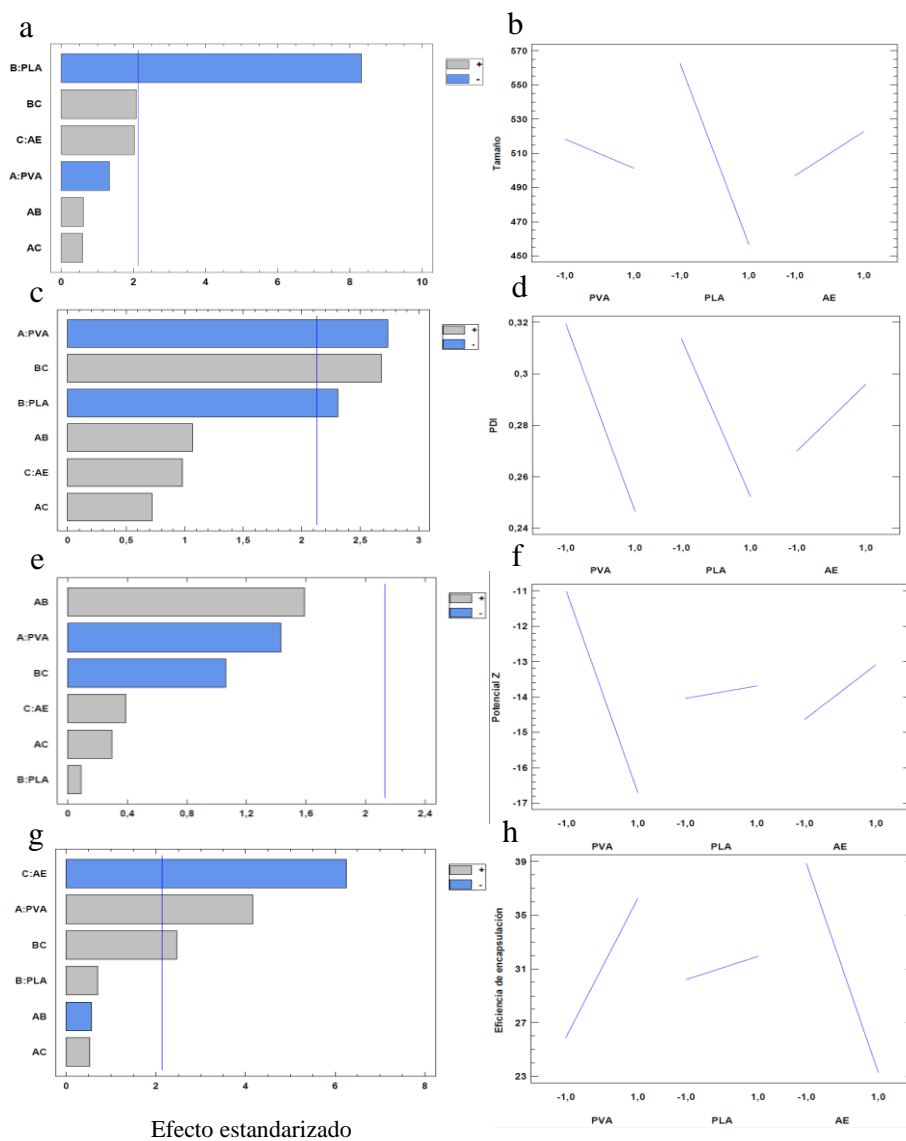
El diseño experimental permitió evaluar el comportamiento de las variables de respuesta tamaño, PDI, potencial Z y eficiencia de encapsulación, en función de las cantidades de PLA, PVA y AE de LO. En la **Figura 4**, se presentan los gráficos de *Pareto* y de efectos principales para las variables de respuesta. De acuerdo con el diseño experimental la mejor combinación de componentes fue 10 mg de PLA, 30 mg de PVA y 0.5 mg de AE para la síntesis de NPs de PLA. De esta forma, se obtuvieron NPs de menor tamaño y PDI, así como la mayor eficiencia de encapsulación. En cuanto al potencial Z, ninguno de los parámetros representó un impacto significativo en el proceso de síntesis dado que cada componente de la síntesis atribuye un potencial Z negativo (Antonioli *et al.*, 2020). El tamaño de las NPs de PLA fue de 418.6 ± 9.4 nm,

PDI de 0.150 ± 0.047 y potencial Z de -19.99 ± 0.9 mV. El tamaño y el PDI de estas NPs fue menor en comparación con los resultados documentados por Dusankova *et al.*, en 2019, dado que las partículas de PLA sintetizadas presentaron un tamaño entre 1.6 y 9.5 μm y un PDI entre 1.6 y 2.7 (Dusankova *et al.*, 2019). Esta diferencia se atribuye a la variación en las cantidades de componentes usados en la síntesis.

Figura 4

Determinación de la mejor formulación para la síntesis de NPs de PLA cargadas con AE LO. Diagramas de Pareto para Tamaño, PDI, Potencial Z y Eficiencia de encapsulación (a,c,e y g,

respectivamente) y gráficos de componentes principales de tamaño, PDI, Potencial Z y Eficiencia de encapsulación (b, d, f y h, respectivamente)



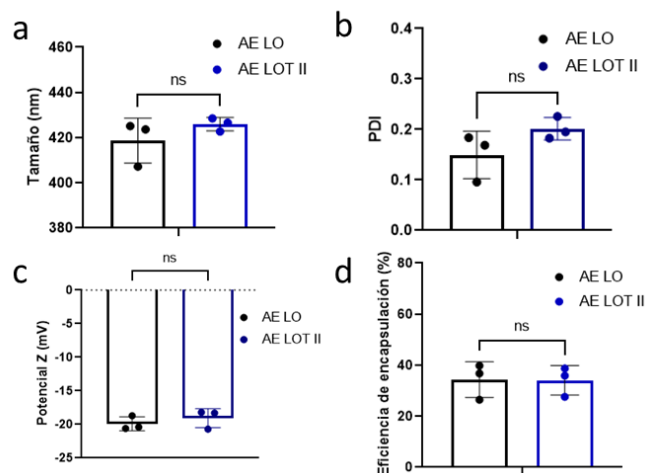
6.1.2. Validación de la mejor formulación de síntesis de NPs de PLA con AE LO y AE LOT II

La síntesis de NPs de PLA con AE LOT II, previamente seleccionado por presentar las mejores propiedades biológicas, se realizó con las cantidades establecidas en el diseño

experimental (30 mg de PVA, 10 mg de PLA y 0.5 mg de AE). en este punto, se compararon las NPs de PLA con el AE LO y AE LOT II mediante la prueba de T-student. Las características de las NPs cargadas con AE LO fueron 418.6 nm de tamaño, 0.150 PDI, -19.9 mV de potencial Z y 34.4 % EE, mientras que las cargadas con AE LOT II fueron 425.9 nm, 0.201 PDI, -19.1 mV y 34.1 % EE. La principal diferencia se observó en el PDI. sin embargo, el análisis estadístico no registró diferencias estadísticamente significativas entre las NPs cargadas con AE LO y AE LOT II (Figura 5).

Figura 5

Determinación de las diferencias estadísticamente significativas en el tamaño, PDI, Potencial Z y Eficiencia de encapsulación entre el AE de Lippia origanoides (LO) y el LOT II en NPs de PLA. a. Tamaño, b. PDI, c. Potencial Z y d. Eficiencia de encapsulación



6.1.3. Síntesis de NPs de PLA adicionando PEI

La carga electrostática de las NPs de PLA fue negativa. Sin embargo, la literatura sugiere que los agentes antimicrobianos con mejores resultados son de carga positiva, es decir de potencial Z positivo (Niza *et al.*, 2020). Por lo cual, se empleó en la síntesis de NPs de PLA el PEI. El PEI tiene una carga catiónica global, confiriéndole a las NPs una carga positiva, lo cual facilita la

penetración de la membrana microbiana. Adicionalmente, las NPs son recubiertas de PEI cambiando a positivo su potencial Z (Ivanova *et al.*, 2018; Niza *et al.*, 2020). En efecto el uso del PEI en la síntesis modificó el potencial Z de las NPs, con un valor positivo de 7.7 mV (PLA-PEI-AE LOT II) como se observa en la **Tabla 8**. Sin embargo, el tamaño y el PDI aumentaron, mientras que la % EE disminuyó respecto a las NPs PLA-AE LOT II. Además, se identificó que había dos poblaciones de tamaño de partículas 565.2 nm y superiores a 1 μm por la presencia del PEI. Por último, la actividad antimicrobiana no presentó variación por a la presencia de PEI como más adelante se precisará. Puesto que el PEI a la concentración utilizada en la síntesis no presentó actividad antimicrobiana. Lo anterior ha sido reportado previamente por Niza *et al.* Ellos documentaron las características de NPs de PLA cargadas con carvacrol y recubiertas con PEI. En efecto, el PEI le confirió una carga superficial positiva, mejoramiento de las actividades antimicrobianas, aumento en el tamaño y del PDI respecto a las NPs sin PEI (Niza *et al.*, 2020).

Tabla 8

Características físicas de las NPs de PLA-PEI vacías, PLA-PEI y PLA cargadas con AE LOT II

Nanopartículas	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	Eficiencia de encapsulación (%)
PLA-AE	425.9 \pm 7.6	0.201 \pm 0.042	-19.1 \pm 1.2	34.1
PLA-PEI	643.4 \pm 2.3*	0.304 \pm 0.034	5.2 \pm 1.7	-
PLA-PEI-AE	565.2 \pm 22.4*	0.286 \pm 0.047	7.7 \pm 0.8	17.3

Nota. * Presencia de partículas con tamaños $>1 \mu\text{m}$

6.2. Síntesis de NPs de PLGA

6.2.1. Determinación de la cantidad de PLGA, PVA y AE en la síntesis de las NPs de PLGA

Al igual que con la síntesis de NPs de PLA, se realizó el mismo diseño experimental a las NPs de PLGA, para determinar la mejor formulación en cuanto a la cantidad de PLGA, PVA y AE. En este sentido, usar 15 mg de PLGA, 15 mg de PVA y 1 mg de AE, fue la mejor formulación,

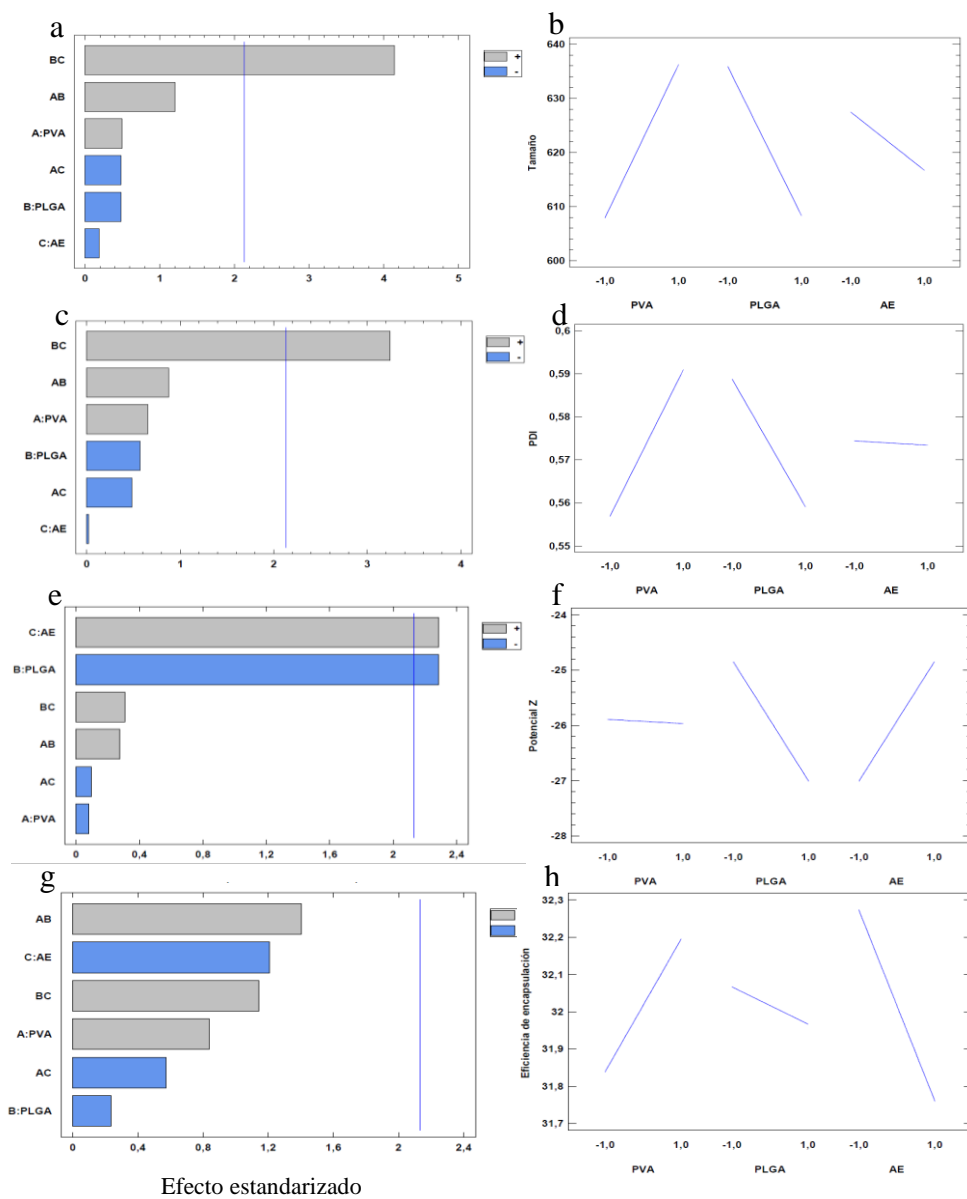
teniendo en cuenta los diagramas de Pareto y las gráficas de componentes principales de la **Figura 6**. Las NPs de PLGA presentaron un tamaño de 606.5 nm, PDI de 0.581, -25.9 mV y 31.2 % EE. Al compararse con las características de las NPs de PLA, se evidenció un aumento en cada uno de los parámetros al cambiar el biopolímero en la síntesis. Por otra parte, Iannitelli *et al.*, documentaron la síntesis de NPs de PLGA cargadas con carvacrol (comercial) con tamaños de partícula de 209.8, PDI de 0.260 y potencial Z de -18.99 y 26 % de % EE. Se observa que el tamaño y PDI de NPs reportadas son 2.8 y 2.2 veces menores, respectivamente, en comparación con las obtenidas en este trabajo. Esto se debe a las características del componente activo, donde ellos emplean solo carvacrol comercial y probablemente al método de síntesis que fue desplazamiento de disolvente (Iannitelli *et al.*, 2011).

Figura 6

Determinación de la mejor formulación para la síntesis de NPs de PLGA cargadas con AE LO.

Diagramas de Pareto para Tamaño, PDI, Potencial Z y Eficiencia de encapsulación (a,c,e y g,

respectivamente) y gráficos de componentes principales de tamaño, PDI, Potencial Z y Eficiencia de encapsulación (b, d, f y h, respectivamente)

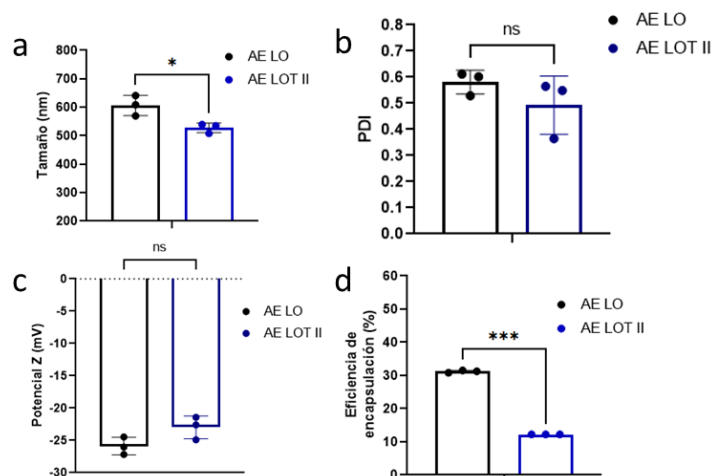


6.2.2. Validación de la mejor formulación de síntesis de NPs de PLGA con AE LO y AE LOT II

Las NPs cargadas con AE LOT II presentaron un tamaño de 527.5 nm, PDI de 0.493, -22.9 mV y 12.2 % EE. En la **Figura 7**, se registra el análisis estadístico mediante la prueba T-student, entre las NPs de PLGA cargadas con AE de LO y AE LOT II. Se observa que las NPs presentan diferencias estadísticamente significativas en el tamaño y la eficiencia de encapsulación, siendo estos valores mayores al emplear el AE LO. Estos resultados están estrechamente relacionados, entre menos AE se encapsula, menor es el tamaño de las NPs. Por otro lado, el PDI y el Potencial Z no presentaron diferencias estadísticamente significativas (prueba t student $P > 0.05$). Sin embargo, el tamaño de las NPs es un factor determinante en la actividad antimicrobiana, puesto que, a menor tamaño, mayor área superficial de contacto e interacción con los microorganismos.

Figura 7

Determinación de las diferencias estadísticamente significativas en el tamaño, PDI, Potencial Z Eficiencia de encapsulación entre el AE de Lippia organoides (LO) y el AE LOT II en NPs de PLGA. a. Tamaño, b. PDI, c. Potencial Z y d. Eficiencia de encapsulación



6.2.3. Síntesis de NPs de PLGA adicionando PEI

Las NPs de PLGA también presentaron un potencial Z negativo, por lo cual se adicionó PEI. Como se indica en la **Tabla 9**, las NPs de PLGA recubiertas con PEI presentaron un cambio de potencial Z, de -22.9 a 36.9 mV. Adicionalmente, la eficiencia de encapsulación y el tamaño aumentaron en un 63.2 y 47.9 %, respectivamente. En principio, se esperaba que tuvieran actividad antimicrobiana por el aumento en la cantidad de AE LOT II encapsulado. Sin embargo, al realizar las pruebas, no se obtuvo inhibición de ninguno de los microorganismos con las NPs de PLGA-PEI-AE LOT II. El efecto del PEI fue el mismo en ambos biopolímeros, PLA y PLGA. A pesar de que aumenta el tamaño y por ende el PDI de las NPs, el PEI es un polímero catiónico con propiedades antimicrobianas y estabilizadoras, que ha sido reportado para estabilizar NPs de polímeros con compuestos bioactivos, incluyendo el PLGA (Romero *et al.*, 2010).

Tabla 9

Características físicas de las NPs de PLGA-PEI vacías, PLGA-PEI y PLGA cargadas con el AE LOT II

Nanopartículas	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	Eficiencia de encapsulación (%)
PLGA-AE	527.5 ± 16.9	0.493 ± 0.112	-22.9 ± 1.8	12.2
PLGA-PEI	461.5 ± 25.4*	0.291 ± 0.052	45.7 ± 2.3	-
PLGA-PEI-AE	1012 ± 282.2*	0.628 ± 0.048	36.9 ± 1.2	33.2

6.3. Síntesis de NPs de Qs

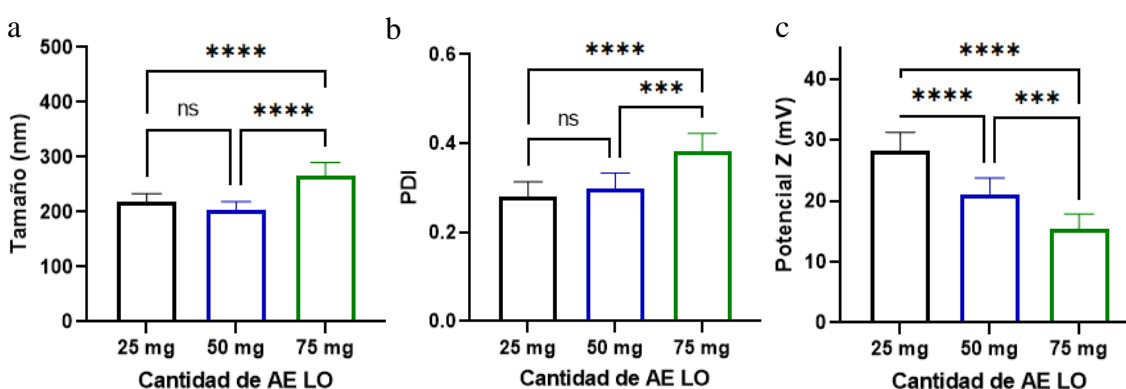
Como se mencionó en la metodología, las NPs de Qs no presentaron precipitación. Por lo cual, se realizó el diseño experimental variando únicamente la cantidad de AE.

6.3.1. Determinación de la cantidad de AE para la síntesis de NPs de Qs

Para determinar cuál era la mejor cantidad de AE LO, se sintetizaron NPs con 50 mg de Qs y 25, 50 y 75 mg de AE. El mejor resultado se obtuvo con 50 mg de AE LO (**Figura 8**). El análisis estadístico entre 25 y 50 mg de AE, indicó que no hubo diferencias significativas en el tamaño y en el PDI. Entre 50 y 75 mg de AE hubo diferencia significativa en todos los parámetros analizados, donde se destaca que utilizando 50 mg de AE en la síntesis se obtiene menor tamaño y PDI. Si bien es cierto que el potencial Z fue mayor en la síntesis con 25 mg, prevalece la cantidad de AE que está asociada a la actividad antimicrobiana, por lo cual se seleccionó 50 mg de AE para la síntesis (relación de Qs:AE de 1:1). Esto ha sido documentado por Shetta *et al.*, en 2019 quienes realizaron pruebas con diferentes proporciones de Qs/AE, indicando que la mejor proporción era 1:1 (Shetta *et al.*, 2019).

Figura 8

Determinación de la mejor cantidad de AE LO en la síntesis de NPs de Qs en función de: a. tamaño, b. PDI y c. Potencial Z

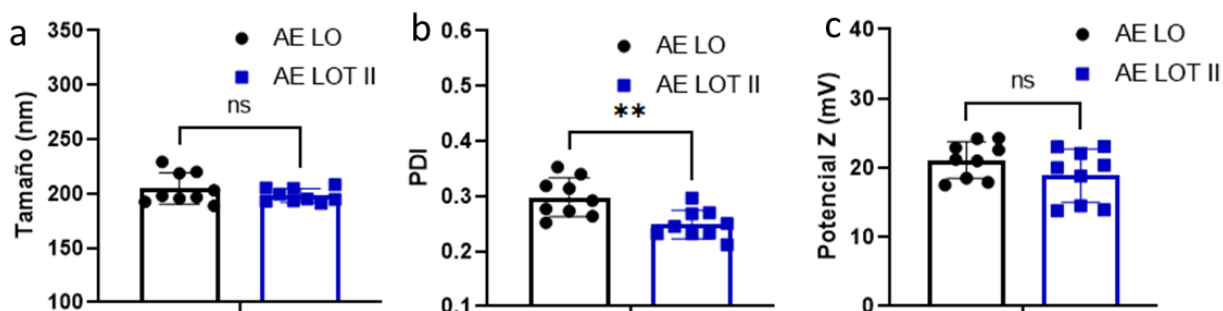


6.3.2. Validación de la síntesis de NPs de Qs cargadas con AE LO y AE LOT II con la mejor formulación

Las NPs cargadas con AE LO presentaron un tamaño de 204.7 nm, PDI 0.298 y 21.1 mV, mientras que las NPs cargadas con AE LOT II, 198.3 nm, PDI 0.249 y 18.8 mV. Al realizar la comparación de las características de las NPs de Qs, solo se observó diferencia estadísticamente significativa en el PDI. Sin embargo, el PDI de las NPs cargadas con AE LOT II fue menor, lo cual es conveniente para obtener un tamaño de partícula homogéneo (**Figura 9**).

Figura 9

Determinación de la encapsulación del AE LOT II en comparación con el AE LO en el tamaño, PDI y potencial Z



6.4. Determinación de la estabilidad de las NPs

6.4.1. Estabilidad de las NPs de PLA cargadas con AE LOT II

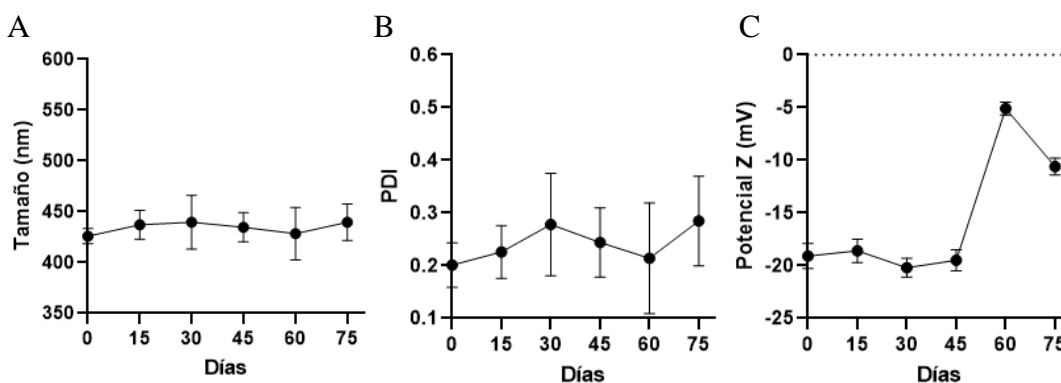
En la **Figura 10** se registra la medición del tamaño, PDI y potencial Z para determinar la estabilidad. El tamaño de las NPs se mantuvo en el rango de 425 - 440 nm, PDI entre 0.201 - 0.285 y potencial Z entre -20.2 - -5.1 mV, durante los 75 días de análisis. Las NPs de PLA presentaron una estabilidad hasta la medición del día 45, puesto que en el día 60 hubo un cambio estadísticamente significativo en el potencial Z. Este valor aumentó de -19.5 a -5.1 mV. Indicando

que las NPs se agregarían debido a la pérdida de repulsión electrostática, que a su vez reduciría su estabilidad en medio acuoso.

Figura 10

Determinación de la estabilidad en el tiempo de las NPs de PLA cargadas con el AE LOT

II para, A. tamaño, B. PDI y C. potencial Z



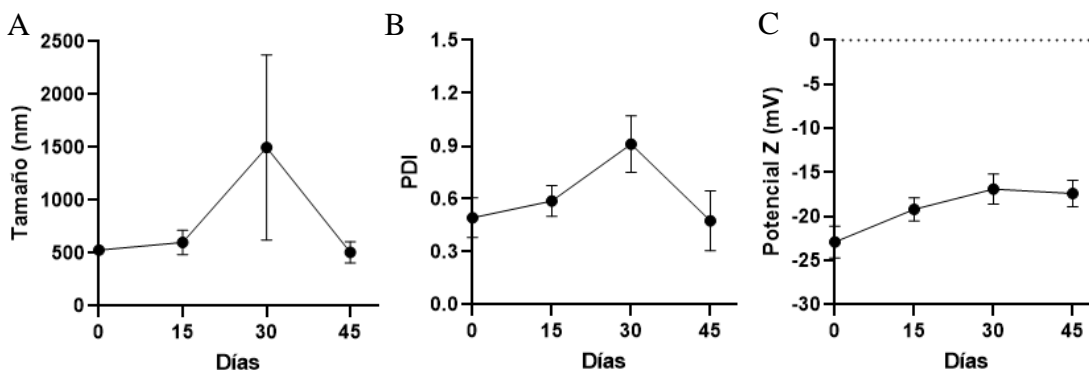
6.4.2. Estabilidad de las NPs de PLGA cargadas con AE LOT II

La estabilidad de las NPs de PLGA cargadas con AE LOT II se evaluó durante 45 días. El tamaño estuvo en un rango de 507 a 1499 nm, PDI de 0.475 a 0.910 y potencial Z -22.9 a -16.9 mV. La estabilidad de las NPs de PLGA se mantuvo únicamente hasta el día 15, teniendo en cuenta que en el día 30 se presentó un aumento estadísticamente significativo en la medición del tamaño y el PDI de las NPs, como se puede observar en la **Figura 11**. El aumento del tamaño y el PDI está asociado a la agregación de las NPs de PLGA en el medio acuoso, como ya se mencionó anteriormente.

Figura 11

Determinación de la estabilidad en el tiempo de las NPs de PLGA cargadas con el AE LOT II

para, A. Tamaño, B. PDI y C. Potencial Z

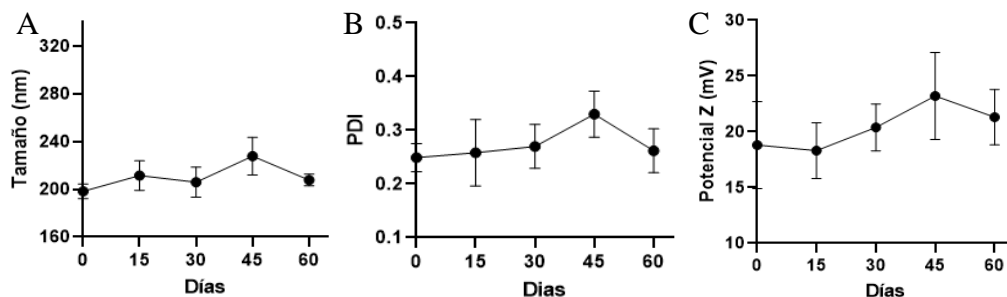


6.4.3. Estabilidad de las NPs de Qs cargadas con AE LOT II

Las NPs de Qs se mantuvieron estables durante 30 días, con un tamaño de 205.9 nm, PDI de 0.270 y un potencial Z de 20.4 mV. En el día 45 presentaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño (227.8 nm) y en el PDI (0.330) (**Figura 12**). El rango de tamaño registrado durante 60 días fue de 198 a 227 nm, PDI 0.249 a 0.330 y potencial Z entre 18.3 a 23.2 mV. Por otro lado, las NPs de Qs presentaron un potencial Z positivo, lo cual se considera adecuado dado que favorece la interacción con los microorganismos aumentando la biodisponibilidad y aumentando la capacidad antimicrobiana del AE LOT II (Ivanova *et al.*, 2018).

Figura 12

Determinación de la estabilidad de las NPs de Qs cargadas con el AE LOT II para A. Tamaño, B. PDI y C. Potencial Z.



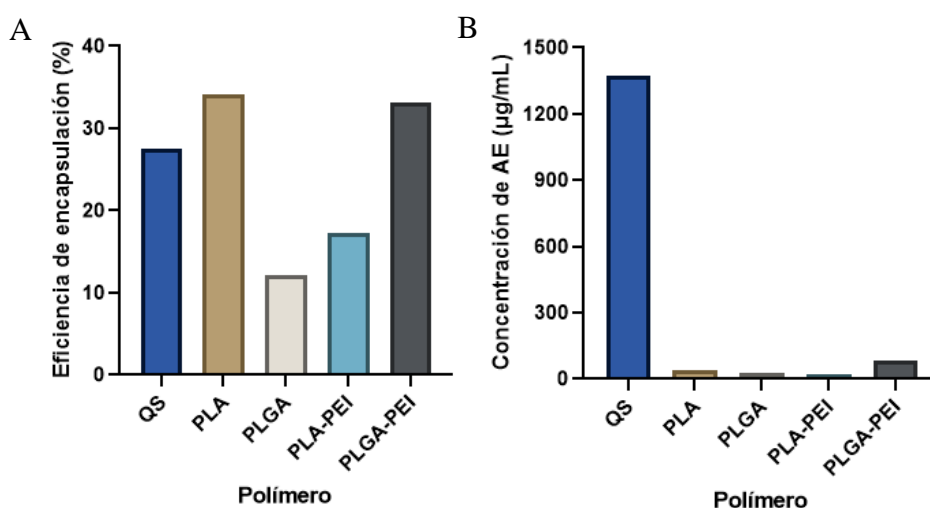
6.5. Eficiencia de encapsulación (%EE)

La eficiencia de encapsulación de las NPs sintetizadas utilizando los tres biopolímeros fue superior al 10 %, obteniéndose el mayor porcentaje para las NPs de PLA. Así mismo, la adición de PEI, tuvo un efecto positivo en el % EE para las NPs de PLGA-PEI y negativo para las NPs de PLA-PEI **Figura 13A**. Además, se evidenció que las NPs de Qs son las que contienen mayor cantidad de AE LOT II en términos de concentración (1376 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que las NPs de PLA, PLA-PEI, PLGA y PLGA-PEI mantuvieron concentraciones inferiores a 83.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 13B**). De esta forma, se espera que la actividad antimicrobiana de las NPs de Qs sea mayor. Cabe aclarar que el % EE es la relación entre la cantidad final sobre la inicial de AE LOT II empleado en la síntesis. Los % EE obtenidos en este estudio fueron 34.1 % para NPs de PLA y AE LOT II, 27.5 % para las NPs de Qs y AE LOT II, y 12.2 % para las NPs de PLGA y AE LOT II. El % EE documentado para NPs de PLA y carvacrol es 29.6 % (Niza *et al.*, 2020), mientras que para PLGA y extracto de canela es 38.9 % (Hill *et al.*, 2013) y Qs cargado con AE de limoncillo fue de 45 % (Soltanzadeh *et al.*, 2021). El % EE está asociado al tipo de polímero y AE empleado, también a la relación másica entre polímero y AE. Hill colaboros documentaron el uso de dos tipos de PLGA

con diferentes proporciones de ácido láctico a glicólico (65:35 y 50:50), en la síntesis de NPs cargadas con extracto de canela. La variación en la proporción del PLGA influyó significativamente en el % EE con una diferencia de 8.7 %, siendo mayor (47.6 %) para el PLGA en relación 50:50 de ácido láctico y ácido glicólico (Hill *et al.*, 2013). Adicionalmente, Maral Soltanzadeh *et al.*, documentaron la síntesis de NPs de Qs y AE de limoncillo variando la proporción másica. Emplearon relaciones másicas Qs:AE 1:0.25, 1:0.50, 1:0.75, 1:1.00, y 1:1.25, lográndose aumentar el % EE de aceite encapsulado desde 0.25 a 0.75. Sin embargo, en las relaciones 1:1.00 y 1:1.25 se observa una disminución en el % de EE. En este estudio, el % de EE más alto fue 45 %, empleando relación 1:0.75 (Soltanzadeh *et al.*, 2021).

Figura 13

Eficiencia de encapsulación de las NPs de cada polímero con AE LOT II, A. Eficiencia de encapsulación (%) y B. Concentración en las NPs de cada polímero



6.6. Interacción y encapsulación de las NPs y el AE LOT II

6.6.1. Interacción de las NPs de PLA con el AE LOT II

Los espectros infrarrojos de las NPs de PLA se muestran en la **Figura 14**. En las NPs de PLA vacías y cargadas se observan bandas en el rango de 2996 y 2940 cm^{-1} , debido a las vibraciones de tensión entre C-H, del mismo modo la banda característica en 1752 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de C=O. Las bandas que se presentan en 1450 cm^{-1} son debido a las vibraciones de CH_3^- , y las bandas entre 1270 a 1087 cm^{-1} que corresponden con la vibración de C-O. Así mismo, en las NPs cargadas se observa una banda cerca de 1672 cm^{-1} , indicando que el AE LOT II esta encapsulado (Antonioli *et al.*, 2020). Adicionalmente, en la **Figura 15** se observa una banda en 3370 cm^{-1} , correspondiente con la vibración de C-N del PEI (Afrouz *et al.*, 2023). Teniendo en cuenta que no se observaron nuevas bandas predominantes en los espectros IR, se sugiere que la interacción entre el AE y el polímero es de tipo físico.

Figura 14

Determinación de la interacción y encapsulación del AE LOT II en NPs de PLA

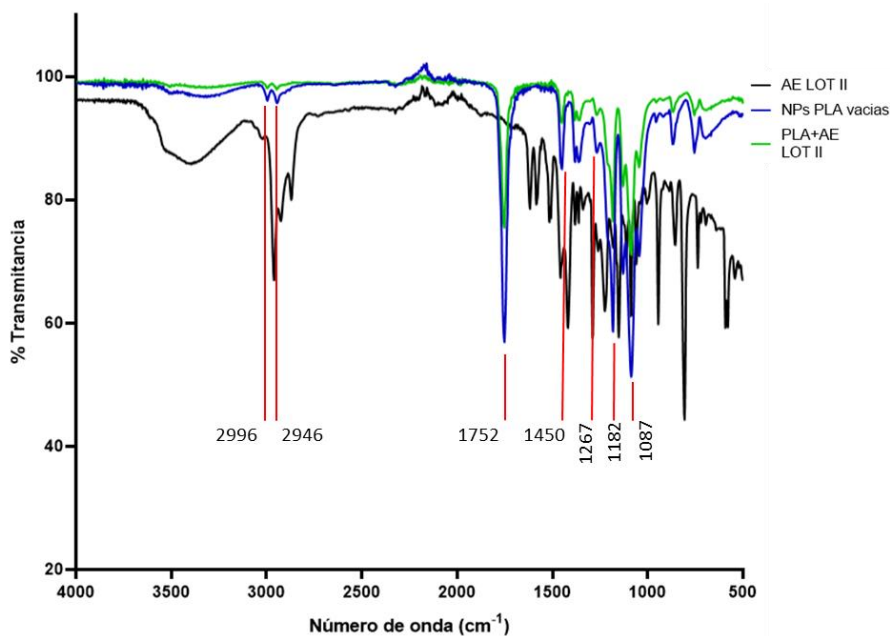
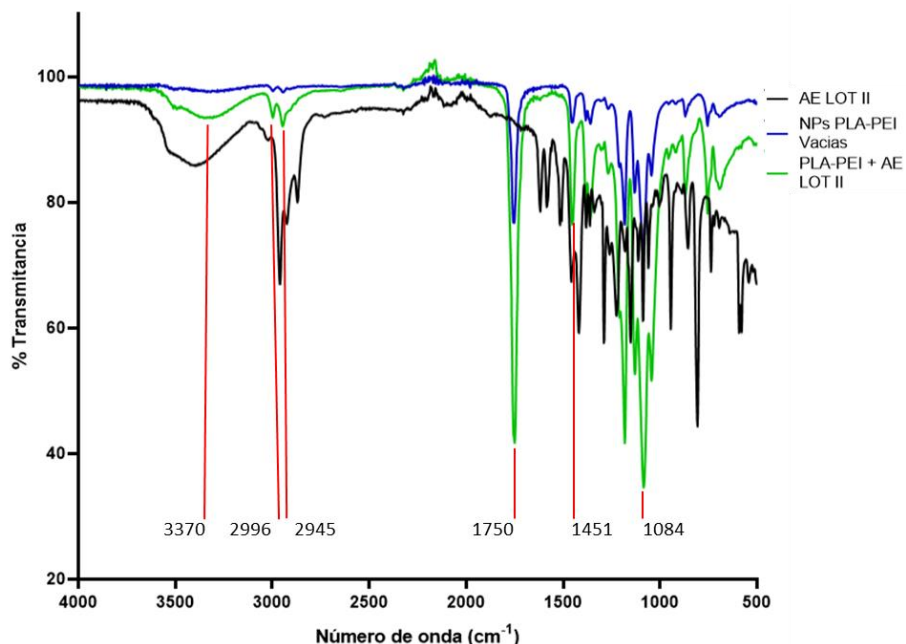


Figura 15

Determinación de la interacción y encapsulación del AE LOT II en NPs de PLA-PEI



6.6.2. Interacción de las NPs de PLGA con el AE LOT II

En la **Figura 16** y la **Figura 17** se observan los espectros IR de las NPs de PLGA y PLGA-PEI, respectivamente. Para las NPs de PLGA vacías y cargadas se observa una banda de vibración del O-H en 3510 cm⁻¹ y dos bandas en el rango de 2995 y 2991 cm⁻¹, debido a las vibraciones de tensión entre C-H. Del mismo modo la banda característica en 1750 cm⁻¹ corresponde a las vibraciones de C=O. Las bandas que se presentan en 1450 cm⁻¹ se deben a las vibraciones de CH₃, y las bandas entre 1270 a 1087 cm⁻¹ corresponden con la vibración de C-O. Así mismo, para las NPs cargadas se observa una banda cercana a los 1618 cm⁻¹, lo cual indica que el AE LOT II está encapsulado (Pola *et al.*, 2019). Adicionalmente, en la **Figura 17** se observa una banda en 1681 cm⁻¹, la cual corresponde a la vibración de C-N del PEI y el aumento de la banda de 3510 cm⁻¹ se debe a la presencia del AE en las NPs (K. B. Almeida *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta que no se

observaron nuevas bandas predominantes en los espectros IR, se sugiere que la interacción entre el AE y el polímero es de tipo físico.

Figura 16

Determinación de la interacción y encapsulación del AE LOT II en NPs de PLGA

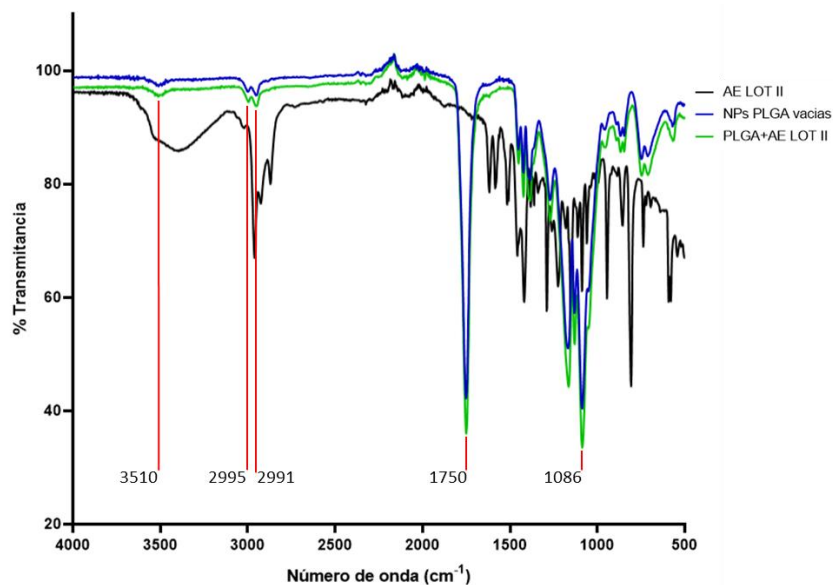
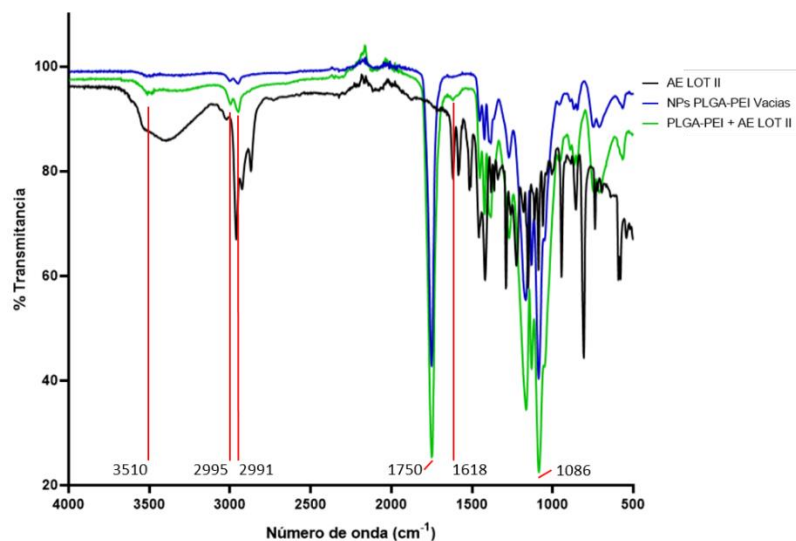


Figura 17

Determinación de la interacción y encapsulación del AE LOT II en NPs de PLGA-PEI

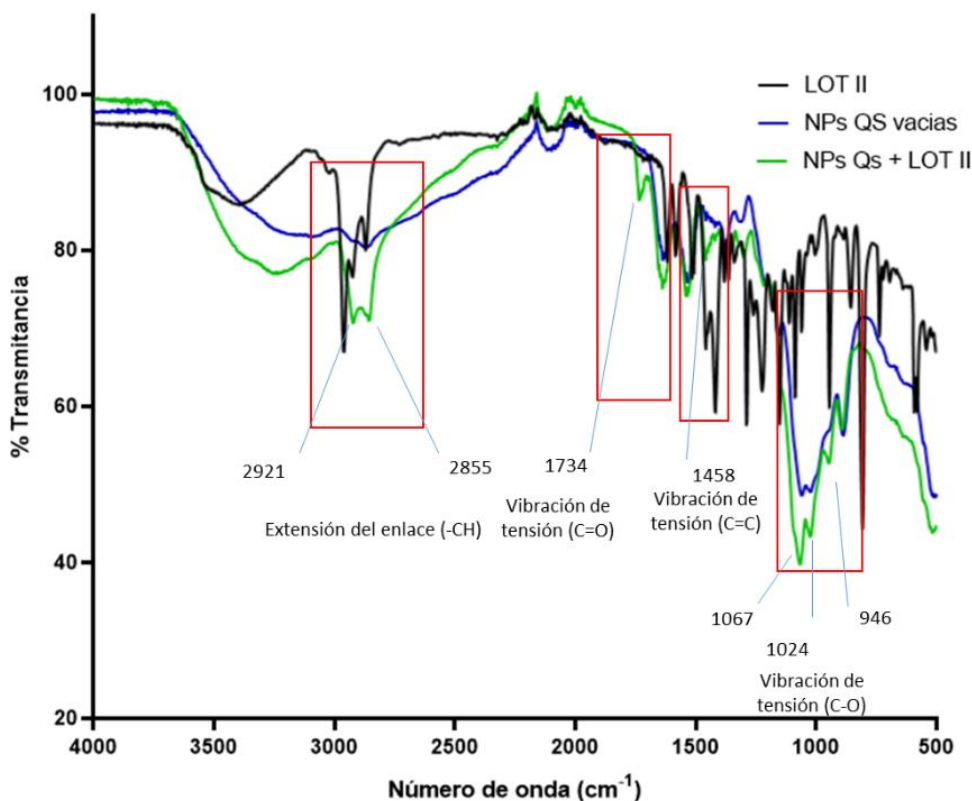


6.6.3. Interacción de las NPs de Qs con el AE LOT II

Las NPs de Qs presentan bandas en 3257 cm^{-1} correspondientes con la vibración de O-H y N-H, en 2921 y 2851 cm^{-1} por la vibración de C-H (Shetta *et al.*, 2019). La banda que se observa en 1734 y 1458 cm^{-1} para las NPs cargadas con el AE, se debe a la interacción del polímero con el AE (Rajivgandhi *et al.*, 2021). Las bandas que se observan en 1067 , 1024 y 946 cm^{-1} corresponden con la vibración de C–O–C que se incrementa debido a la presencia del AE LOT II en las NPs de Qs cargadas (**Figura 18**; Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

Figura 18

Determinación de la interacción y encapsulación del AE LOT II en NPs de Qs

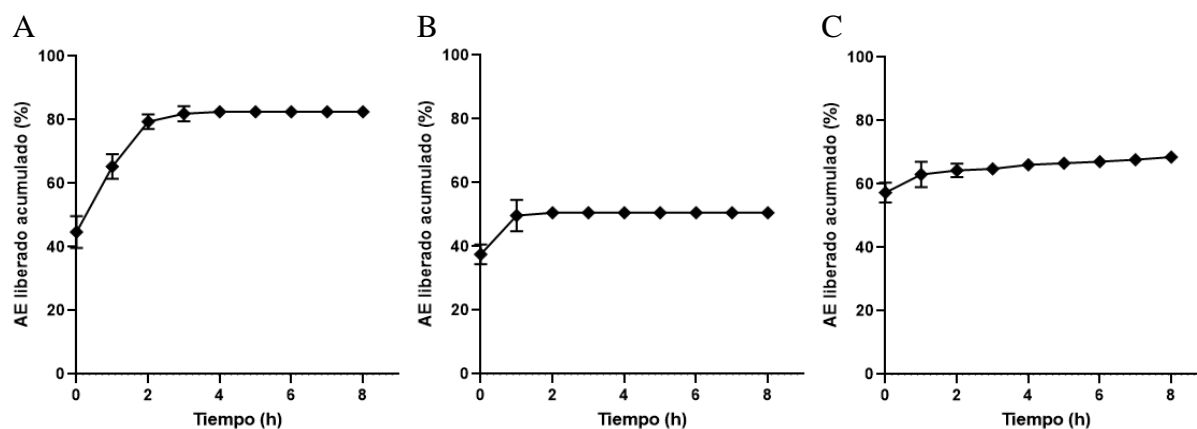


6.7. Perfil de liberación *in vitro* de las NPs de PLA, PLGA y Qs

Los resultados obtenidos en los perfiles de liberación de las NPs de PLA, PLGA y Qs *in vitro* se muestran en la **Figura 19**. Se observa que las NPs liberan entre 37 y 57 % del AE al momento de entrar en contacto con el PBS. Posteriormente, se observa una liberación adicional que va hasta la tercera hora en las NPs de PLA (**Figura 19A**) y hasta la primera hora en las NPs de PLGA y Qs (**Figuras 19B y 19C**, respectivamente). Finalmente, se observa un comportamiento de liberación lenta hasta la octava hora. Estos resultados sugieren que la liberación se compone de dos fases, la primera que corresponde con una liberación rápida y la segunda a una liberación lenta. El modelo de liberación obtenido corresponde al modelo Korsmeyer-Peppas, el cual se ha documentado por otros autores (K. B. Almeida *et al.*, 2019; Shetta *et al.*, 2019; Vrouvaki *et al.*, 2020).

Figura 19

Determinación del perfil de liberación del AE LOT II de las NPs. A. PLA, B. PLGA y C. Qs

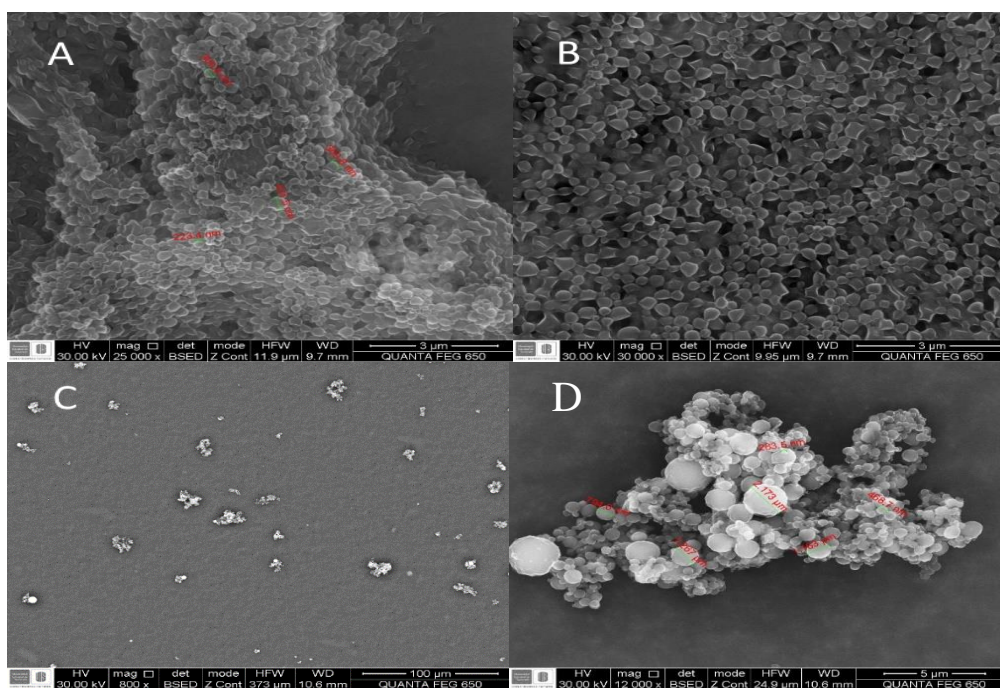


6.8. Caracterización morfológica

Las micrografías obtenidas mediante SEM se presentan en la **Figura 20**. Las NPs de PLA y PLGA presentan una morfología esférica, como ha sido documentado previamente (Campini *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2019). Además, las NPs de PLA tienen una distribución de tamaño más homogénea (**Figuras 20A y 20B**), en comparación con las NPs de PLGA (**Figuras 20C y 20D**, respectivamente). Estos resultados se comparan con los obtenidos utilizando DLS, donde el PDI de las NPs de PLGA fue mayor que el de las NPs de PLA.

Figura 20

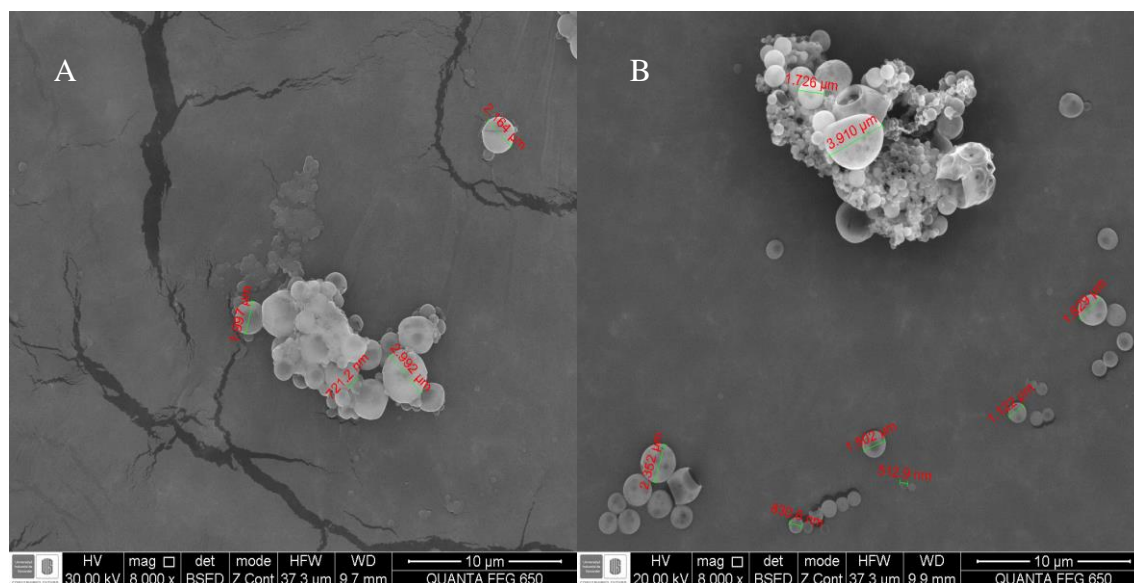
Determinación de la morfología mediante micrografías SEM de las nanopartículas de PLA Y PLGA cargadas con AE LOT II, A. PLA Micrografía general a 25000x de aumento, B. PLA Micrografía a 30000x de aumento, C. PLGA Micrografía general a 800x de aumento y D. PLGA Micrografía a 12000x de aumento



Las NPs de PLA-PEI y PLGA-PEI también presentaron una morfología esférica. Así mismo, se evidenció un aumento en el rango de tamaño de las NPs de PLA (**Figura 21A**) y NPs de PLGA (**Figura 21B**). Por otro lado, el tamaño de las NPs incrementó en comparación con las NPs que se sintetizaron sin la adición de PEI, lo cual se presenta debido a que el PEI actúa como recubrimiento del polímero (Niza *et al.*, 2020).

Figura 21

Determinación de la morfología por micrografías SEM de las nanopartículas de PLA-PEI y PLGA PEI cargadas con el AE LOT II. A. Micrografía de PLA-PEI a 8000x de aumento y B. Micrografía de PLGA-PEI a 12000x de aumento.

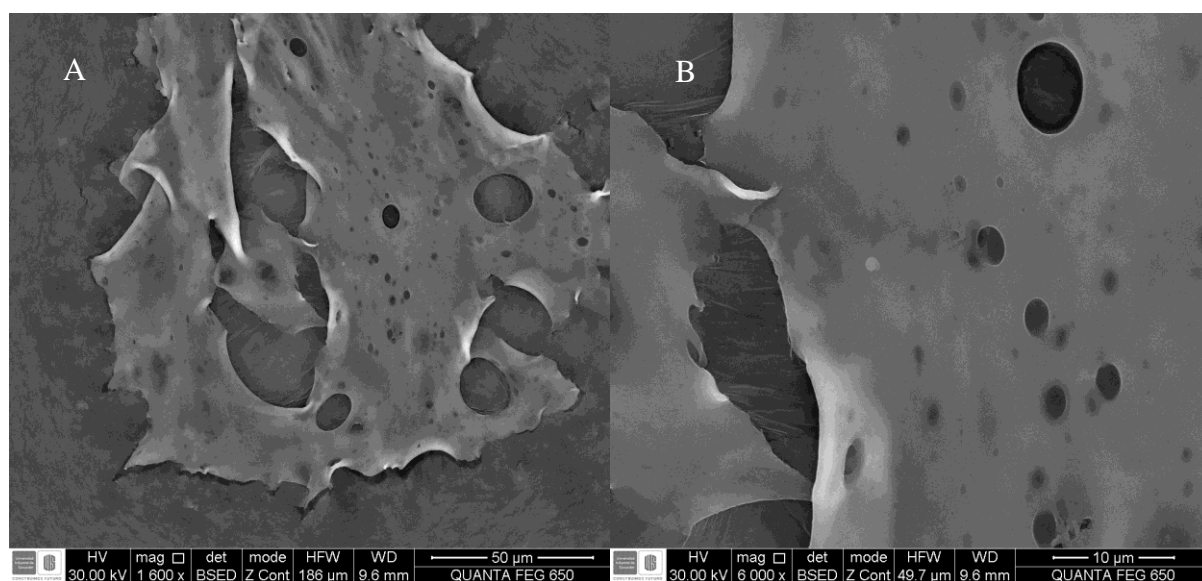


Las micrografías obtenidas de las NPs de Qs cargadas con el AE de LOT II se caracterizaron por presentar estructuras que han sido denominadas por otros autores como “hojas de carpeta” (folder en inglés), con ligeras rugosidades que sugieren la encapsulación del AE (**Figura 22A**) (Rajivgandhi *et al.*, 2021). Del mismo modo, se observan estructuras circulares en

las láminas de QS como se observa en **Figura 22B**, las cuales se presentan probablemente debido a la interacción entre el AE LOT II y el biopolímero (Torres *et al.*, 2020).

Figura 22

Determinación de la morfología mediante micrografías SEM de las nanopartículas de Quitosano cargadas con el AE LOT II. A. Micrografía de Quitosano a 1600x de aumento y B. Micrografía de Quitosano a 6000x de aumento



6.9. Determinación de la estabilidad térmica de las NPs de Qs cargadas con AE LOT II

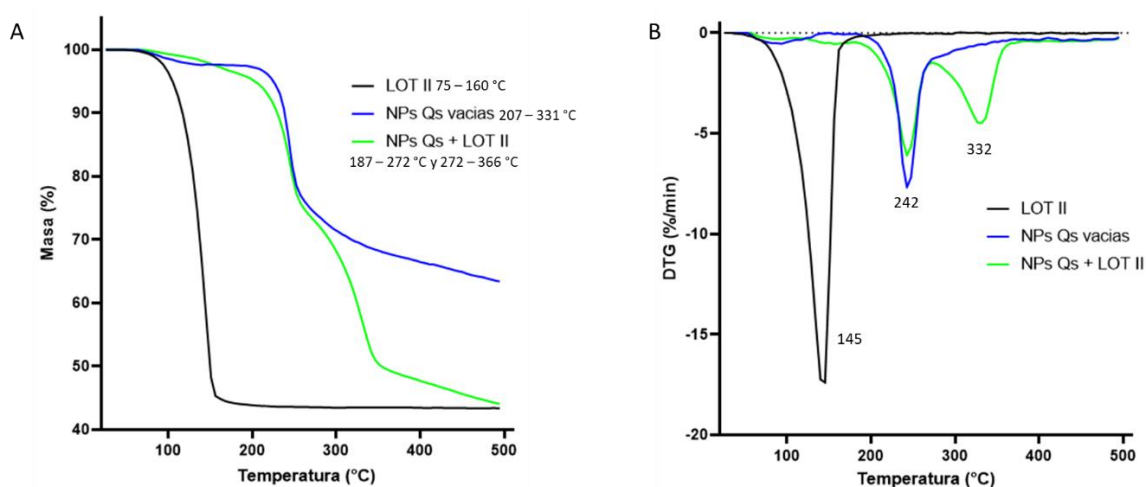
Las NPs de Qs fueron las que proporcionaron mayor protección térmica para al AE LOT II (**Figura 23**). En la curva del TGA (**Figura 23A**) el AE sin encapsular pierde su masa a causa de la evaporación y degradación en un rango de temperatura de 75 a 160 °C; mientras que, las NPs de Qs cargadas de AE, pierden masa en un rango de 187 a 272 °C. Para visualizar mejor este efecto, se determinó la primera derivada del TGA que se denomina DTG (**Figura 23B**). En esta gráfica se determinó que, para el AE y las NPs en temperaturas de 145 °C y 242 °C, respectivamente, se presentaba una mayor pérdida de masa. Este corrimiento corresponde con la

presencia del polímero, el cual le confiere estabilidad térmica al AE LOT II (Hosseini *et al.*, 2013; Shetta *et al.*, 2019; Soltanzadeh *et al.*, 2021).

Figura 23

Termogramas del AE LOT II libre, NPs de Qs vacías y NPs de Qs cargadas con AE LOT II. A.

Curvas TGA y B. Curvas de la primera derivada del TGA (DTG)



6.10. Actividad antimicrobiana del AE LOT II libre y encapsulado

6.10.1. Determinación de la actividad antimicrobiana del AE LOT II libre y encapsulado en

NPs de Qs frente a S. aureus ATCC 29213, E. coli ATCC 25922, Salmonella Enteritidis ATCC 13076 y P. aeruginosa ATCC 27853

La actividad antimicrobiana se determinó mediante la cinética de crecimiento de los microorganismos a las ocho horas de incubación (**Figura 24**), como se observa en la **Tabla 10**. La CMB fue de 380 µg/mL contra *S. aureus* ATCC 29213, 560 µg/mL para *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 inhibiendo el 99 % de las células bacterianas. Para *P. aeruginosa* ATCC 27853 la CMB fue de >1500 µg/mL sin lograr una inhibición completa las bacterias. Cabe resaltar que estas concentraciones son menores en comparación con otros estudios

Tabla 10

Inhibición del crecimiento de S. aureus ATCC 29213, E.coli ATCC 25922, Salmonella Enteritidis ATCC 13076 y P. aeruginosa ATCC 27853 por el AE LOT II

Concentración (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de <i>S. aureus</i> (%)	Porcentaje de Inhibición de <i>E. coli</i> (%)	Porcentaje de Inhibición de <i>Salmonella Enteritidis</i> (%)	Porcentaje de Inhibición de <i>P. aeruginosa</i> (%)
90	10	12	12	13
180	23	17	23	15
280	58	23	45	15
380	>99	51	95	26
560	>99	>99	>99	33
750	>99	>99	>99	45
1120	-	-	-	54
1500	-	-	-	95

En cuanto a las NPs, se realizaron pruebas preliminares con todas las NPs para identificar si presentaban actividad antimicrobiana. Como se observa en la **Tabla 11**, las NPs de Qs fueron las únicas que presentaron actividad antimicrobiana a una concentración de 344 µg/mL, mientras que, las NPs de PLA, PLA-PEI, PLGA y PLGA-PEI no presentaron actividad antimicrobiana. Esto se debe probablemente a la baja concentración de AE LOT II que se encapsuló, teniendo en cuenta que el componente principal del AE LOT II es el timol. De acuerdo con Rathod *et al.*, en 2021 afirma que la CMB del timol es de 561.64 µg/mL contra cepas de *S. aureus* (Rathod *et al.*, 2021).

Tabla 11

Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de PLA, PLGA, PLA-PEI, PLGA, PLGA-PEI y Quitosano cargadas con AE LOT II contra S. aureus ATCC 29213, E.coli ATCC 25922, Salmonella Enteritidis ATCC 13076 y P. aeruginosa ATCC 27853

Microorganismo	Polímero cargado con AE LOT II (µg/mL)				
	PLA (21.3)	PLGA (15.3)	PLA-PEI (10.8)	PLGA-PEI (41.5)	Quitosano (344)
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	+
<i>Salmonella Enteritidis</i>	-	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	+

Nota: +: Inhibe el crecimiento bacteriano a las ocho horas de incubación con las NPs.

-: No inhibe el crecimiento bacteriano a las ocho horas de incubación con las NPs

De acuerdo con los anteriores resultados, se determinó que únicamente las NPs de Qs cargadas con el AE LOT II fueron las que presentaron actividad antimicrobiana. Por lo tanto, se realizaron diluciones seriadas de las NPs de Qs, para determinar la CMI y CMB frente a cada bacteria. Como se observa en la **Tabla 12**. Por otro lado, la CMB contra *P. aeruginosa* fue >688 µg/mL, dado que se observó crecimiento en agar MH y TSB luego de 12 h de incubación. Los resultados obtenidos con las NPs de Qs cargadas con el AE son destacables debido a que el proceso de encapsulación reduce la concentración de AE LOT II en la CMI y CMB entre 1 y 4 veces en comparación con el AE libre. Esta disminución de la CMI y CMB de los AE es debida a la encapsulación en NPs de Qs se ha reportado por diversos autores (Granata *et al.*, 2021; Kavaz *et al.*, 2019; Mondéjar-López *et al.*, 2022; Shetta *et al.*, 2019). Shetta *et al.* documentaron que el AE de *C. sinensis* encapsulado en NPs de Qs presentó una CMB de 570 µg/mL y 1150 µg/mL frente

a *S. aureus* y *E.coli*, respectivamente (Shetta *et al.*, 2019). Por otro lado, Granata *et al.* determinaron que la CMB del AE de *O. vulgare* encapsulado en NPs de Qs fue de 60 µg/mL y 120 µg/mL frente a *S. aureus* y *E.coli*, respectivamente (Granata *et al.*, 2021). Estos resultados y los obtenidos con el AE LOT II indican que la actividad antimicrobiana de los AEs encapsulados en NPs de Qs, está relacionada con la composición relativa del AE que se logra encapsular y con las características de las NPs que se sintetizan.

Tabla 12

Comparación de la CMI y CMB del AE LOT II sin encapsular y las NPs de Qs cargadas con el AE LOT II contra S. aureus ATCC 29213, E. coli ATCC 25922, Salmonella Enteritidis ATCC 13076 y P. aeruginosa ATCC 27853

Microorganismo	AE LOT II sin encapsular		NPs de Qs cargadas con AE LOT II	
	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	280	380	43	172
<i>E. coli</i>	380	560	86	172
<i>Salmonella enterica</i>	280	560	86	172
<i>P. aeruginosa</i>	1125	>1500	344	>688

6.10.2. Determinación de la actividad antimicrobiana del AE LOT II libre y encapsulado en NPs de Qs contra *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida auris* CDC B11903

En cuanto a la actividad antifúngica frente a las dos cepas de *Candida*, se realizaron diluciones de las NPs de Qs cargadas del AE LOT II. Las NPs presentaron una CMI de 43 µg/mL teniendo en cuenta que a las 24 h de incubación no presentaron crecimiento, mientras que a las 48 h se presentó crecimiento (**Tabla 13**). Adicionalmente, se obtuvo una CMF de 86 µg/mL, a las 48 h de incubación. Por otro lado, la CMI y CMF del AE LOT II encapsulado en las NPs de Qs

disminuyó 4.3 veces respecto del AE LOT II libre; este resultado es similar al obtenido por dos Santos *et al.*, en 2020 (dos Santos *et al.*, 2020). Otros autores como Mondéjar-López *et al.* y Dos Santos *et al.*, han documentado que los AEs de *N. savita* y *P. graveolens* encapsulados en NPs de Qs presentaron una CMF de 256 µg/mL y 250 µg/mL frente a *C. albicans*, respectivamente. En este sentido, se evidenció que la concentración de la actividad antifúngica del AE LOT II es inferior a la documentada por otros autores (**Tabla 13**). Del mismo modo, se evidencia que la actividad antifúngica de los AEs encapsulados dependen de la composición relativa del AE y de las características fisicoquímicas de las NPs obtenidas en cada estudio.

Tabla 13

Comparación de la CMI y CMF del AE LOT II libre y encapsulado en NPs de Qs contra C. albicans ATCC 10231 y C. auris CDC B11903

Microorganismo	AE LOT II sin encapsular		NPs de Qs cargadas con AE LOT II	
	CMI (µg/mL)	CMF (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMF (µg/mL)
<i>C. albicans</i>	190	380	43	86
<i>C. auris</i>	190	380	43	86

7. Conclusiones

Se sintetizaron NPs biopoliméricas de PLA, PLGA y Qs cargadas con AE LOT II mediante el método de emulsificación y evaporación de solvente, sin requerimiento de agitación en el ultraturax. Además, se mantuvo el uso del rotoevaporador para eliminar el solvente orgánico presente en la síntesis.

La mejor formulación para la síntesis de nanopartículas de PLA cargadas con AE LOT II tienen un tamaño de 425.9 ± 7.6 nm, PDI de 0.201 ± 0.042 y potencial Z de -19.1 ± 1.2 mV, adicionalmente las nanopartículas mantuvieron una estabilidad intermedia que duró 45 días. La adición de PEI cambió la carga electrostática de las NPs cargadas con AE LOT II con un potencial de 7.7 ± 0.8 mV. Sin embargo, no presentó actividad antimicrobiana.

Las nanopartículas de PLGA con AE LOT II sintetizadas tienen un tamaño de 527.5 ± 16.9 nm, PDI de 0.493 ± 0.112 y potencial Z de -22.9 ± 1.8 mV. Sin embargo, la baja estabilidad se ve reflejada en el aumento de potencial Z y el aumento considerable en el tamaño y el PDI a los 30 días de la síntesis. Así mismo, la adición de PEI cambió el potencial Z a 36.9 ± 1.2 mV, sin obtener actividad antimicrobiana.

Se sintetizaron NPs de Qs cargadas de AE LOT II con tamaño de 198.3 ± 6.3 nm, PDI de 0.249 ± 0.026 y potencial Z de 18.8 ± 3.9 mV, cuyo tamaño fue el menor al obtenido en comparación con los otros biopolímeros (PLA y PLGA). Además, presentaron mayor estabilidad al mantener sus propiedades físicas durante 30 días. El Qs le confirió al AE LOT II un aumento en la estabilidad térmica AE LOT II, incrementando 97 °C la temperatura necesaria para evaporarlo.

La nanoencapsulación en Qs mejoró la actividad antimicrobiana del AE LOT II frente a todas las bacterias estudiadas, debido a que las NPs de Qs cargadas con el AE LOT II disminuyeron

la CMib y CMB alrededor de una y cuatro veces, respectivametne. Además, en el caso de las levaduras, la CMif y CMF del AE LOT II en las NPs de Qs disminuyó 4.3 veces, respectivamente, en comparación con el AE libre. Por tanto, estás NPs constituyen una alternativa promisoría para el desarrollo de tratamiento alternativo de infecciones microbianas o tratamiento antimicrobiano frente a patógenos resistentes a antibióticos y antifúngicos convencionales.

Referencias Bibliográficas

- Ademe, M., & Girma, F. (2020). *Candida auris*: From multidrug resistance to pan-resistant strains. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1287–1294. <https://doi.org/10.2147/IDR.S249864>
- Afrouz, M., Ahmadi-Nouraldinvand, F., Amani, A., Zahedian, H., Elias, S. G., Arabnejad, F., Yaghoubi, H., Farshad, O., Farazi, N., Jalali, A., & Eskanlou, H. (2023). Preparation and characterization of magnetic PEG-PEI-PLA-PEI-PEG/Fe₃O₄-PCL/DNA micelles for gene delivery into MCF-7 cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 79(March 2022), 104016. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104016>
- Ahmad, S., & Alfouzan, W. (2021). *Candida auris*: Epidemiology, diagnosis, pathogenesis, antifungal susceptibility, and infection control measures to combat the spread of infections in healthcare facilities. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040807>
- Alam, A., Foudah, A. I., Salkini, M. A., Raish, M., & Sawale, J. (2022). Herbal Fennel Essential Oil Nanogel: Formulation, Characterization and Antibacterial Activity against *Staphylococcus aureus*. *Gels*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/gels8110736>
- Albuquerque, P. M., Azevedo, S. G., de Andrade, C. P., D'Ambros, N. C. de S., Pérez, M. T. M., & Manzato, L. (2022). Biotechnological Applications of Nanoencapsulated Essential Oils: A Review. *Polymers*, 14(24). <https://doi.org/10.3390/polym14245495>
- Almeida, K. B., Ramos, A. S., Nunes, J. B. B., Silva, B. O., Ferraz, E. R. A., Fernandes, A. S., Felzenszwalb, I., Amaral, A. C. F., Roullin, V. G., & Falcão, D. Q. (2019). PLGA nanoparticles optimized by Box-Behnken for efficient encapsulation of therapeutic *Cymbopogon citratus* essential oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181(June), 935–942. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.010>

- Almeida, R. R., Silva Damasceno, E. T., de Carvalho, S. Y. B., de Carvalho, G. S. G., Gontijo, L. A. P., & de Lima Guimarães, L. G. (2018). Chitosan nanogels condensed to ferulic acid for the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 188(November 2017), 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.103>
- Almnhawy, M., Jebur, M., Alhajamee, M., Marai, K., & Tabrizi, M. H. (2021). PLGA-Based Nano-Encapsulation of *Trachyspermum Ammi* Seed Essential Oil (TSEO-PNP) as a Safe, Natural, Efficient, Anticancer Compound in Human HT-29 Colon Cancer Cell Line. *Nutrition and Cancer*, 73(11–12), 2808–2820. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1862256>
- Antonioli, G., Fontanella, G., Echeverrigaray, S., Longaray Delamare, A. P., Fernandes Pauletti, G., & Barcellos, T. (2020). Poly(lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: *In vitro* and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. *Food Chemistry*, 326(May), 126997. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126997>
- Assadpour, E., & Mahdi Jafari, S. (2019). A systematic review on nanoencapsulation of food bioactive ingredients and nutraceuticals by various nanocarriers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(19), 3129–3151. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1484687>
- Bamian, M., Pajohi-Alamoti, M., Azizian, S., Nourian, A., & Tahzibi, H. (2023). An electrospun polylactic acid film containing silver nanoparticles and encapsulated *Thymus daenensis* essential oil: release behavior, physico-mechanical and antibacterial studies. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 3450–3463. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01890-z>
- Bellich, B., D’Agostino, I., Semeraro, S., Gamini, A., & Cesàro, A. (2016). “The good, the bad and the ugly” of chitosans. In *Marine Drugs* (Vol. 14, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/md14050099>

- Bezhenar, M. B., & Plakhova, K. I. (2020). Mechanisms of Developing Antifungal Drug Resistance of *Candida* spp. in Recurrent Urogenital Candidiasis. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 35(1), 14–21. <https://doi.org/10.3103/S0891416820010024>
- Bowler, P., Murphy, C., & Wolcott, R. (2020). Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00830-6>
- Cabrera-Trujillo, M. A., Filomena-Ambrosio, A., Quintanilla-Carvajal, M. X., & Sotelo-Díaz, L. I. (2018). Stability of low-fat oil in water emulsions obtained by ultra turrax, rotor-stator and ultrasound homogenization methods. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 13(June), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2018.06.002>
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>
- Campini, P. A. L., Oliveira, É. R. de, Camani, P. H., Silva, C. G. da, Yudice, E. D. C., Oliveira, S. A. de, & Rosa, D. dos S. (2021). Assessing the efficiency of essential oil and active compounds/poly (lactic acid) microcapsules against common foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186(February), 702–713. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.071>
- Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in Medicine*, 5(FEB), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- CDC. (2017). About Antimicrobial Resistance | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC. In *Cdc Ncezid Dhqp* (p. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>). <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>

- CDC. (2019). *Biggest Threats and Data*. Prevention, Center for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
- CDC. (2021). *Innovative Actions to Fight Antimicrobial Resistance*. <https://www.cdc.gov/drugresistance/solutions-initiative/innovations-to-slow-AR.html>
- Ceballos-Garzon, A., Wintaco-Martínez, L. M., Velez, N., Hernandez-Padilla, C., De La Hoz, A., Valderrama-Beltran, S. L., Alvarez-Moreno, C. A., Pape, P. Le, Ramírez, J. D., & Parra-Giraldo, C. M. (2020). Persistence of clonal azole-resistant isolates of *Candida albicans* from a patient with chronic mucocutaneous candidiasis in Colombia. *Journal of Global Infectious Diseases*, 12(1), 16–20. https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_74_19
- Cervantes, E., Garcíaz, R., & Salazar, P. M. (2014). Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(4), 196–204. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=99003006&lang=es&site=ehost-live>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547–569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Chipa-Paucar, Y. (2019). Comorbilidades asociadas a infección de tracto urinario por *Escherichia coli* Blee positivo del Hospital Vitarte. 2017 - 2018. *Revista de La Facultad de Medicina Humana*, 19(3), 48–52. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v19i3.2162>
- Chousan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils— Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(4), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Coricaza-Cuaresma, F., Apolaya-Segura, M., & Díaz-Vélez, C. (2019). Perfil microbiológico y

- resistencia antibiótica en el servicio de pediatría de una clínica privada, 2016. *Revista Del Cuerpo Médico Del HNAAA*, 12(2), 159–165.
<https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2019.122.511>
- Corona-Gómez, L., Hernández-Andrade, L., Mendoza-Elvira, S., Suazo, F. M., Ricardo-González, D. I., & Quintanar-Guerrero, D. (2022). *In vitro* antimicrobial effect of essential tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*), thymol, and carvacrol on microorganisms isolated from cases of bovine clinical mastitis. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 10(1), 72–79. <https://doi.org/10.1080/23144599.2022.2123082>
- Cruz, J., Ortiz, C., Guzman, F., Cardenas, C., Fernandez-Lafuente, R., & Torres, R. (2014). Design and activity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Biopolymers*, 101(4), 319–328. <https://doi.org/10.1002/bip.22360>
- da Silva, B. D., Bernardes, P. C., Pinheiro, P. F., Fantuzzi, E., & Roberto, C. D. (2021). Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, 176(November 2020), 108463. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108463>
- Das, S., Singh, V. K., Dwivedy, A. K., Chaudhari, A. K., & Dubey, N. K. (2021). Anethum graveolens Essential Oil Encapsulation in Chitosan Nanomatrix: Investigations on *In Vitro* Release Behavior, Organoleptic Attributes, and Efficacy as Potential Delivery Vehicles Against Biodeterioration of Rice (*Oryza sativa* L.). *Food and Bioprocess Technology*, 14(5), 831–853. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02589-z>
- De Toro, M., Seral, C., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Castillo, F. J., & Sáenz, Y. (2014). Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(1), 4–10.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.006>

Desrini, S., Girardot, M., Imbert, C., Mustofa, M., & Nuryastuti, T. (2023). Screening antibiofilm activity of invasive plants growing at the Slope Merapi Mountain, Central Java, against *Candida albicans*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 232. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04044-2>

Donadu, M. G., Peralta-Ruiz, Y., Usai, D., Maggio, F., Molina-Hernandez, J. B., Rizzo, D., Bussu, F., Rubino, S., Zanetti, S., Paparella, A., & Chaves-Lopez, C. (2021). Colombian essential oil of ruta graveolens against nosocomial antifungal resistant *Candida* strains. *Journal of Fungi*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/jof7050383>

dos Santos, M. K., Kreutz, T., Danielli, L. J., De Marchi, J. G. B., Pippi, B., Koester, L. S., Fuentefria, A. M., & Limberger, R. P. (2020). A chitosan hydrogel-thickened nanoemulsion containing *Pelargonium graveolens* essential oil for treatment of vaginal candidiasis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56(January), 101527. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101527>

Dusankova, M., Pummerova, M., & Sedlarik, V. (2019). Microspheres of essential oil in polylactic acid and poly(methyl methacrylate) matrices and their blends. *Journal of Microencapsulation*, 36(3), 305–316. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1623337>

El-Hammadi, M. M., Small-Howard, A. L., Fernández-Arévalo, M., & Martín-Banderas, L. (2021). Development of enhanced drug delivery vehicles for three cannabis-based terpenes using poly(lactic-co-glycolic acid) based nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, 164(March). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113345>

Escandón, P., Chow, N. A., Caceres, D. H., Gade, L., Berkow, E. L., Armstrong, P., Rivera, S., Misas, E., Duarte, C., Moulton-Meissner, H., Welsh, R. M., Parra, C., Pescador, L. A.,

- Villalobos, N., Salcedo, S., Berrio, I., Varón, C., Espinosa-Bode, A., Lockhart, S. R., ... Chiller, T. M. (2019). Molecular epidemiology of *Candida auris* in Colombia Reveals a Highly Related, Countrywide Colonization with Regional Patterns in Amphotericin B Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 68(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy411>
- Escandón, P., Lockhart, S. R., Chow, N. A., & Chiller, T. M. (2023). *Candida auris* : a global pathogen that has taken root in Colombia. 43, 278–287.
- Fardsanei, F., Soltan Dallal, M. M., Douraghi, M., Memariani, H., Bakhshi, B., Zahraei Salehi, T., & Nikkhahi, F. (2018). Antimicrobial resistance, virulence genes and genetic relatedness of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates recovered from human gastroenteritis in Tehran, Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.005>
- FDA. (2019). *Generally Recognized as Safe (GRAS)*. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>
- Ferrari, R. G., Rosario, D. K. A., Cunha-Neto, A., Mano, S. B., Figueiredo, E. E. S., & Conte-Juniora, C. A. (2019). Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: A meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(14). <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>
- Ghadery-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>
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Kolahreez, D., Ramakrishna, S., & Williams, D. (2019). Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical*

- Engineering*, 10, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.02.004>
- Gholami-Shabani, M., Sotoodehnejadnematalahi, F., Shams-Ghahfarokhi, M., Eslamifar, A., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2022). Physicochemical properties, anticancer and antimicrobial activities of metallic nanoparticles green synthesized by *Aspergillus kambarensis*. *IET Nanobiotechnology*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1049/nbt2.12070>
- Giubilini, A. (2019). Antibiotic resistance as a tragedy of the commons: An ethical argument for a tax on antibiotic use in humans. *Bioethics*, 33(7), 776–784. <https://doi.org/10.1111/bioe.12598>
- Gómez-Sequeda, N., Torres, R., & Ortiz, C. (2017). Synthesis, characterization, and *in vitro* activity against *Candida* spp. Of fluconazole encapsulated on cationic and conventional nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid). *Nanotechnology, Science and Applications*, 10, 95–104. <https://doi.org/10.2147/NSA.S96018>
- Gostev, V. V., Sopova, Y. V., Kalinogorskaya, O. S., Tsvetkova, I. A., & Sidorenko, S. V. (2020). Selection of Resistance to Daptomycin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Role of Homo- and Hetero-Mutations. *Russian Journal of Genetics*, 56(3), 289–297. <https://doi.org/10.1134/S1022795420030060>
- Granata, G., Stracquadanio, S., Leonardi, M., Napoli, E., Malandrino, G., Cafiso, V., Stefani, S., & Geraci, C. (2021). Oregano and thyme essential oils encapsulated in chitosan nanoparticles as effective antimicrobial agents against foodborne pathogens. *Molecules*, 26(13). <https://doi.org/10.3390/molecules26134055>
- Guo, Q., Du, G., Jia, H., Fan, Q., Wang, Z., Gao, Z., Yue, T., & Yuan, Y. (2021). Essential oils encapsulated by biopolymers as antimicrobials in fruits and vegetables: A review. *Food Bioscience*, 44(PA), 101367. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101367>

- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>
- Gursu, B. Y., Dag, İ., & Dikmen, G. (2022). Antifungal and antibiofilm efficacy of cinnamaldehyde-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against *Candida albicans*. *International Microbiology*, *25*(2), 245–258. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00210-z>
- Hadidi, M., Pouramin, S., Adinepour, F., Haghani, S., & Jafari, S. M. (2020). Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. *Carbohydrate Polymers*, *236*(November 2019), 116075. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116075>
- Hasani, S., Ojagh, S. M., & Ghorbani, M. (2018). Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, *115*, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.038>
- Hayes, D. G. (2017). Commentary: The Relationship Between “Biobased,” “Biodegradability” and “Environmentally-Friendliness (or the Absence Thereof). *JAACS, Journal of the American Oil Chemists’ Society*, *94*(11), 1329–1331. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3040-9>
- Hernández, R., Bustamante, L., Lesport, L. P., Nassar, N., & Méndez, I. (2019). *Prevalence and susceptibility profile of community-acquired methicilin-resistant Staphylococcus aureus in young athletes*. *86*(1), 13–17.
- Hill, L. E., Taylor, T. M., & Gomes, C. (2013). Antimicrobial Efficacy of Poly (DL-lactide-co-

- glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped Cinnamon Bark Extract against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Science*, 78(4).
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12069>
- 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>
- Hurtado, I. C., Valencia, S., Pinzon, E. M., Lesmes, M. C., Sanchez, M., Rodriguez, J., Ochoa, B., Shewade, H. D., Edwards, J. K., Hann, K., & Khogali, M. (2023). Antibiotic resistance and consumption before and during the COVID-19 pandemic in Valle del Cauca, Colombia. *Revista Panamericana de Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*, 47, e10.
<https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.10>
- Iannitelli, A., Grande, R., di Stefano, A., di Giulio, M., Sozio, P., Bessa, L. J., Laserra, S., Paolini, C., Protasi, F., & Cellini, L. (2011). Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8), 5039–5051. <https://doi.org/10.3390/ijms12085039>
- Idris, M., Huzaiifa, U., Hamisu, H., & S, Z. (2015). Nanoencapsulation of essential oils with enhanced antimicrobial activity: A new way of combating antimicrobial resistance Nanoencapsulation of essential oils with enhanced antimicrobial activity : A new way of combating antimicrobial Resistance. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(January), 165–170.
- INS. (2019). Infecciones asociadas a la atención en salud. *Epidemiología de Las Infecciones Asociadas a La Atención En Salud*, 29–44.

- INS. (2023a). *Comportamiento epidemiológico de los brotes de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS), Colombia , 2021 a 2022.*
- INS. (2023b). *Reporte técnico: informe de la predicción de la incidencia de enfermedad diarreica aguda en Colombia relacionada con riesgos microbiológicos en agua para consumo dietario, a través de algoritmo de estimación probabilística, 2020.*
- Ivanova, A., Ivanova, K., Hoyo, J., Heinze, T., Sanchez-Gomez, S., & Tzanov, T. (2018). Layer-By-Layer Decorated Nanoparticles with Tunable Antibacterial and Antibiofilm Properties against Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(4), 3314–3323. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16508>
- Jem, K. J., & Tan, B. (2020). The development and challenges of poly (lactic acid) and poly (glycolic acid). *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(2), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2020.01.002>
- Jiang, J., Gong, L., Dong, Q., Kang, Y., Osako, K., & Li, L. (2020). Characterization of PLA-P3,4HB active film incorporated with essential oil: Application in peach preservation. *Food Chemistry*, 313(June 2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126134>
- Jiménez Velásquez, S. del C., Torres Higuera, L. D., Parra Arango, J. L., Rodríguez Bautista, J. L., García Castro, F. E., & Patiño Burbano, R. E. (2020). Profile of antimicrobial resistance in isolates of *Staphylococcus* spp. obtained from bovine milk in Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.004>
- Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3042–3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- Karami, P., Khaledi, A., Mashoof, R. Y., Yaghoobi, M. H., Karami, M., Dastan, D., & Alikhani,

- M. Y. (2020). The correlation between biofilm formation capability and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene Reports*, 18(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100561>
- Kavaz, D., Idris, M., & Onyebuchi, C. (2019). Physiochemical characterization, antioxidative, anticancer cells proliferation and food pathogens antibacterial activity of chitosan nanoparticles loaded with *Cyperus articulatus* rhizome essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 837–845. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.177>
- Kemala, T., Budianto, E., & Soegiyono, B. (2012). Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(1), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.08.003>
- Khan, I., Bahuguna, A., Shukla, S., Aziz, F., Chauhan, A. K., Ansari, M. B., Bajpai, V. K., Huh, Y. S., & Kang, S. C. (2020). Antimicrobial potential of the food-grade additive carvacrol against uropathogenic *E. coli* based on membrane depolarization, reactive oxygen species generation, and molecular docking analysis. *Microbial Pathogenesis*, 142(March 2019), 104046. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104046>
- Kilburn, S., Innes, G., Quinn, M., Southwick, K., Ostrowsky, B., Greenko, J. A., Lutterloh, E., Greeley, R., Magleby, R., Chaturvedi, V., & Chaturvedi, S. (2022). Antifungal Resistance Trends of *Candida auris* Clinical Isolates in New York and New Jersey from 2016 to 2020. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(3). <https://doi.org/10.1128/aac.02242-21>
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1–18.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>

Lastra-Vargas, L., Hernández-Nava, R., Ruíz-González, N., Jiménez-Munguía, M. T., López-Malo, A., & Palou, E. (2023). Oregano essential oil as an alternative antimicrobial for the control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in Turkey mortadella during refrigerated storage. *Food Chemistry Advances*, 2(June 2022), 100314.

<https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100314>

Li, Q., Hu, X., Perkins, P., & Ren, T. (2023). Antimicrobial film based on poly(lactic acid) and natural halloysite nanotubes for controlled cinnamaldehyde release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 224(October 2022), 848–857.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.171>

Li, Y., Shan, M., Yan, M., Yao, H., Wang, Y., Gu, B., Zhu, Z., & Li, H. (2019). AntiCandidal Activity of Kalopanaxsaponin A: Effect on Proliferation, Cell Morphology, and Key Virulence Attributes of *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, 10(December), 1–9.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02844>

Liu, T., Kang, J., & Liu, L. (2021). Thymol as a critical component of *Thymus vulgaris* L. essential oil combats *Pseudomonas aeruginosa* by intercalating DNA and inactivating biofilm. *Lwt*, 136(P2), 110354. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110354>

Loaiza Oliva, M., Morales Uchima, S. M., Puerta Suárez, J., Mesa Arango, A. C., & Martínez Pabón, M. C. (2023). *Lippia origanoides* derivatives in vitro evaluation on polymicrobial biofilms: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*, 148(December 2022). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105656>

López-Calleja, A. I., Morales, E. M., Medina, R. N., Esgueva, M. F., Pareja, J. S., Moya, J. M. G. L., Cerón, I. F., Bayon, J. V., & López, A. R. (2019). Antimicrobial activity of ceftolozane-

- tazobactam against multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Spanish hospital. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 32(1), 68–72.
- Martins, J. C. L., Pintor-Cora, A., Alegría, Á., Santos, J. A., & Herrera-Arias, F. (2023). Characterization of ESBL-producing *Escherichia* spp. and report of an mcr-1 colistin-resistance *Escherichia fergusonii* strain from minced meat in Pamplona, Colombia. *International Journal of Food Microbiology*, 394(March), 110168. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110168>
- Min, T., Sun, X., Yuan, Z., Zhou, L., Jiao, X., Zha, J., Zhu, Z., & Wen, Y. (2021). Novel antimicrobial packaging film based on porous poly(lactic acid) nanofiber and polymeric coating for humidity-controlled release of *thyme* essential oil. *Lwt*, 135(August 2020), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110034>
- Mokhtareizadeh, Z., & Homayouni Tabrizi, M. (2022). Optimisation of Ferula assa-foetida - Loaded PLGA Nanoparticles Synthesised and evaluation of putative mechanism for anticancer properties. *Materials Technology*, 37(11), 1954–1967. <https://doi.org/10.1080/10667857.2021.2016293>
- Mondéjar-López, M., López-Jiménez, A. J., García Martínez, J. C., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., & Niza, E. (2022). Thymoquinone-Loaded Chitosan Nanoparticles as Natural Preservative Agent in Cosmetic Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020898>
- Motoa, G., Muñoz, J. S., Oñate, J., Pallares, C. J., Hernández, C., & Villegas, M. V. (2017). Epidemiología de aislamientos de *Candida* en unidades de cuidados intensivos en Colombia durante el período 2010–2013. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1), 17–22.

<https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.02.006>

Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *105*, 1358–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>

Ndezo Bisso, B., Tokam Kuate, C. R., Boulens, N., Allémann, E., Delie, F., & Dzoyem, J. P. (2022). Antibiofilm Synergistic Activity of Streptomycin in Combination with Thymol-Loaded Poly (Lactic-co-glycolic Acid) Nanoparticles against *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2022*. <https://doi.org/10.1155/2022/1936165>

Niza, E., Božik, M., Bravo, I., Clemente-Casares, P., Lara-Sanchez, A., Juan, A., Klouček, P., & Alonso-Moreno, C. (2020). PEI-coated PLA nanoparticles to enhance the antimicrobial activity of carvacrol. *Food Chemistry*, *328*(February). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127131>

Ogawara, H. (2019). Comparison of antibiotic resistance mechanisms in antibiotic-producing and pathogenic bacteria. *Molecules*, *24*(19), 1–56. <https://doi.org/10.3390/molecules24193430>

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*(JAN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, *37*(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

Parastan, R., Kargar, M., Solhjoo, K., & Kafilzadeh, F. (2020). *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. *Gene Reports*, *20*(March).

<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100739>

Park, K. (2013). Facing the truth about nanotechnology in drug delivery. *ACS Nano*, 7(9), 7442–

7447. <https://doi.org/10.1021/nm404501g>

Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Sant’Ana, A. S., Domínguez, R., Rodríguez-Lázaro, D., &

Lorenzo, J. M. (2021). Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 337(May 2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108966>

Pérez-Ardila, M. A., Noreña, I., Millán, H. A., Naranjo, J. A., Castellanos, J., Ladino, L., Luna, F.

A., Rincón, L. F., & Duarte, L. (2020). Perfil de resistencia de la *Salmonella* sp durante un periodo de tres años en un hospital de Colombia. *Revista Ciencias de La Salud*, 18(1), 108. <https://doi.org/10.12804/revistas.urosario.edu.co/revsalud/a.8768>

Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018).

Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 1–27. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.Correspondence>

Pola, C. C., Moraes, A. R. F., Medeiros, E. A. A., Teófilo, R. F., Soares, N. F. F., & Gomes, C. L.

(2019). Development and optimization of pH-responsive PLGA-chitosan nanoparticles for triggered release of antimicrobials. *Food Chemistry*, 295(May), 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.165>

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>

Pumipuntu, N., & Pumipuntu, S. (2020). Detection of antimicrobial resistance genes of

- carbapenem-resistant enterobacteriaceae in *Escherichia coli* isolated from the water supply of smallholder dairy farms in Saraburi and Maha Sarakham, Thailand. *International Journal of One Health*, 6(1), 1–5. <https://doi.org/10.14202/IJOH.2020.1-5>
- Qin, Y., Li, W., Liu, D., Yuan, M., & Li, L. (2017). Development of active packaging film made from poly (lactic acid) incorporated essential oil. *Progress in Organic Coatings*, 103, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2016.10.017>
- Quintero Peña, L. M., Rojas Suárez, D. A., Blanco Vásquez, S. I., Castillo León, J. J., & Gutiérrez Cifuentes, J. A. (2020). *Estudio del Efecto de la Deposición Electroforética de Moléculas Funcionales sobre las Propiedades Antimicrobianas de Superficies de Titanio* (Issue February) [Universidad Industrial de Santander]. http://tangara.uis.edu.co/biblioweb/pags/cat/popup/pa_detalle_matbib.jsp?parametros=189270%7C%7C1%7C2
- Rai, P., Mehrotra, S., Priya, S., Gnansounou, E., & Sharma, S. K. (2021). Recent advances in the sustainable design and applications of biodegradable polymers. *Bioresource Technology*, 325(January), 124739. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124739>
- Rajivgandhi, G., Stalin, A., Kanisha, C. C., Ramachandran, G., Manoharan, N., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., Alanzi, K. F., & Li, W. J. (2021). Physicochemical characterization and anti-carbapenemase activity of chitosan nanoparticles loaded Aegle marmelos essential oil against *K. pneumoniae* through DNA fragmentation assay. *Surfaces and Interfaces*, 23(August 2020), 100932. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.100932>
- Rathod, N. B., Kulawik, P., Ozogul, F., Regenstein, J. M., & Ozogul, Y. (2021). Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 116(March), 733–748.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.023>

Rehman, A., Jafari, S. M., Aadil, R. M., Assadpour, E., Randhawa, M. A., & Mahmood, S. (2020).

Development of active food packaging via incorporation of biopolymeric nanocarriers containing essential oils. *Trends in Food Science and Technology*, *101*(November 2019), 106–121. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.001>

Rezaei, A., Fathi, M., & Jafari, S. M. (2019). Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. *Food Hydrocolloids*, *88*(September 2018), 146–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.003>

Rizzo, S., Di Vito, M., Mazzinelli, E., Favuzzi, I., Torelli, R., Cacaci, M., Arcovito, A., Sanguinetti, M., Garzoli, S., Nocca, G., & Bugli, F. (2023). Cinnamaldehyde Loaded Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) Microparticles for Antifungal Delivery Application against Resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Plants*, *12*(13). <https://doi.org/10.3390/plants12132437>

Romero, G., Estrela-Lopis, I., Zhou, J., Rojas, E., Franco, A., Espinel, C. S., Fernández, A. G., Gao, C., Donath, E., & Moya, S. E. (2010). Surface engineered poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for intracellular delivery: Uptake and cytotoxicity - A confocal Raman microscopic study. *Biomacromolecules*, *11*(11), 2993–2999. <https://doi.org/10.1021/bm1007822>

Romeu, M. J., Rodrigues, D., & Azeredo, J. (2020). Effect of sub-lethal chemical disinfection on the biofilm forming ability, resistance to antibiotics and expression of virulence genes of *Salmonella Enteritidis* biofilm-surviving cells. *Biofouling*, *36*(1), 101–112. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1719077>

Sagiri, S. S., Anis, A., & Pal, K. (2016). Review on Encapsulation of Vegetable Oils: Strategies,

- Preparation Methods, and Applications. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 55(3), 291–311. <https://doi.org/10.1080/03602559.2015.1050521>
- San Miguel, A., San Miguel Rodríguez, M., Sánchez Martín, M. A., Pastor, M. R., & Pachón, J. (2019). Importancia de las infecciones por *Candida* en neonatología. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 12(1), 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2018.10.002>
- Sanyaolu, A., Okorie, C., Marinkovic, A., Abbasi, A. F., Prakash, S., Mangat, J., Hosein, Z., Haider, N., & Chan, J. (2022). *Candida auris*: An Overview of the Emerging Drug-Resistant Fungal Infection. *Infection and Chemotherapy*, 54(2), 236–246. <https://doi.org/10.3947/IC.2022.0008>
- Satoh, K., Makimura, K., Hasumi, Y., Nishiyama, Y., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2009). *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunology*, 53(1), 41–44. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x>
- Scaffaro, R., Lopresti, F., Marino, A., & Nostro, A. (2018). Antimicrobial additives for poly(lactic acid) materials and their applications: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7739–7756. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9220-1>
- Shajari, G., Khorshidi, A., & Moosavi, G. (2017). Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strains. *Archives of Razi Institute*, 90(54), 107–110.
- Sharafutdinov, I. S., Ozhegov, G. D., Sabirova, A. E., Novikova, V. V., Lisovskaya, S. A., Khabibrakhmanova, A. M., Kurbangalieva, A. R., Bogachev, M. I., & Kayumov, A. R. (2020). Increasing Susceptibility of Drug-Resistant *Candida albicans* to Fluconazole and Terbinafine by 2(5H)-Furanone Derivative. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030642>

- 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*, 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.161>
- Silva Damasceno, E. T., Almeida, R. R., de Carvalho, S. Y. B., de Carvalho, G. S. G., Mano, V., Pereira, A. C., & de Lima Guimarães, L. G. (2018). *Lippia origanoides* Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and ρ -coumaric acid: Encapsulation efficiency and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, *125*(August), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.074>
- Singh, S., Wang, M., Gao, R., Teng, P., Odom, T., Zhang, E., Xu, H., & Cai, J. (2020). Lipidated α /Sulfono- α -AA heterogeneous peptides as antimicrobial agents for MRSA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *28*(1), 115241. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115241>
- Singhvi, M. S., Zinjarde, S. S., & Gokhale, D. V. (2019). Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *Journal of Applied Microbiology*, *127*(6), 1612–1626. <https://doi.org/10.1111/jam.14290>
- Soltanzadeh, M., Peighambaroust, S. H., Ghanbarzadeh, B., Mohammadi, M., & Lorenzo, J. M. (2021). Chitosan nanoparticles encapsulating lemongrass (*Cymbopogon commutatus*) essential oil: Physicochemical, structural, antimicrobial and *in-vitro* release properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *192*(August), 1084–1097. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.070>
- Su, Y., Zhang, B., Sun, R., Liu, W., Zhu, Q., Zhang, X., Wang, R., & Chen, C. (2021). PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application. *Drug Delivery*, *28*(1), 1397–1418.

<https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1938756>

Swider, E., Koshkina, O., Tel, J., Cruz, L. J., de Vries, I. J. M., & Srinivas, M. (2018). Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, *73*, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.006>

Swidergall, M., & LeibundGut-Landmann, S. (2022). Immunosurveillance of *Candida albicans* commensalism by the adaptive immune system. *Mucosal Immunology*, *15*(5), 829–836. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00536-5>

Taban, A., Saharkhiz, M. J., & Khorram, M. (2020). Formulation and assessment of nano-encapsulated bioherbicides based on biopolymers and essential oil. *Industrial Crops and Products*, *149*(January), 112348. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112348>

Tangarife-Castaño, V., Correa-Royero, J., Zapata-Londoño, B., Durán, C., Stanshenko, E., & Mesa-Arango, A. C. (2011). Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio*, *15*(3), 160–167. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(11\)70080-7](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(11)70080-7)

Terreni, M., Taccani, M., & Pregnolato, M. (2021). New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: Latest research developments and future perspectives. *Molecules*, *26*(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>

Torres, K. G., Almeida, R. R., de Carvalho, S. Y. B., Haddad, J. F., Leitão, A. A., & Luiz, L. G. (2020). Synthesis and characterization of dihydrocaffeic acid grafted chitosan nanogel for nanoencapsulation of *Matricaria recutita* essential oil. *Materials Today Communications*, *24*(July 2019), 101252. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101252>

Vidal, J. L., Clavijo, V., Castellanos, L. R., Kathiresan, J., Kumar, A. M. V., Mehta, K., & Chaparro-Gutiérrez, J. J. (2023). Multidrug-resistant *Salmonella* spp. in fecal samples of pigs

- with suspected salmonellosis in Antioquia, Colombia, 2019-2021. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 47, 2019–2021. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.46>
- Vrouvaki, I., Koutra, E., Kornaros, M., Avgoustakis, K., Lamari, F. N., & Hatziantoniou, S. (2020). Polymeric nanoparticles of *Pistacia lentiscus* var. Chia essential oil for cutaneous applications. *Pharmaceutics*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040353>
- Wang, X., Tian, L., Fu, J., Liao, S., Yang, S., Jia, X., & Gong, G. (2022). Evaluation of the membrane damage mechanism of thymol against *Bacillus cereus* and its application in the preservation of skim milk. *Food Control*, 131(March 2021), 108435. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108435>
- Weisany, W., Yousefi, S., Tahir, N. A. razzak, Golestanehzadeh, N., McClements, D. J., Adhikari, B., & Ghasemlou, M. (2022). Targeted delivery and controlled released of essential oils using nanoencapsulation: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 303(March), 102655. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102655>
- Wongkanya, R., Teeranachaideekul, V., Makarasen, A., Chuysinuan, P., Yingyuad, P., Nooeaid, P., Techasakul, S., Chuenchom, L., & Dechtrirat, D. (2020). Electrospun poly(lactic acid) nanofiber mats for controlled transdermal delivery of essential oil from Zingiber cassumunar Roxb. *Materials Research Express*, 7(5). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab8fea>
- Wu, P., Tang, X., Jian, R., Li, J., Lin, M., Dai, H., Wang, K., Sheng, Z., Chen, B., Xu, X., Li, C., Lin, Z., Zhang, Q., Zheng, X., Zhang, K., Li, D., & Hong, W. D. (2021). Chemical Composition, Antimicrobial and Insecticidal Activities of Essential Oils of Discarded Perfume Lemon and Leaves (*Citrus Limon* (L.) Burm. F.) as Possible Sources of Functional Botanical Agents. *Frontiers in Chemistry*, 9(May), 1–11.

<https://doi.org/10.3389/fchem.2021.679116>

- Yadav, A., Kujur, A., Kumar, A., Singh, P. P., Gupta, V., & Prakash, B. (2020). Encapsulation of *Bunium persicum* essential oil using chitosan nanopolymer: Preparation, characterization, antifungal assessment, and thermal stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, *142*, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.089>
- Zhang, X., Ismail, B. B., Cheng, H., Jin, T. Z., Qian, M., Arabi, S. A., Liu, D., & Guo, M. (2021). Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation - A review of advances and applications. *Carbohydrate Polymers*, *273*(June), 118616. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118616>
- Zhao, F., Yang, H., Bi, D., Khaledi, A., & Qiao, M. (2020). A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract infections. *Microbial Pathogenesis*, *144*(March), 104196. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104196>
- Zhu, Z., Min, T., Zhang, X., & Wen, Y. (2019). Microencapsulation of thymol in poly(lactide-co-glycolide) (PLGA): Physical and antibacterial properties. *Materials*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/ma12071133>