



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



Facultad de Ingeniería, Arquitectura y

Diseño

Evaluación de la liberación de  $\alpha$ -tocoferol y *Origanum vulgare*  
nanoencapsulados con quitosano expuesto a distintas soluciones a través  
del tiempo

Tesis para obtener el grado de:

Ingeniera en Nanotecnología

Presenta:

Mayela Guadalupe Ojeda López

Directora:

Dra. María Teresa Viana

Codirector:

Dr. Guillermo Amaya Parra



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



**“Evaluación de la liberación de  $\alpha$ -tocoferol y Origanum vulgare  
nanoencapsulados con quitosano expuesto a distintas soluciones a través  
del tiempo”**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**MAYELA GUADALUPE OJEDA LÓPEZ**  
361335

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una  
revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los  
señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

  
**Dra. Marie Teresa Viana**  
Castrillón  
DIRECTOR

  
**Dr. Guillermo Amaya**  
Parra  
CODIRECTOR

  
**Dra. Haydee Lopez**  
Rodríguez  
SINODAL

  
**Dr. Jorge Octavio Mata**  
Ramírez  
SINODAL

  
**Dr. Franklin David Muñoz**  
Muñoz  
SINODAL

**“Por la Realización Plena del Ser”**

*A mi mamá, gracias por tanto.*

*A mi mamá Chuy, mi tata y a mi papá, les mando un saludo al cielo.*

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Tere Viana, por ser una guía excepcional e inspiración constante. Ha sido un honor discutir cada etapa de estos experimentos con usted; gracias por su tiempo, su paciencia y, sobre todo, por abrirme las puertas de su laboratorio desde el primer momento y brindarme esta gran oportunidad.

Agradezco también profundamente a mi codirector, el Dr. Guillermo Amaya, por su compromiso constante, su apoyo durante todo el proceso y por creer siempre en la formación de grandes nanoingenieros. A mi comité de tesis, integrado por la Dra. Haydee López, el Dr. Jorge Mata y el Dr. Franklin Muñoz, muchas gracias por sus correcciones y por el apoyo durante el proceso.

A Andrea y Adrián, gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme y por resolver una interminable lista de dudas (y vaya que han sido muchas). Ustedes fueron quienes me motivaron a iniciar este camino, y estoy muy feliz de haberlo recorrido. Al Dr. Emyr, gracias por su disposición para responder mis preguntas y ayudar en todo momento. También agradezco al equipo del Laboratorio de Nutrición y Fisiología Acuícola de IIO, quienes siempre me han tratado con amabilidad y han estado dispuestos a ayudar. Un agradecimiento especial a Aurora, por explicarme con tanta paciencia los procedimientos del laboratorio.

Mi gratitud también para el Laboratorio de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, por permitirme realizar pruebas en sus instalaciones y enseñarme cómo llevarlas a cabo.

Finalmente, gracias a mis amigos y a mi familia por estar siempre al pendiente de mí y por su apoyo incondicional. A mis amigas Danna y Joss, gracias por haber iniciado este proceso juntas y por estar a mi lado en todo momento. A los Ks, gracias por llenar mis días de alegría.

## Resumen

En este estudio, se evaluó la liberación de aceite de orégano, *Origanum vulgare* y  $\alpha$ -tocoferol a partir de nanopartículas de quitosano sintetizadas mediante gelación iónica en un entorno lipofílico, utilizando aceite de hígado de bacalao como solvente. Para la síntesis de las nanopartículas, se empleó quitosano a pH 4.5, junto con tripolifosfato de sodio, glutaraldehído como agentes entrecruzantes, para después recubrirlas con lisina como agente protector. El aceite de orégano consistiendo en una mezcla de carvacrol y timol, se nanoencapsuló después de emulsificarlo con Tween 20, mientras que el  $\alpha$ -tocoferol se disolvió en una solución con dimetil sulfóxido (DMSO). Ambos compuestos se cuantificaron por espectroscopía UV-vis, para obtener la eficiencia de encapsulación, que fue del 100% para el orégano y del 20% para el  $\alpha$ -tocoferol. La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) determinó diámetros hidrodinámicos de 94 nm para el orégano y 157 nm para el  $\alpha$ -tocoferol, con potenciales zeta de 20.4 y 18 mV, respectivamente, indicando una estabilidad moderada de las nanopartículas. Además, para evaluar la cinética de liberación, y considerando que ambos compuestos son hidrofóbicos, las nanopartículas se expusieron a un medio de aceite de hígado de bacalao durante 2 y 24 horas. Los resultados indicaron que ni el aceite de orégano ni el  $\alpha$ -tocoferol se liberaron en este entorno lipofílico, sugiriendo una fuerte retención en las nanopartículas. Adicionalmente, se comparó la actividad antioxidante de los compuestos en su forma libre y encapsulada mediante el ensayo de radical ABTS $\bullet$ +, con resultados expresados en equivalentes de Trolox y BHT. En el caso del aceite de orégano, no se observó diferencia significativa entre las dos formas (91% en ambos casos). En contraste, el  $\alpha$ -tocoferol encapsulado mostró una actividad antioxidante notablemente mayor (91%) frente al  $\alpha$ -tocoferol libre (40%), lo que confirma que la encapsulación mejora la capacidad antioxidante de este compuesto sin degradarla.

## Abstract

In this study, the release of oregano oil (*Origanum vulgare*) and  $\alpha$ -tocopherol from chitosan nanoparticles synthesized via ionic gelation was evaluated in a lipophilic environment, using cod liver oil as the solvent. For the nanoparticle synthesis, chitosan at pH 4.5 was employed, combined with sodium tripolyphosphate and glutaraldehyde as cross-linking agents, and then coated with lysine as a protective agent. The oregano oil, composed of a mixture of carvacrol and thymol, was nanoencapsulated after emulsification with Tween 20, while  $\alpha$ -tocopherol was dissolved in a dimethyl sulfoxide (DMSO) solution. Both compounds were quantified using UV-vis spectroscopy to determine encapsulation efficiency, which was 100% for oregano oil and 20% for  $\alpha$ -tocopherol.

Dynamic light scattering (DLS) analysis revealed hydrodynamic diameters of 94 nm for oregano oil and 157 nm for  $\alpha$ -tocopherol, with zeta potentials of 20.4 mV and 18 mV, respectively, indicating moderate nanoparticle stability. To assess release kinetics, considering that both compounds are hydrophobic, the nanoparticles were exposed to a cod liver oil medium for 2 and 24 hours. The results showed that neither oregano oil nor  $\alpha$ -tocopherol was released in this lipophilic environment, suggesting strong retention within the nanoparticles.

Additionally, the antioxidant activity of the free and encapsulated compounds was compared using the ABTS $\bullet$ + radical assay, with results expressed in Trolox and BHT equivalents. For oregano oil, no significant difference was observed between the free and encapsulated forms (91% in both cases). In contrast, encapsulated  $\alpha$ -tocopherol exhibited significantly higher antioxidant activity (91%) compared to its free form (40%), confirming that encapsulation enhances the antioxidant capacity of this compound without degrading it.

## Contenido

Agradecimientos .....	3
Resumen.....	4
Contenido.....	6
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tablas .....	10
1 Introducción.....	11
2 Antecedentes.....	14
2.1 Nanopartículas de CS/Or .....	14
2.2 Nanopartículas de CS/ $\alpha$ Toc .....	15
2.3 Liberación a partir de nanopartículas de quitosano .....	16
3 Marco teórico.....	17
3.1 Quitosano .....	17
3.2 Carvacrol.....	19
3.3 $\alpha$ -Tocoferol.....	20
3.4 Gelación iónica .....	22
3.5 Espectroscopía UV-vis.....	23
3.6 Dispersión de la Luz Dinámica (DLS) .....	24
3.7 Ensayo de actividad antioxidante con ABTS .....	27
4 Hipótesis .....	28
5 Objetivos.....	28
5.1 Objetivo General .....	28
5.1.1 Objetivos específicos .....	28
6 Metodología.....	29
6.1 Soluciones .....	29
6.2 Configuración del sistema Poseidón .....	30
6.3 Síntesis de NPs.....	32
6.4 Caracterización .....	33
6.5 Dispersión de la Luz Dinámica (DLS) .....	33
6.6 Eficiencia de encapsulación .....	33
6.7 Mediciones de liberación.....	34

6.8	Ensayo de actividad antioxidante.....	35
7	Resultados y Discusión.....	37
7.1	Dispersión de la Luz Dinámica .....	37
7.2	Eficiencia de Encapsulación (EE%).....	40
7.3	Liberación .....	43
7.4	Capacidad Antioxidante .....	45
8	Conclusiones.....	50
9	Referencias .....	51

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Cinéticas de liberación de resveratrol en fluidos simulados.

**Figura 2.** Estructura química del quitosano

**Figura 3.** Carga de superficie del quitosano de acuerdo con el pH del medio.

**Figura 4.** Estructura química del carvacrol

**Figura 5.** Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol.

**Figura 6.** Representación gráfica del método de síntesis de gelación iónica.

**Figura 7.** Esquema de un espectrofotómetro utilizado para medir la absorbancia de una muestra.

**Figura 8.** Esquema del funcionamiento de la técnica de Dispersión de la Luz Dinámica (DLS).

**Figura 9.** Representación del cambio de color en el ensayo ABTS: el radical catiónico  $ABTS^{\bullet+}$  (verde) es reducido a  $ABTS^{2-}$  (incolore) en presencia de un antioxidante

**Figura 10.** Configuración de los parámetros sistema Poseidón en el ordenador.

**Figura 11.** Control del sistema Poseidón.

**Figura 12.** Modelo en tercera dimensión del sistema Poseidón

**Figura 13.** Esquema del proceso de síntesis de nanopartículas de quitosano por gelación iónica.

**Figura 14.** Esquema del experimento que se realizó para evaluar la cinética de liberación de aceite de orégano y  $\alpha$ -tocoferol a partir de las nanopartículas de quitosano, en aceite de hígado de bacalao.

**Figura 15.** Microscopía de fluorescencia de los cortes de hepatopáncreas de camarones colectados en el día 2 del grupo control A-D). A) campo claro, B) filtro azul, C) filtro verde, D) filtro rojo.

Microscopía de fluorescencia de cortes de hepatopáncreas de camarones colectados en el día 2 del grupo experimental E-H). E) campo claro, F) filtro azul, G) filtro verde, H) filtro rojo.

**Figura 16.** a) Espectro de absorbancia del carvacrol, b) Curva de calibración para la cuantificación de carvacrol.

**Figura 17.** a) Espectro de absorbancia del  $\alpha$ -tocoferol, b) Curva de calibración para la cuantificación de  $\alpha$ -tocoferol.

**Figura 18.** Espectro de absorbancia de la fase no polar de las nanopartículas de quitosano con carvacrol expuestas a aceite de hígado de bacalao después de a) 2hrs y b) 24 hrs.

**Figura 19.** Curva de calibración para actividad antioxidante de a) Trolox y b) BHT.

## **Lista de Tablas**

**Tabla 1.** Parámetros para la configuración del sistema Poseidón durante la síntesis de las nanopartículas de quitosano por gelación iónica.

**Tabla 2.** Resultados de DLS para los cuatro diferentes lotes de nanopartículas sintetizados.

**Tabla 3.** Resultados de eficiencia de encapsulación (EE%) para los distintos lotes de nanopartículas sintetizados.

**Tabla 4.** Actividad antioxidante de los distintos lotes de nanopartículas sintetizados.

**Tabla 5.** Actividad antioxidante de los distintos lotes de nanopartículas sintetizados, comparados con sus equivalentes en Trolox y BHT, según las curvas de calibración elaboradas.

## **Lista de graficas**

**Gráfica 1.** Resultados de eficiencia de encapsulación (EE%) para los distintos lotes de nanopartículas sintetizados.

**Gráfica 2.** Actividad antioxidante de los distintos lotes de nanopartículas sintetizados.

## 1. Introducción

La pesca y la acuicultura han tomado un papel prominente en cuanto a la alimentación de la población mundial. La acuicultura es la industria de producción de alimentos de origen animal que crece más rápido, representando la mitad del suministro actual de productos de mar. Esta tiene una tasa anual de crecimiento de 9.6% desde 1990 hasta 2018, la cual es muy superior a la tasa de crecimiento de la población. No obstante, la tasa de crecimiento ha disminuido de 5.8% en 2001-2010 a 4.5% en el periodo 2011-2018 (Abate et al., 2016; Abdullah et al., 2017; Jolly et al., 2023).

En los organismos cultivados, y en particular los acuáticos, es común el estrés oxidativo, sobre todo ahora que se experimentan cambios radicales debido al calentamiento global. En líneas generales, tanto los factores internos como externos son los principales desencadenantes de esta situación, incluyendo aspectos como la temperatura, el nivel de oxígeno, la historia de vida, la alimentación, la escasez de alimentos y la presencia de contaminantes industriales y agrícolas (Ahmed et al., 2020).

El estrés oxidativo es un desbalance entre la generación de especies reactivas y la defensa antioxidante (Halliwell & Whiteman, 2004), siendo el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) la causa. Un nivel elevado de estrés oxidativo puede causar daño en las células y tejidos, manifestándose principalmente a través de procesos como la hidroxilación del ADN, la desnaturalización de proteínas, la peroxidación de lípidos y la apoptosis celular (Hoseinifar et al., 2021; Song et al., 2023).

El término ROS hace referencia a un grupo de moléculas que contienen oxígeno con una diferente reactividad química, que incluso, se les considera como metabolitos del oxígeno. Esto debido a que han sido parcialmente reducidos y poseen una gran capacidad oxidante debido a que son

especies reactivas que producen una reacción en cadena (Carvajal Carvajal, 2019). Cualquier organismo vivo es capaz de lograr un equilibrio (homeostasis) expresando enzimas endógenas antioxidantes para neutralizar los ROS. Proceso que conlleva a un desgaste energético y por ende a la pérdida de salud. Por lo anterior, existe una necesidad de mantener los ROS en niveles que sean compatibles con la función celular normal, la solución a este problema son los mecanismos antioxidantes (Sainz et al., 2012).

Los fitobióticos son componentes bioactivos derivados de las plantas, por lo que se les considera amigables con el ambiente. Estos han mostrado efectos positivos en crecimiento y salud animal, al ser utilizados como aditivos alimentarios funcionales (Christaki et al., 2020; Firmino et al., 2021; Suphoronski et al., 2019). Los extractos de plantas aromáticas y aceites esenciales son las principales fuentes de fitobióticos (Elumalai et al., 2020; Reverter et al., 2021). El orégano (*Origanum vulgare*) contiene monoterpenol carvacrol y timol, los cuales han reportado una actividad antioxidante gracias a su habilidad de atrapar radicales libres, inhibiendo los ROS (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015).

El  $\alpha$ -tocoferol es la parte de la vitamina E que muestra la actividad biológica más elevada. Esta trata de un líquido viscoso de color amarillo que no se disuelve en agua, pero se disuelve fácilmente en solventes orgánicos. Ha demostrado ser beneficioso en actividades contra el cáncer, antiinflamatorias y antioxidantes (Jiang et al., 2022).

La mayoría de los compuestos bioactivos derivados de las plantas, son variables en su concentración, además de ser volátiles y se degradan rápidamente durante la digestión, por lo que la dosis de administración tiende a ser variable. En otro caso, las formulaciones convencionales de tocoferol suelen tener dificultades para proporcionar una biodisponibilidad adecuada debido a sus

características hidrofóbicas (Trombino et al., 2022). Factores que provocan que la dosis de administración tienda a ser también variable. Entonces, para aumentar la estabilidad química de los componentes bioactivos para su estudio dentro del metabolismo animal, es necesario desarrollar técnicas de administración controladas, como lo es la nanoencapsulación (Firmino et al., 2021).

La nanotecnología es un campo que ha crecido considerablemente durante los últimos años, estudiando y manipulando la materia de 1-100 nm. Esta tecnología tiene un gran potencial en cuanto a mejorar las propiedades físicas, biológicas y químicas de los materiales. La nanoencapsulación protege las sustancias o moléculas, de manera que los aceites esenciales se mantienen estables (Assadpour & Mahdi Jafari, 2019). Investigaciones previas han reportado actividad antioxidante y antimicrobiana asociadas con el quitosano (Kim, 2018), un polímero que proviene de la deacetilación de la quitina (Pillai et al., 2009). Entre los diferentes biopolímeros, el quitosano es actualmente el más atractivo para la encapsulación de componentes bioactivos como el  $\alpha$ -tocoferol, por sus propiedades únicas como lo son su capacidad para ser compatible con sistemas biológicos, su carácter biodegradable y su baja toxicidad. (Trombino et al., 2022; Yang, 2023).

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la liberación de dos compuestos bioactivos, del aceite de orégano, *Origanum vulgare* y  $\alpha$ -tocoferol, a partir de nanopartículas de quitosano en un entorno lipofílico realista utilizando aceite de hígado de bacalao como matriz. La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo mediante gelación iónica, empleando agentes entrecruzantes como tripolifosfato de sodio, glutaraldehído, su posterior recubrimiento con lisina, para reducir posibles componentes tóxicos (Estrada, 2023). A través de técnicas como la espectroscopía UV-vis y dispersión de luz dinámica (DLS), se caracterizaron las propiedades de

las nanopartículas, incluyendo eficiencia de encapsulación, tamaño de partícula y estabilidad coloidal. Posteriormente, se estudió la cinética de liberación de los compuestos nanoencapsulados en un sistema lipofílico a diferentes tiempos de exposición, y se comparó su actividad antioxidante en formas libre y encapsulada mediante el ensayo de radical ABTS•+. Con esta investigación, se espera aportar evidencia sobre la capacidad de las nanopartículas de quitosano para retener y proteger compuestos antioxidantes en matrices lipofílicas, con potencial aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Nanopartículas de CS/Or**

La nanoencapsulación de los aceites esenciales representa una estrategia válida y eficiente para superar diversos obstáculos. Esta técnica mejora su bioaccesibilidad y biodisponibilidad, protege a los aceites de fenómenos de degradación (como la luz, el oxígeno, la temperatura y el pH), aumenta su solubilidad y estabilidad física, disminuye su volatilidad y enmascara su aroma intenso. A diferencia de las cápsulas de gran tamaño, las nanocápsulas presentan un tamaño subcelular, una mayor superficie por unidad de volumen y un potencial de incrementar la concentración de los aceites esenciales (Weiss et al., 2009).

Granata et al. (2021) sintetizaron nanopartículas de quitosano para encapsular *Origanum vulgare*, que mediante el método de gelación inotrópica, se obtuvo una eficiencia de encapsulación del 83%. Con dichos autores, las nanopartículas presentaron una forma esférica, una distribución bimodal de tamaño de partícula y estabilidad apropiada del > 40 mV, con valores de potencial zeta superiores a 40 mV. El tratamiento de las nanosuspensiones a diferentes temperaturas (4 y 40 °C) y periodos de almacenamiento (7, 15, 21 y 30 días) no afectaron sus parámetros fisicoquímicos, lo

que resaltó su capacidad para actuar como reservorio de aceites esenciales incluso en condiciones estresantes. Además, mostraron una actividad bactericida mejorada contra patógenos presentes en alimentos (*S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*) en comparación con los aceites esenciales puros (Granata et al., 2021). En dicho estudio el objetivo era encapsular el aceite esencial con quitosano para utilizarlas como bactericidas, por lo que sus ensayos fueron enfocados en ello y se demostró su potencial actividad bactericida.

## **2.2 Nanopartículas de CS/ $\alpha$ Toc**

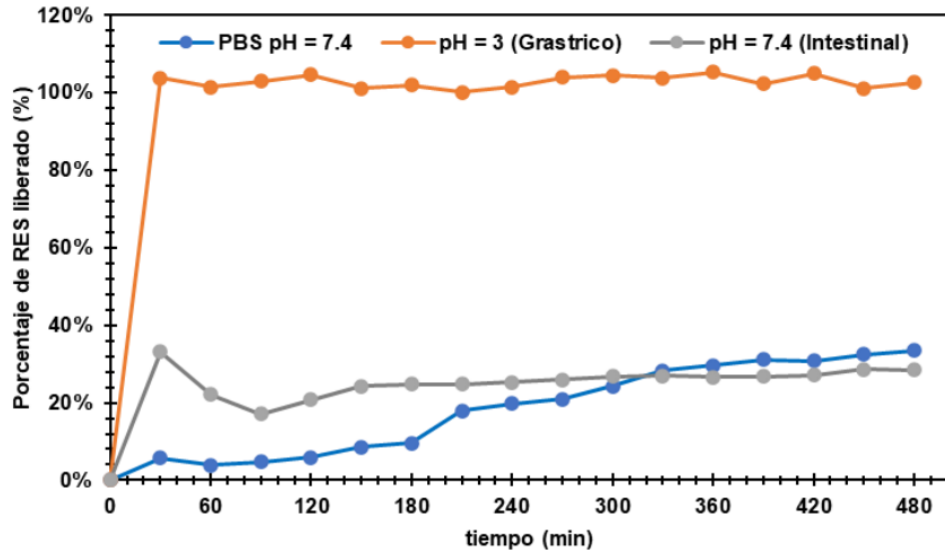
El  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -Toc) es susceptible a descomposición debido a su sensibilidad al oxígeno, la luz, iones metálicos y otros factores del entorno. Además, su falta de solubilidad en agua limita su aplicabilidad práctica (Aresta et al., 2013). Con los avances en nanotecnología, la fabricación de películas activas de liberación prolongada basadas en nanopartículas ha ganado atención a nivel mundial (Niculae et al., 2014). Zambrano-Zaragoza et al. (2014), demostraron que las nanopartículas de CS/ $\alpha$ -Toc pueden mejorar e inducir la estabilidad y eficiencia del  $\alpha$ -toc. Además, se demostró que las nanocápsulas son el sistema más eficaz, seguido de cerca por las nanoesferas.

La vitamina E, en forma de  $\alpha$ -tocoferol, ha sido extensamente encapsulada y preparada en diversas presentaciones, como nanoemulsiones, liposomas y nanopartículas. Se ha observado que la encapsulación de la vitamina E mejora su estabilidad fisicoquímica durante el almacenamiento, además de potenciar su actividad biológica después de ser consumida (Aboudzadeh et al., 2018). Además, diversas investigaciones indican que la capacidad de absorción de la vitamina E puede incrementarse al ser entregada mediante formulaciones coloidales en lugar de en su forma convencional libre (Aresta et al., 2014).

### **2.3 Liberación a partir de nanopartículas de quitosano**

Cervantes-Millán (2022) investigó el ingreso de nanopartículas de quitosano en el hepatopáncreas de *L. vannamei*, junto con el efecto antioxidante de nanopartículas de quitosano, las estaban cargadas con  $\alpha$ -tocoferol. Mismas que fueron evaluadas durante el estrés oxidativo agudo con temperatura el cual fue expuesto a camarones, en donde se evaluó a varias concentraciones vs el  $\alpha$ -tocoferol en su forma libre. De este estudio concluyeron que las nanopartículas cargadas con  $\alpha$ -tocoferol protegen a los camarones del estrés oxidativo al ser expuestos a un estrés agudo (Cervantes Millán et al., 2022).

Posteriormente, Molina-Estrada (2023) realizó un trabajo donde se comparó el efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas de quitosano cargadas con resveratrol (RES) para su estudio en la viabilidad de preadipocitos 3T3-L1 cultivados en monocapa (2D) y esferoides (3D). El método de síntesis fue también gelación iónica, utilizando TPP y glutaraldehído como entrecruzantes, con quitosano en pH 4.5. Para evaluar la liberación de RES en condiciones fisiológicas, se colocaron las NPs en un fluido gástrico y en un fluido intestinal simulados. Las cinéticas de liberación en ambos fluidos se presentan en la Figura 19. Las NPs en PBS y en fluido intestinal simulado mostraron comportamientos similares, alcanzando una liberación máxima de RES del 33 y 29%, respectivamente, durante 480 minutos. En contraste, la liberación máxima de RES en fluido gástrico simulado se obtuvo en los primeros 30 minutos y se mantuvo constante durante el resto del experimento (Molina-Estrada, 2023).

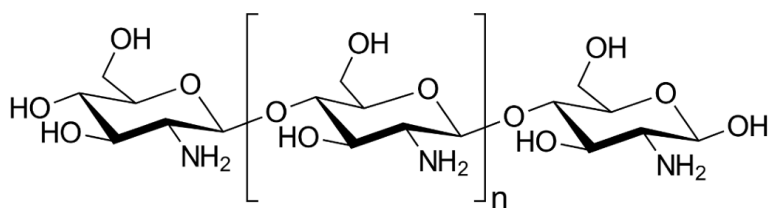


**Figura 1.** Cinéticas de liberación de resveratrol en fluidos simulados. NPs-QRL evaluadas frente a PBS (línea azul), fluido gástrico (línea naranja) e intestinal simulado (línea gris). Tomado de Molina-Estrada, 2023.

### 3. Marco teórico

#### 3.1 Quitosano

El quitosano (CS) es un polisacárido lineal que se obtiene al desacetilar la quitina, y corresponde al segundo compuesto más común en la naturaleza después de la celulosa. Consiste en un copolímero catiónico de  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) que conecta 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -d-glucopiranososa y 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -d-glucopiranososa (Figura 1) (Shariatinia, 2019). Conforme a la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). Se clasifica como un material seguro (GRAS por sus siglas en inglés, *Generally Recognized As Safe*), lo que ha llevado a su extenso uso en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas (Ma et al., 2017).

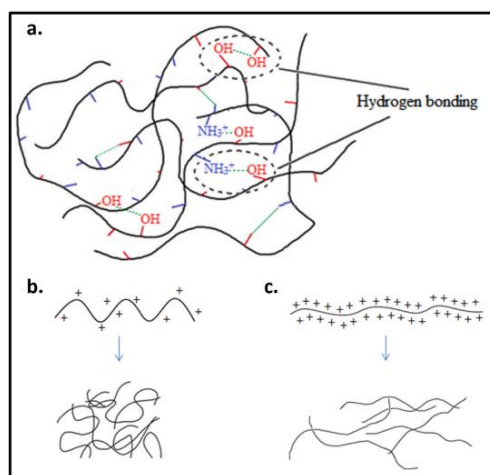


**Figura 2.** Estructura química del quitosano. Tomado de (Hernández et al., 2022).

Tiene propiedades destacadas como biocompatibilidad, biodegradabilidad, insoluble a pHs alcalinos, no toxicidad, alta biodisponibilidad, simplicidad de modificación, permeabilidad selectiva favorable al agua, destacada resistencia química, capacidad para formar películas, geles, nanopartículas, micropartículas y cuentas, así como afinidad por metales, proteínas y colorantes. En la actualidad, el quitosano y sus derivados se investigan extensamente en numerosas aplicaciones farmacéuticas y médicas, que incluyen la entrega de fármacos/genes, apósitos para heridas, implantes, lentes de contacto, ingeniería de tejidos y encapsulación celular (Shariatinia, 2019).

En un medio ácido, el quitosano adquiere una carga positiva y se vuelve soluble debido a la protonación de los grupos amino de la glucosamina. Debido a la naturaleza polielectrolítica del quitosano, su densidad de carga en la superficie es elevada. Esto conlleva a la formación de extensos enlaces de hidrógeno, tanto intermoleculares como intramoleculares, a través de sus grupos amino e hidroxilo, lo que origina soluciones viscosas (Figura 2a). Además, su viscosidad está condicionada por su dependencia de la carga en la superficie, la cual a su vez está vinculada a su grado de desacetilación. Un alto grado de desacetilación, al aumentar el número de grupos amino, intensifica la formación de enlaces de hidrógeno, incrementando así la viscosidad.

Asimismo, un alto grado de desacetilación eleva la densidad de carga en las moléculas de quitosano, generando fuerzas repulsivas intramoleculares robustas que aumentan la rigidez y expansión molecular de las cadenas poliméricas individuales, y, por ende, aumentan la viscosidad (Figura 2b y c) (Wani et al., 2021).



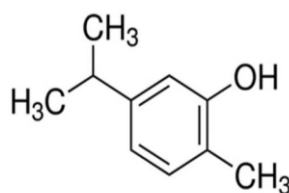
**Figura 3.** Carga de superficie del quitosano de acuerdo con el pH del medio. Tomado de (Wani et al., 2021).

La formación de nanopartículas de quitosano (CS-NPs) se realiza a través de la técnica de gelación ionotrópica, un proceso simple y suave. En este método, los grupos amino protonados del quitosano se enlazan mediante vínculos inter e intramoleculares con polianiones multivalentes. El tripolifosfato de sodio (TPP) es un polianión ampliamente utilizado por su ausencia de toxicidad y su capacidad para formar geles con propiedades deseables (Antoniou et al., 2015; de Moura et al., 2009).

### 3.2 Carvacrol

El carvacrol ha sido ampliamente reconocido como uno de los componentes más estudiados del aceite esencial de orégano. Este es un monoterpeno fenólico producido por diversas hierbas, siendo las más conocidas *Origanum vulgare* (orégano griego, mejorana silvestre), *Origanum majorana*

(mejorana), *Satureja hortensis* (ajedrea de verano), *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Satureja montana* (ajedrea de invierno), entre otros. Los compuestos fenólicos y los terpenos son un grupo de sustancias bioactivas volátiles de origen vegetal, con valor medicinal y biotecnológico, que conforman la mayor parte de los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas (Christaki et al., 2020; Firmino et al., 2021). Se ha probado que el carvacrol tiene propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antibacterianas. Además, posee otras propiedades biológicas, como efectos antidiabéticos, antifúngicos, antitumorales, antimutagénicos, analgésicos, antihepatotóxicos, cardioprotectores y antiparasitarios (Chroho et al., 2024; Cicalău et al., 2021).

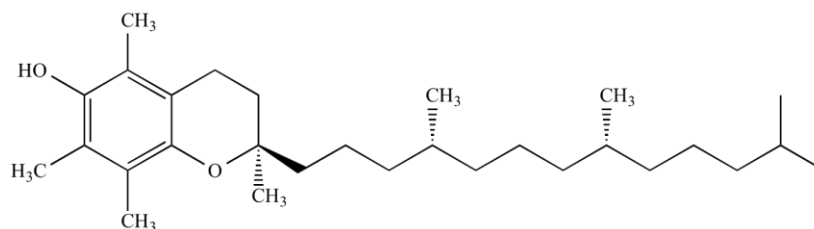


**Figura 4.** Estructura química del carvacrol (Chroho et al., 2024).

La destacada actividad antioxidante reportada del carvacrol se debe a su capacidad para neutralizar radicales libres, inhibiendo especies reactivas de oxígeno (ROS) generados en células y tejidos. En contraste, concentraciones elevadas pueden mostrar efectos prooxidantes opuestos (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015).

### 3.3 $\alpha$ -tocoferol

El  $\alpha$ -tocoferol (Figura 3) es la parte de la vitamina E que muestra la actividad biológica más elevada. Se caracteriza por ser un líquido viscoso de color amarillo que no se disuelve en agua, pero se disuelve fácilmente en solventes orgánicos (hidrófobo). Se ha comprobado su eficacia en actividades contra el cáncer, antiinflamatorias y antioxidantes. T-Ch NPs (Yanat & Schroën, 2021).



**Figura 5.** Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol. Tomado de (Marin, 2022).

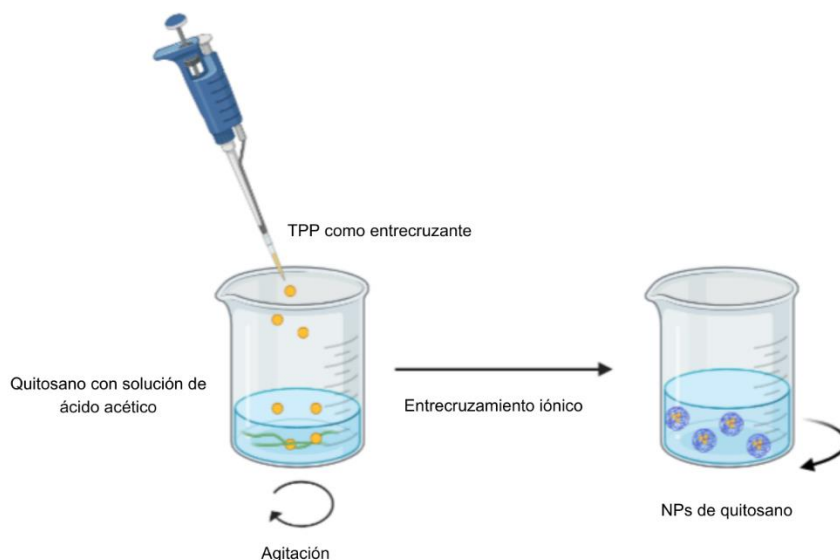
Se considera al  $\alpha$ -tocoferol el antioxidante soluble en aceite más crucial, resguarda las membranas de la oxidación al interactuar con los radicales de lípidos generados en la cadena de reacción de peroxidación de lípidos. Esta acción elimina los intermediarios de radicales libres y detiene las reacciones de propagación, dando lugar a radicales  $\alpha$ -tocoferoxilo oxidados que pueden ser activados adicionalmente mediante la reducción por otros antioxidantes, como el ascorbato, el retinol o la ubiquinol (Komaiko & McClements, 2016; Raederstorff et al., 2015; Traber & Atkinson, 2007; Wang & Quinn, 1999). De manera análoga, el  $\alpha$ -tocoferol protege las membranas biológicas al dirigirse de manera preferente a las especies reactivas de nitrógeno prooxidantes (Bailey, 2016) resultando en un ahorro energético al no haber necesidad de expresar las enzimas antioxidantes endógenas. El  $\alpha$ -tocoferol, conocido por su papel como antioxidante natural, se emplea extensamente en la industria alimentaria para poner fin a las reacciones en cadena de radicales que suceden durante el proceso de oxidación de los triglicéridos, sobre todo durante la elaboración de alimentos, su almacenamiento y exposición a través del tracto digestivo.

En el caso de especies de peces cultivadas, la carencia de niveles adecuados de  $\alpha$ -tocoferol es en la alimentación puede resultar en un deficiente rendimiento de crecimiento o en enfermedades nutricionales. La cantidad de  $\alpha$ -tocoferol requerida como suplemento en la dieta depende de diversos factores, como la mezcla de vitaminas, el nivel y origen de los lípidos, el método de

preparación de la dieta y las condiciones de almacenamiento del alimento, entre otros. La presencia de otros ingredientes en la dieta también puede ser de gran importancia; se ha propuesto que el  $\alpha$ -tocoferol podría actuar como un sinergista prooxidante a concentraciones más elevadas cuando hay prooxidantes como metales de transición (Afonso et al., 2016).

### 3.4 Gelación iónica

En 1997, Calvo et al. publicaron la metodología para sintetizar nanopartículas de quitosano a través de gelación iónica (iontrópica). En su trabajo, bajo condiciones de agitación, la solución de TPP se añade al CS y/o al copolímero de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno, lo que resulta en la formación de partículas de CS-NP con un tamaño que varía entre 200 y 1000 nm y un potencial zeta de 20 a 60 mV, dependiendo de la relación de masa CS/TPP o del peso molecular del quitosano (Calvo et al., 1997).



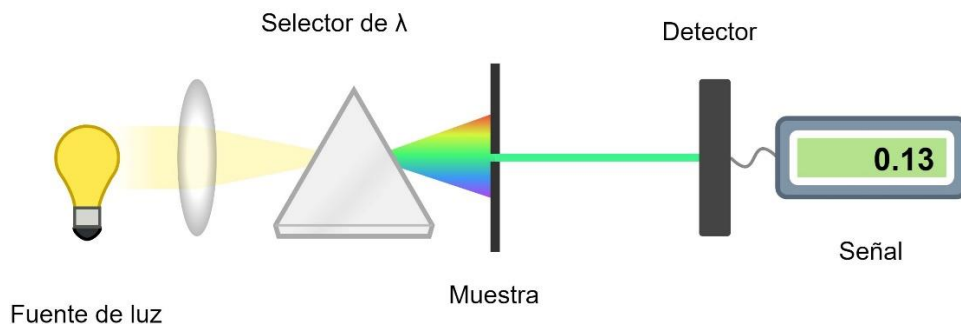
**Figura 6.** Representación gráfica de el método de síntesis de gelación iónica.

La gelación ionotrópica es una de las rutas más estudiadas para sistemas de nanotransportadores debido a sus condiciones de preparación suave y procedimiento simple. Este método se basa en el uso de polielectrolitos (como quitosano, alginato, ácido hialurónico y carragenina, entre otros) que se entrecruzan en presencia de contraiones. En el entrecruzamiento iónico, se forma una red mediante puentes iónicos entre cadenas macromoleculares. El agente de entrecruzamiento suele ser una entidad iónica cargada con un peso molecular bien definido. Esta técnica se emplea frecuentemente para la preparación de nanopartículas, biofilms o hidrogeles. La estrategia de preparación de nanopartículas implica la disolución previa del biopolímero en un medio acuoso diluido para favorecer la dispersión de los polielectrolitos. Posteriormente, se añade el entrecruzante iónico cargado a la solución polimérica para formar las partículas (Fernández-Quiroz et al., 2023).

### **3.5 Espectroscopía UV-vis**

La espectroscopía UV-Vis es una prueba no destructiva (NDT, por sus siglas en inglés), este tipo de pruebas son métodos de evaluación empleados en la industria para examinar las características de un material, componente, estructura o sistema, identificando posibles defectos o variaciones, sin perjudicar el estado de la matriz original. Tal como su nombre sugiere, la espectroscopía UV-Vis mide las propiedades de las muestras en los rangos de longitud de onda UV-Vis (generalmente entre 190 y 900/1100 nm) sin dañar el material. En concreto, esta técnica de espectroscopía determina la cantidad de luz de una longitud de onda específica que atraviesa una muestra y la cantidad que es absorbida. Esta información puede revelar la identidad molecular, la concentración, la estructura o la actividad, tanto de compuestos orgánicos como porfirinas,

bencenos y naftalenos, como de biomoléculas tales como ácidos nucleicos y proteínas (Khalid et al., 2024).



**Figura 7.** Esquema de un espectrofotómetro utilizado para medir la absorbancia de una muestra.

En esta técnica, el monocromador separa la luz en una banda estrecha de longitudes de onda, la cual pasa a través de la muestra. Después de que la luz ha pasado a través de la muestra, se utiliza un detector para convertir la luz en una señal electrónica legible (Diffey, 2002). La Ley de Beer–Lambert se puede utilizar específicamente para determinar la concentración de una muestra si se cuenta con una relación lineal entre soluciones estándar que contengan la misma sustancia (Picollo et al., 2019; Sharpe, 1984).

### 3.6 Dispersión de la Luz Dinámica (DLS)

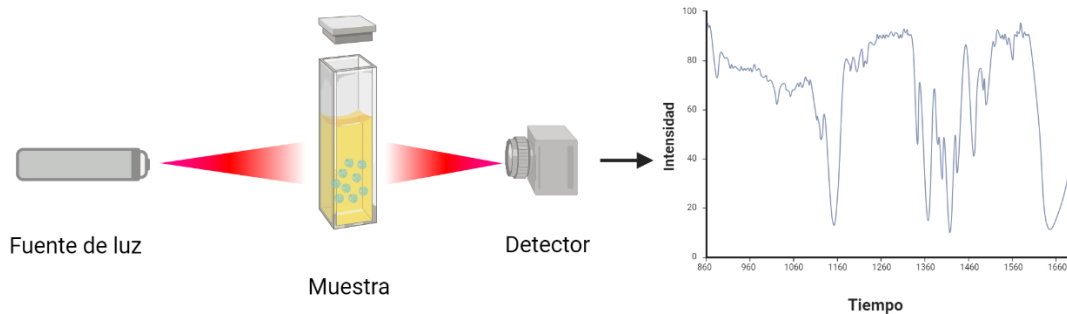
DLS es una técnica establecida para medir el tamaño promedio y la distribución del tamaño de partículas en una suspensión. Esta se basa en la intensidad de la luz dispersada por una muestra o solución para detectar el tamaño de una partícula (Ross Hallett, 1999). La técnica tiene las ventajas de ser relativamente rápida, no invasiva y requerir una preparación mínima de la muestra.

DLS mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas. El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de partículas debido al bombardeo de las moléculas del solvente que las rodean. La firma temporal de las fluctuaciones se utiliza para generar la función de correlación, a partir de la cual se determina el coeficiente de difusión traslacional ( $D$ ). Luego, el tamaño de las partículas ( $R$ ) se calcula utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Ec. 1

Donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $\eta$  es la viscosidad del fluido y  $R$  es el radio hidrodinámico de la partícula. Normalmente, DLS se utiliza para medir partículas suspendidas en un líquido. Cuanto más grande es la partícula, más lento será el movimiento browniano. Las partículas más pequeñas son empujadas con mayor fuerza por las moléculas del solvente y se mueven más rápidamente.



**Figura 8.** Esquema del funcionamiento de la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

La Figura 8 muestra un esquema básico del proceso de Dispersión Dinámica de Luz. En un sistema de DLS, se utiliza un láser (indicado por la "Fuente de luz") que emite un haz de luz dirigido hacia la muestra. El láser interactúa con las partículas en suspensión, causando dispersión de la luz. Las partículas presentes en la muestra dispersan la luz del láser en diferentes direcciones. La muestra se encuentra en una celda de cuarzo que permite el paso del láser y la dispersión de la luz. Un detector colocado en un ángulo fijo recoge la luz dispersada. El detector registra las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada, estas fluctuaciones se deben a los movimientos aleatorios de las partículas en suspensión. Estos cambios en la intensidad de la señal a lo largo del tiempo se utilizan para determinar la función de correlación, a partir de la cual se calcula el coeficiente de difusión de las partículas.

El potencial zeta se analiza aplicando un campo eléctrico a la suspensión y midiendo la velocidad y la dirección del movimiento de las partículas. El resultado principal de una medición de potencial zeta es la movilidad electroforética  $\mu$  que luego se utiliza para calcular el potencial zeta mediante la ecuación:

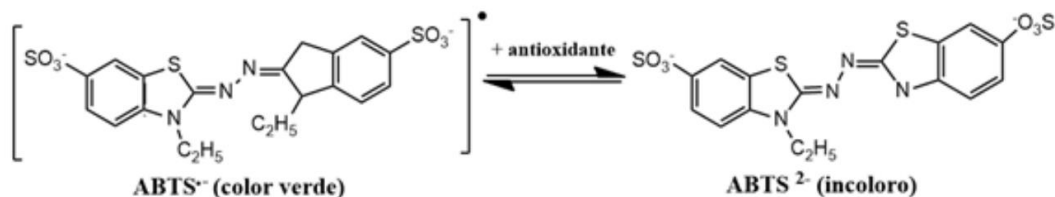
$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\epsilon}$$

Ec. 2

Donde  $\zeta$  es el potencial zeta,  $\mu$  es la movilidad electroforética,  $\eta$  es la viscosidad del medio y  $\epsilon$  es la permitividad dieléctrica del medio. Esta relación permite determinar el potencial zeta, un indicador clave de la estabilidad coloidal en suspensiones.

### 3.7 Ensayo de actividad antioxidante con ABTS

El ensayo ABTS se considera una de las técnicas más sensibles para identificar la actividad antioxidante debido a que los antioxidantes responden con una cinética de reacción más rápida (Chanput et al., 2016). Este método, inicialmente reportado por Miller y colaboradores, se basa en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el catión radical coloreado ABTS, previamente formado mediante la oxidación de ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) por metemoglobina y peróxido de hidrógeno (Chanput et al., 2016; Londoño-Londoño, 2012). La técnica modificada para generar el catión radical ABTS<sup>•+</sup> implica la producción directa del cromóforo verdeazulado de ABTS<sup>•+</sup> a través de la reacción entre ABTS y persulfato de potasio. Este cromóforo presenta tres máximos de absorción a longitudes de onda de 645, 734 y 815 nm. La adición de antioxidantes a este radical previamente generado sigue un mecanismo de transferencia de electrones, visualizado como una decoloración cuando el radical ABTS es reducido por el antioxidante (Chanput et al., 2016; Griffiths, 2016). De esta manera, el grado de decoloración permite evaluar el porcentaje de inhibición del catión radical ABTS<sup>•+</sup>, el cual se determina en función de la concentración del antioxidante y el tiempo de reacción (Almeida et al., 2011)). Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox o TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox).



**Figura 9.** Representación del cambio de color en el ensayo ABTS: el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> (verde) es reducido a ABTS<sup>2-</sup> (incoloro) en presencia de un antioxidante Tomado de (Schaich et al., 2015) .

Dada la solubilidad del radical ABTS<sup>•+</sup> en disolventes acuosos y orgánicos, este ensayo de decoloración permite medir la capacidad antioxidante total tanto en sustancias lipofílicas como hidrofílicas. Al determinar la actividad antioxidante, es importante considerar tanto la concentración del antioxidante como el tiempo necesario para inhibir la absorción del catión radical (Bessada et al., 2015).

## **4. Hipótesis**

Es posible liberar  $\alpha$ -tocoferol de las nanocápsulas de quitosano sintetizadas por gelación iónica.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo General**

Evaluar la eficiencia de liberación del  $\alpha$ -tocoferol nanoencapsulado con quitosano sintetizadas mediante el método de gelación iónica, en diferentes soluciones y tiempos.

#### **5.1.1 Objetivos específicos**

1. Determinar la eficiencia de encapsulamiento del  $\alpha$ -tocoferol y *Origanum vulgare* en nanocápsulas de quitosano mediante espectroscopía de fluorescencia.
2. Evaluar la cinética de liberación del  $\alpha$ -tocoferol y *Origanum vulgare* desde las nanocápsulas en función de las variaciones de pH y el tiempo, utilizando espectrometría de fluorescencia.

## 6. Metodología

### 6.1 Soluciones

Para preparar la solución de quitosano, primero se mezclaron 98 mL de agua destilada con 2 mL de ácido acético, obteniendo 100 mL de ácido acético al 2% [v/v]. Posteriormente, se pesaron 0.25 gramos de quitosano para preparar una solución al 0.25% [w/v]. Esta solución de quitosano se añadió al ácido acético y se dejó en agitación durante 24 horas. Después de este periodo, se filtró la solución, utilizando primero un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  y luego uno de 0.22  $\mu\text{m}$ , empleando una bomba de succión para facilitar el proceso. Una vez completada la filtración, se ajustó el pH de la solución a 4.5. Finalmente, la solución se almacenó a una temperatura de 4°C para su conservación.

Para la preparación del  $\alpha$ -tocoferol, se realizó una dilución 1:1 mezclando 1 mL de  $\alpha$ -tocoferol con 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obteniendo una solución homogénea. Posteriormente, se tomó 1 mL de esta mezcla y se diluyó en una proporción 1:10 con agua desionizada.

En cuanto al aceite de orégano, se preparó una emulsión homogénea en una proporción 1:1, utilizando 500  $\mu\text{L}$  de Tween 20 y 500  $\mu\text{L}$  de aceite. A continuación, se añadió 1 mL de agua desionizada a la emulsión, obteniendo una dilución final de 1:4 para el aceite de orégano.

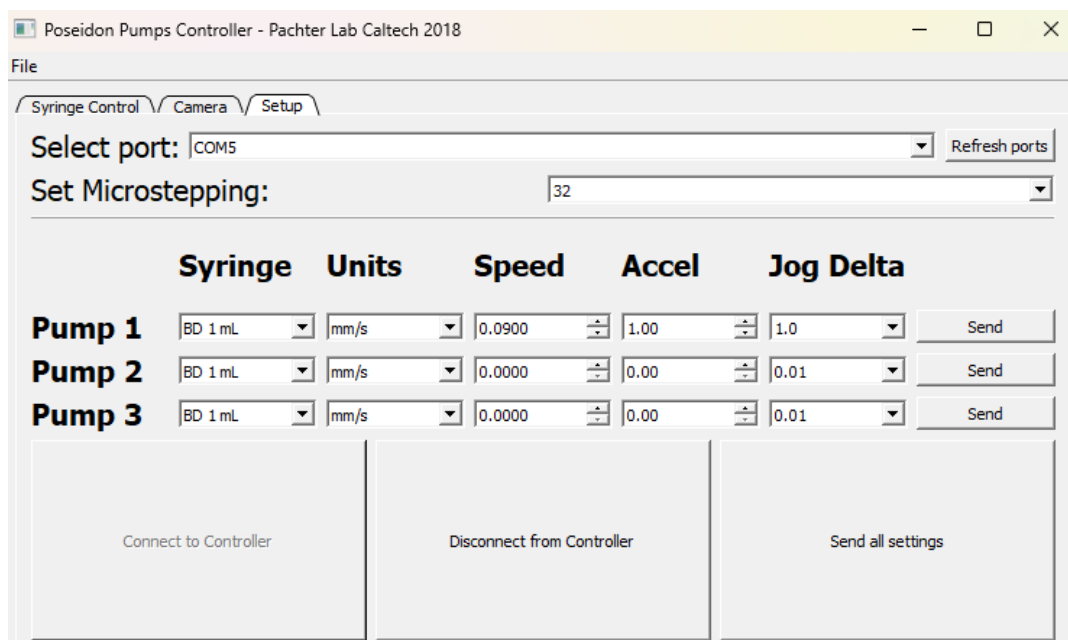
Por otro lado, la solución de tripolifosfato de sodio (TPP) se preparó justo antes de la síntesis. Para ello, se disolvieron 10 mg de TPP en 40 mL de agua desionizada, alcanzando una concentración de 0.025% [w/v]. Finalmente, la solución de lisina se obtuvo disolviendo 0.7306 g de lisina en agua desionizada, hasta lograr una concentración de 0.4 M.

## 6.2 Configuración del sistema Poseidón

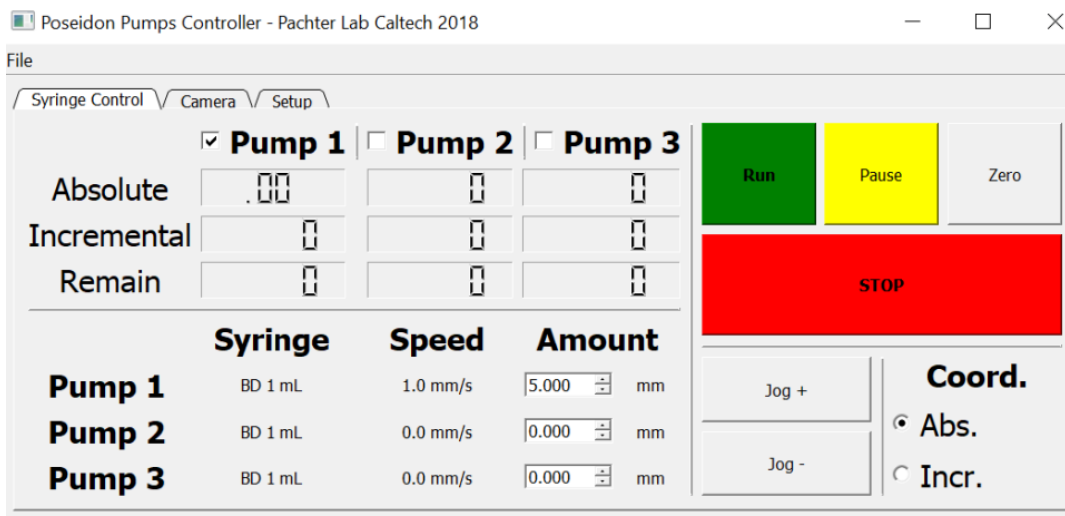
Se utiliza el software Poseidón para controlar el inyector que regula la velocidad del goteo de las soluciones que se requieren para la síntesis de las nanopartículas de quitosano.

**Tabla 1.** Parámetros para la configuración del sistema Poseidón durante la síntesis de las nanopartículas de quitosano por gelación iónica.

Syringe	Units	Speed	Accel	Jog Delta	Amount
1 mL	mm/s	0.0900	1.00	1.0	+20 subir
3 mL					-20 bajar



**Figura 10.** Configuración de los parámetros sistema Poseidón en el ordenador.



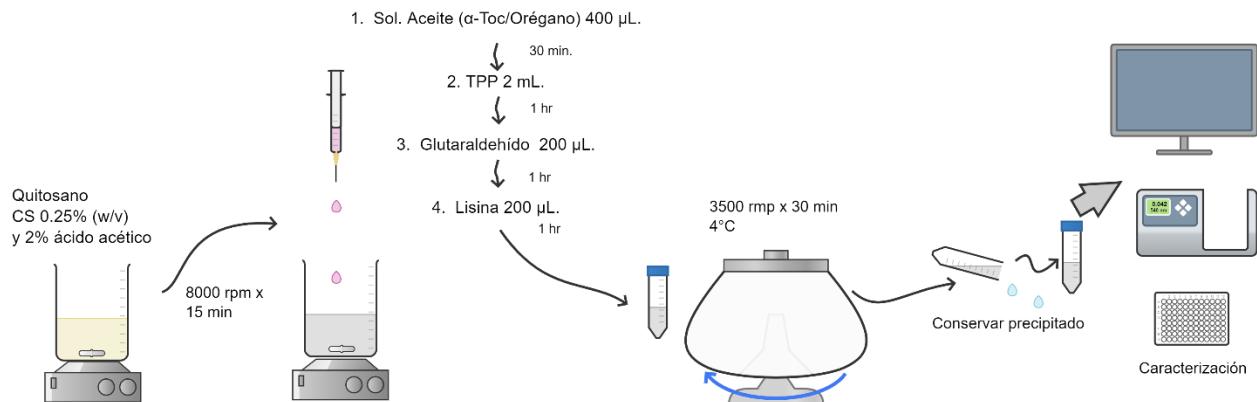
**Figura 11.** Control del sistema Poseidón.



**Figura 12.** Modelo en tercera dimensión del sistema Poseidón tomado de Boeshaghi et al., 2019

### 6.3 Síntesis de NPs

Para la preparación de la muestra, se comenzó agitando 10 mL de solución de quitosano a 800 rpm durante 15 minutos. Luego, con una jeringa de insulina, se extrajeron 400  $\mu\text{L}$  (equivalentes a 40 unidades) de una solución de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -Toc), los cuales se añadieron gradualmente al sistema de goteo. La mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos. A continuación, se extrajeron 2 mL de solución de tripolifosfato de sodio (TPP) con una jeringa de 3 mL, y se incorporó al sistema de goteo, manteniendo la agitación durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído (equivalentes a 20 unidades) utilizando nuevamente una jeringa de insulina, y se dejó agitar la solución durante 1 hora. Seguidamente, se incorporaron 200  $\mu\text{L}$  de lisina al sistema de goteo, continuando la agitación por otra hora. Finalmente, la solución resultante se centrifugó a 3,500 rpm durante 30 minutos a 4°C, descartándose el precipitado. Se sintetizaron 4 lotes distintos bajo este mismo procedimiento y con el mismo volumen. Por otro lado, para sintetizar las nanopartículas de Cs/Or se sintetizó un lote con el mismo método y soluciones, pero en lugar de  $\alpha$ -tocoferol se agregó aceite esencial de orégano. Además, el volumen que se sintetizó para el lote de Cs/Or fue de 4 veces el de Cs/Toc.



**Figura 13.** Esquema del proceso de síntesis de nanopartículas de quitosano por gelación iónica.

## **6.4 Caracterización**

### **6.4.1 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)**

El diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las nanopartículas se midió utilizando el equipo Zetasizer Nano Ns modelo DTS 1060 de Malvern Instruments. La técnica que se utilizó fue DLS. Para medir el diámetro hidrodinámico se utilizó la celda DTS1060D, donde se colocaron 700  $\mu\text{L}$  de la muestra directamente. En caso del potencial zeta, se cambió la celda a DTS1070, donde también se colocaron 700  $\mu\text{L}$  de muestra.

### **6.4.2 Eficiencia de encapsulación**

Para construir la curva de calibración se preparó una solución stock con una concentración de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de aceite de orégano en metanol. Después, se diluyó la solución stock a concentraciones de 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$  en metanol. Se midió la absorbancia de las distintas diluciones en un rango de 250-350 nm para identificar el pico de absorbancia del carvacrol, el cual se encontró a los 281 nm como se esperaba de acuerdo con la literatura. Se tomaron los valores de la absorbancia a los 281 nm de cada muestra para construir la curva de calibración y obtener la regresión lineal.

Para cuantificar el carvacrol encapsulado, se tomó 1 mL de nanopartículas del lote A, al cual se le agregó 1 gota de ácido clorhídrico y 1 mL de n-hexano de grado reactivo, se le dio vortex a la solución y se dejó por 5 min. Para un segundo lavado, a la misma solución se le agregó 1 mL de hexano y se agitó con vortex. Después de 5 min se recuperó la capa transparente (solvente con aceite) en un vial. Se secó el solvente con nitrógeno y se resuspendió la muestra con en 1 mL de metanol. Se llevó la muestra a medir absorbancia con microplaca, a una longitud de onda de 281 nm.

Se preparó una solución stock con una concentración de 5 mg/mL de  $\alpha$ -tocoferol en metanol. Para medir la absorbancia en el rango del UV-Vis, se diluyó la solución stock a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 75  $\mu$ g/mL en metanol. Para la medición de la absorbancia, se utilizó el espectrofotómetro VarioSkan Lux, empleando la placa de 96 pocillos Brand F. En cada pocillo se colocaron 300  $\mu$ L de muestra, por triplicado. Se utilizó metanol como blanco. Se obtuvo el espectro en el rango de 250-350 nm, registrándose la máxima absorbancia a 290 nm en todas las muestras. A partir de estos datos, se tomó el valor de la absorbancia a 290 nm para construir la curva de calibración y se realizó la regresión lineal correspondiente.

Con el objetivo de evaluar la eficacia del método para medir la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en nanopartículas de quitosano, se analizaron distintos lotes de NPs. Se tomaron 500  $\mu$ L de cada muestra y se agregó una gota de ácido clorhídrico para romper las nanocápsulas. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 500  $\mu$ L de diclorometano durante 5 minutos cada uno. Finalmente, se recuperó la capa del solvente con el aceite (transparente) y se secó con nitrógeno, resuspendiéndola en 1 mL de metanol para medir la absorbancia a 290 nm. La Ec. 3 muestra la fórmula que se utilizó para obtener el valor de eficiencia de encapsulación.

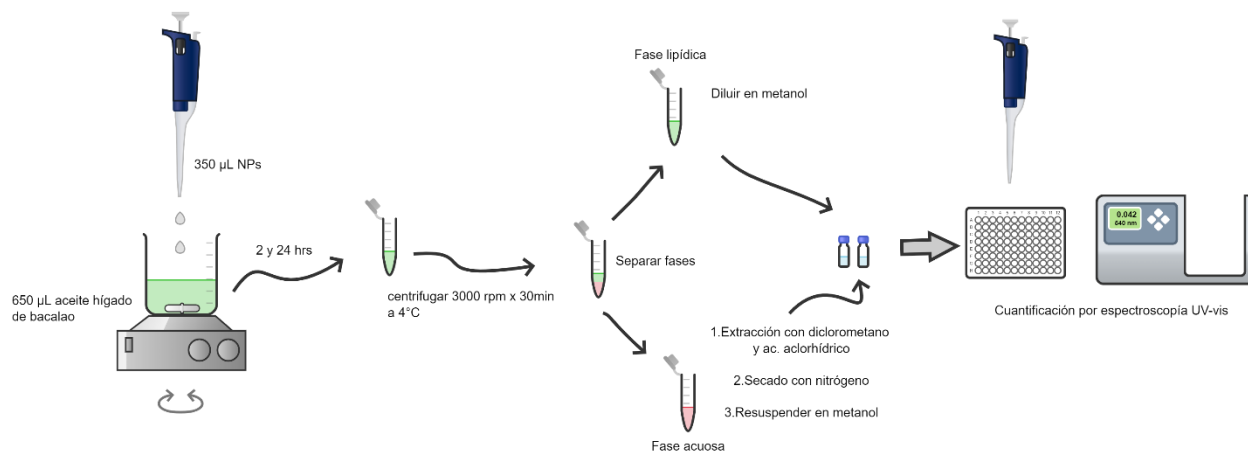
$$EE(\%) = \frac{\text{Cantidad total de sustancia utilizada}}{\text{Cantidad de sustancia encapsulada}} \times 100$$

Ec. 3

### **6.5 Mediciones de liberación**

Con el objetivo de simular un entorno de liberación realista, se utilizó aceite de hígado de bacalao como matriz lipofílica. Se colocaron 650  $\mu$ L de aceite de hígado de bacalao y 350  $\mu$ L de NPs bajo agitación por 2 y 24 hrs. Después se centrifugó la solución a 3000 rpm por 30 minutos, con el fin

de separar las fases. El producto se recuperó y se separaron las fases (polar y no polar), considerando que el aceite liberado se encontraría en la fase no polar y el quitosano en la fase polar. Se cuantificó el  $\alpha$ -Toc y carvacrol contenido en el aceite de bacalao, a través de espectroscopía UV-vis, midiendo la absorbancia a los 290 nm. Los cálculos se realizaron de acuerdo con la curva de calibración elaborada previamente, utilizando aceite de bacalao como solvente. Con el fin de conocer la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol y carvacrol no liberada, se tomó la fase acuosa y se realizó una extracción con ácido clorhídrico y diclorometano, con el mismo procedimiento que se implementó para medir la eficiencia de encapsulación.



**Figura 14.** Esquema del experimento que se realizó para evaluar la cinética de liberación de aceite de orégano y  $\alpha$ -tocoferol a partir de las nanopartículas de quitosano, en aceite de hígado de bacalao.

## 6.6 Ensayo de actividad antioxidante

La solución ABTS $\bullet$ + fue preparada con 0.0038 g de ABTS y 1 mL de persulfato de potasio a 0.066 g/mL. Se dejó la solución durante 16 hrs para que hubiera una reacción de oxidación del ABTS.

Para construir la curva de calibración de actividad antioxidante de Trolox y BHT, se realizaron diluciones a diferentes concentraciones en buffer PBS pH 7.4. Las concentraciones fueron 5, 10, 20, 40 y 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para cada antioxidante. Se colocaron 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  en el pocillo de una microplaca Brand F. Después se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de Trolox 10 mM y se dejó en la oscuridad durante 5 minutos para después medir absorbancia en el UV -vis con el espectrofotómetro VarioSkan Lux. Se realizó el procedimiento por triplicado para cada concentración de Trolox y BHT.

Con el propósito de comparar la capacidad antioxidante entre cada aceite y su correspondiente nanoencapsulado con quitosano, se hicieron diluciones de cada aceite en metanol, conteniendo la misma concentración de aceite que las nanopartículas resultantes. Por lo tanto, las concentraciones fueron 7,550  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el aceite de orégano y 298  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el  $\alpha$ -tocoferol. Al igual que para las curvas de calibración, se colocaron 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  y 5  $\mu\text{L}$  de muestra por pocillo de la microplaca. El experimento se realizó por triplicado para cada muestra. Se dejó la reacción por 5 minutos y después se llevó al espectrofotómetro, manteniendo siempre la reacción en la oscuridad.

## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Dispersión de la Luz Dinámica

Por medio de la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS), se obtuvieron los tamaños y la estabilidad de los distintos lotes de nanopartículas sintetizadas. En el caso del aceite de orégano se obtuvo un diámetro hidrodinámico de 94 nm y un potencial Z de 20.4 mV. Para el  $\alpha$ -tocoferol se consideraron tres lotes sintetizados por el mismo método:  $\alpha$ -Toc 1,  $\alpha$ -Toc 2 y  $\alpha$ -Toc 3, cuyos diámetros hidrodinámicos fueron 197, 157 y 145 nm, respectivamente. Los valores de potencial Z correspondientes fueron 19.9, 18 y 15.1 mV.

**Tabla 2.** Resultados de DLS para los cuatro diferentes lotes de nanopartículas sintetizados.

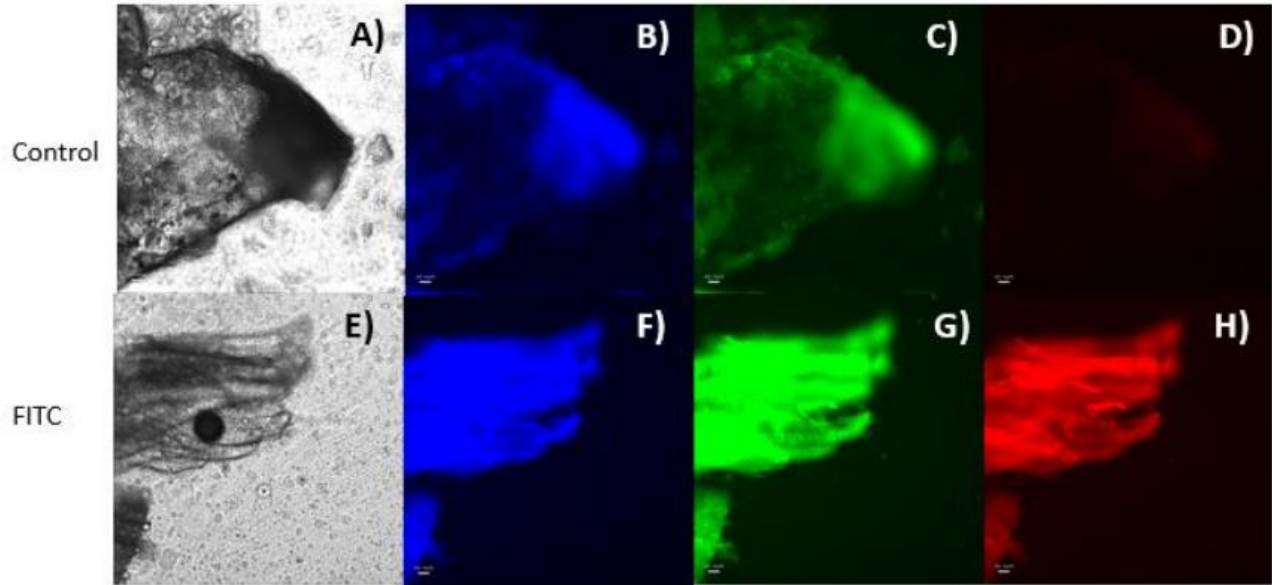
Lote	Tamaño nm	Potencial Z mV
$\alpha$ -Toc 1	197.3	19.9
$\alpha$ -Toc 2	157	18
$\alpha$ -Toc 3	145	15.1
Orégano	94.6	20.4

El tamaño de las nanopartículas de los cuatro lotes se encontró dentro del rango adecuado para esta prueba. Estudios previos han demostrado que nanopartículas de hasta 500 nm pueden penetrar en el tejido. No obstante, es importante destacar que el tamaño ideal siempre dependerá de la

aplicación específica del material. La relación entre tamaño, concentración y estabilidad debe ser cuidadosamente equilibrada, ya que, por ejemplo, nanopartículas muy pequeñas podrían tener un menor contenido de componente bioactivo, lo que reduciría su actividad. Por otro lado, nanopartículas de mayor tamaño podrían no alcanzar el sitio objetivo de manera eficiente. Por ello, las características óptimas varían según el propósito del sistema.

De acuerdo con los valores de potencial Z obtenidos para los cuatro lotes, todos ellos tuvieron una estabilidad moderada, ya que se encuentran dentro del rango de los 15-30 mV. Esto sugiere que la suspensión tiene cierta estabilidad, pero podría estar en riesgo de agregación con el tiempo, especialmente si hay cambios en las condiciones del medio (como el pH o la fuerza iónica). Aunque no es un valor que asegure una estabilidad completa, tampoco indica inestabilidad inmediata. Por otro lado, considerando la aplicación del presente objeto de estudio, el valor de potencial Z podría ser suficiente, especialmente si se requiere una liberación controlada de componentes bioactivos.

Para la continuación con las pruebas de liberación, se seleccionó el lote identificado como  $\alpha$ -Toc 2 (referido en adelante como  $\alpha$ -Toc), debido a que presenta la mejor combinación de características: tamaño, concentración de  $\alpha$ -tocoferol y potencial Z, siendo los óptimos obtenidos en este estudio. Para las pruebas con *Origanum vulgare*, se utilizó el único lote reportado en esta sección.



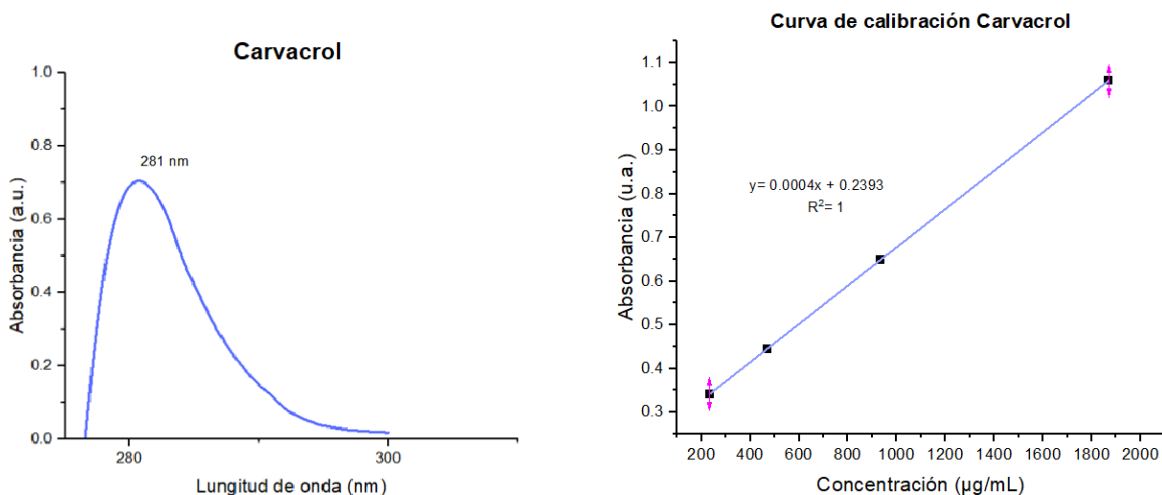
**Figura 15.** Microscopía de fluorescencia de los cortes de hepatopáncreas de camarones colectados en el día 2 del grupo control A-D). A) campo claro, B) filtro azul, C) filtro verde, D) filtro rojo. Microscopía de fluorescencia de cortes de hepatopáncreas de camarones colectados en el día 2 del grupo experimental E-H). E) campo claro, F) filtro azul, G) filtro verde, H) filtro rojo. Tomado de (Cervantes Millán et al., 2022).

En 2022, Cervantes-Millán comprobó que nanopartículas de quitosano cargadas con FITC y con un diámetro hidrodinámico de 500 nm, lograban ingresar al tejido del hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco del pacífico). En la figura 15 se muestran las imágenes que obtuvieron a través de microscopía de fluorescencia, donde se encontró que el filtro rojo (excitación 580-598 nm y emisión 612-680 nm) es el adecuado para diferenciar la fluorescencia del organismo y la del FITC que contienen las NPs. Este hallazgo es relevante, ya que las nanopartículas desarrolladas en este estudio presentan un tamaño dentro de este rango, lo que sugiere que podrían atravesar las barreras tisulares y llegar al hepatopáncreas, lo cual es esencial para su funcionalidad como nanoreactor in situ. El tamaño adecuado de las nanopartículas facilita

su biodisponibilidad en el órgano objetivo, permitiendo que las reacciones controladas o la liberación de compuestos bioactivos ocurran de manera localizada dentro del hepatopáncreas.

## 7.2 Eficiencia de Encapsulación (EE%)

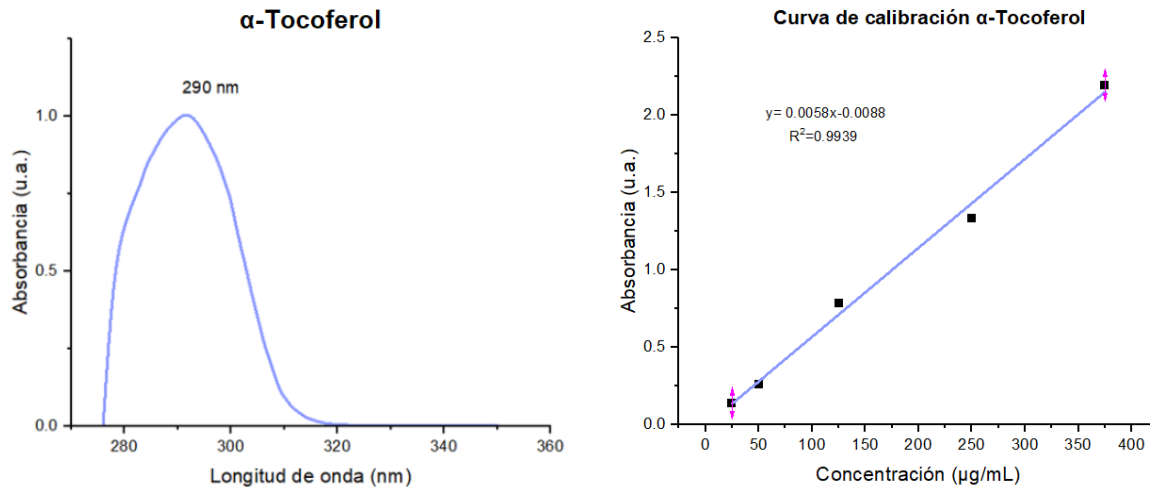
El espectro de absorbancia del aceite de orégano mostró el pico característico del carvacrol, el cual se esperaba encontrar en  $\approx 280\text{nm}$  (Li et al., 2011; Zhang et al., 2023). Se partió de esta referencia ya que el carvacrol es el mayor componente reportado de este aceite (68-78%) y resultó eficiente la técnica para su cuantificación. La curva de calibración se construyó con el valor de la absorbancia a los 281 nm, siendo esa la longitud de onda con mayor absorbancia en la lectura. La regresión lineal de esta curva muestra un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) con valor de 1, lo cual indica que el modelo y por lo tanto la técnica, son altamente confiables.



**Figura 16.** a) Espectro de absorbancia del carvacrol, b) Curva de calibración para la cuantificación de carvacrol.

Los espectros de absorbancia del  $\alpha$ -Toc mostraron una mayor absorbancia a los 290 nm, como había sido reportado anteriormente (Gamze, 2020). Se tomaron los valores de absorbancia de las

distintas concentraciones a esta longitud de onda y la curva construida muestra una regresión lineal con un valor de  $R^2$  de 0.99, lo cual confirma la confiabilidad del método para la cuantificación de  $\alpha$ -Toc.



**Figura 17.** a) Espectro de absorbancia del  $\alpha$ -tocoferol, b) Curva de calibración para la cuantificación de  $\alpha$ -tocoferol.

Los resultados de eficiencia de encapsulación (EE%) de las Cs/Or-NPs muestran un porcentaje de encapsulación de carvacrol del 77.54%. Sin embargo, este valor se refiere al 100% del aceite de orégano, considerando todos sus componentes. Esto sugiere que el 77.5% de la solución inicial de aceite corresponde a carvacrol, asumiendo que aproximadamente el 100% del carvacrol presente en la solución fue encapsulado. Esta conclusión se basa en que el contenido de carvacrol en el aceite de orégano según el fabricante oscila entre el 68% y el 78%.

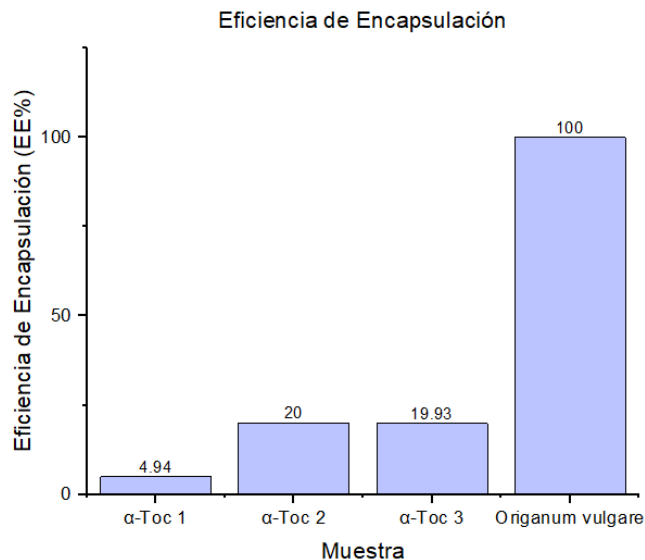
Con las nanopartículas de CS/ $\alpha$ Toc se tuvo una eficiencia de encapsulación del 20%, un valor considerablemente menor al reportado por otros métodos como emulsificación de membrana,

donde se logró encapsular el 100% (Trombino et al., 2022). La razón de una eficiencia de encapsulación baja podría deberse a la manera de diluir el  $\alpha$ -tocoferol pues aunque su disolución parcial en DMSO mejora su solubilidad, su interacción con la solución acuosa de quitosano puede ser insuficiente, lo que disminuye la eficiencia de encapsulación. Esta falta de compatibilidad entre el  $\alpha$ -tocoferol y el quitosano podría dificultar que este último capture de manera eficiente al  $\alpha$ -tocoferol durante el proceso de encapsulación.

En ambos casos la sustancia encapsulada presenta una solubilidad baja en medios acuosos, y es una molécula de naturaleza lipofílica, por lo que se requiere de una dilución o emulsificación para mejorar la interacción del aceite con soluciones acuosas como la de quitosano en este caso. La diferencia de la eficiencia de encapsulación entre los dos aceites es altamente significativa, esto se atribuye a que el aceite de orégano, al ser más compatible con surfactantes como el Tween 20, forma emulsiones estables en agua. Esto podría facilitar su encapsulación en las nanopartículas de quitosano, lo que ha reflejado una eficiencia del 100%.

**Tabla 3.** Resultados de eficiencia de encapsulación (EE%) para los distintos lotes de nanopartículas sintetizados.

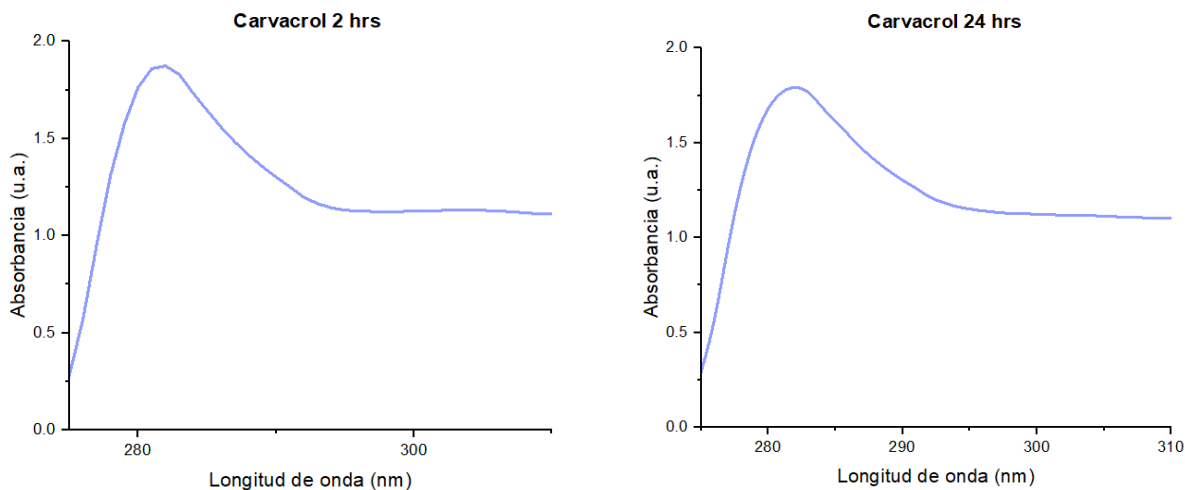
Lote	EE%
$\alpha$ -Toc 1	4.94
$\alpha$ -Toc 2	20
$\alpha$ -Toc 3	19.93
Orégano	100



**Gráfica 1.** Resultados de eficiencia de encapsulación (EE%) para los distintos lotes de nanopartículas sintetizados.

### 7.3 Liberación

Los resultados de la cuantificación de carvacrol en el medio (aceite de hígado de bacalao) tras 2 y 24 horas de agitación no mostraron el pico de absorbancia característico del carvacrol a 281 nm, lo que indica que no se detectó carvacrol en el medio oleoso. En contraste, las mediciones de absorbancia en la fase acuosa sugieren que la totalidad del carvacrol se encuentra en dicha fase. Esto podría implicar que el carvacrol no se liberó de las nanocápsulas dentro del intervalo de 2 a 24 horas.



**Figura 18.** Espectro de absorbancia de la fase no polar de las nanopartículas de quitosano con carvacrol expuestas a aceite de hígado de bacalao después de a) 2hrs y b) 24 hrs.

En el caso del  $\alpha$ -tocoferol, tampoco se detectó su absorbancia característica a 290 nm al medir el aceite del medio. Al igual que con el carvacrol, la cuantificación del contenido de  $\alpha$ -tocoferol en la fase acuosa mostró un cambio en la absorbancia a sus correspondientes 290 nm, lo que sugiere que el mecanismo de liberación sería el mismo que para el carvacrol. Sin embargo, los resultados del espectro de absorbancia no fueron tan claros como en el caso del carvacrol, lo cual se atribuye a la baja concentración de  $\alpha$ -tocoferol encapsulado en las nanopartículas de quitosano, lo que dificulta su detección tras el contacto con el medio.

El aceite de hígado de bacalao actúa como un medio oleoso adecuado, debido a su afinidad tanto por el carvacrol como por el  $\alpha$ -tocoferol. Además, simula de manera ideal un entorno graso, ya que es rico en ácidos grasos en un ambiente hidrofóbico, lo que lo convierte en un modelo óptimo para sistemas ricos en grasas, como los que se encuentran en productos alimentarios o farmacéuticos. Este medio también resulta útil para evaluar posibles interacciones entre el aceite

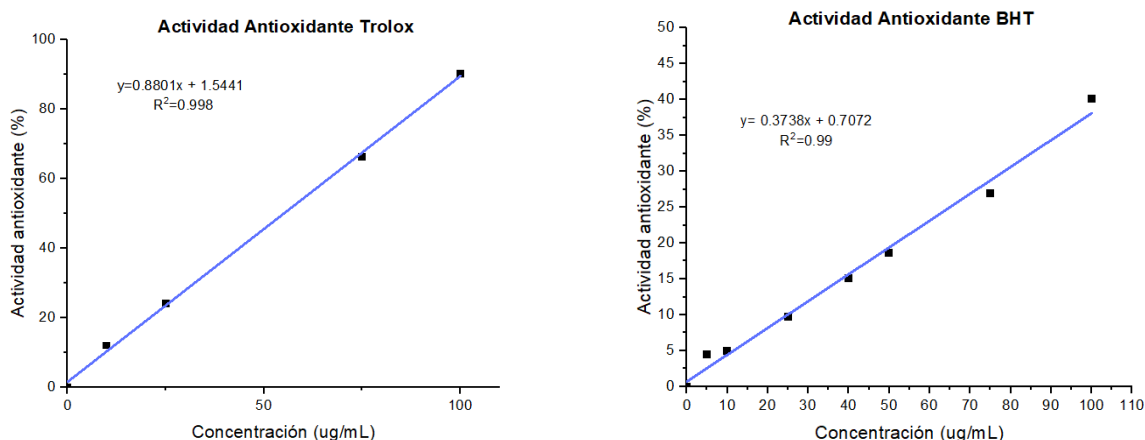
de hígado de bacalao y las nanopartículas de quitosano, lo que podría influir en la velocidad y el mecanismo de liberación tanto del carvacrol como de el  $\alpha$ -Toc. Tomando en cuenta estos puntos y los resultados de los experimentos de liberación, se puede concluir que, en un entorno lipídico realista, ni el carvacrol ni el  $\alpha$ -tocoferol se liberan en el intervalo de 2 a 24 horas, siendo difícil que después de este tiempo se logre dicha liberación.

Es importante destacar que, aunque el aceite de hígado de bacalao puede simular parcialmente las condiciones lipofílicas presentes en un organismo, su capacidad para replicar el entorno in vivo es limitada. Un factor crucial que dificulta la determinación precisa de la liberación in vivo es la diferencia en las condiciones fisiológicas. En un sistema biológico, intervienen enzimas digestivas, variaciones de pH y otros factores que no pueden ser completamente reproducidos utilizando solo aceite de hígado de bacalao. Además, este medio no refleja la compleja interacción entre las nanopartículas, las células, las membranas biológicas y las proteínas que ocurre en un entorno vivo como el hepatopáncreas. Este órgano, en particular, desempeña un papel fundamental en la degradación y absorción de nutrientes en *L. vannamei*, lo que refuerza la necesidad de considerar estas dinámicas biológicas en estudios que busquen evaluar la liberación controlada de compuestos.

#### **7.4 Capacidad Antioxidante**

El ensayo de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) se basa en la capacidad de los antioxidantes para neutralizar radicales libres, específicamente el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>, que se genera mediante la oxidación del ABTS. Se obtuvieron las curvas de calibración de actividad antioxidante para Trolox y BHT utilizando este ensayo. El coeficiente de Pearson en ambos casos sugiere que la regresión lineal obtenida es altamente confiable. A partir de estos

resultados, se concluye que el método es adecuado para evaluar la actividad antioxidante de otros compuestos utilizando ABTS, ya que el método proporciona resultados consistentes y muestra una fuerte correlación con la concentración de antioxidantes analizados. Su alta sensibilidad permite diferenciar entre distintos niveles de actividad antioxidante, lo que lo convierte en una opción adecuada para comparar diversos compuestos en términos de su capacidad para neutralizar radicales libres. Esto respalda su aplicación como una técnica confiable en investigaciones relacionadas con antioxidantes.



**Figura 19.** Curva de calibración para actividad antioxidante de a) Trolox y b) BHT.

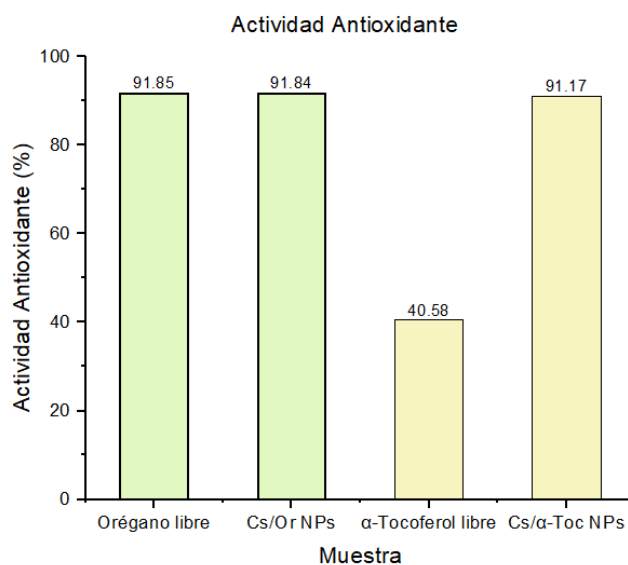
Con fines comparativos, los aceites libres se diluyeron a la misma concentración por mL que sus correspondientes soluciones nanoencapsuladas. Al analizar el aceite de orégano libre y el encapsulado en nanopartículas, se observa una diferencia insignificante del 0.01% en su actividad antioxidante, lo que sugiere que la nanoencapsulación no afecta significativamente esta propiedad. Esto puede deberse a que los compuestos activos responsables de la actividad antioxidante permanecen accesibles y efectivos, independientemente de si están en forma libre o encapsulada.

Por lo tanto, en aplicaciones donde se busque mejorar la estabilidad, solubilidad o liberación controlada, la nanoencapsulación del aceite de orégano podría ofrecer beneficios adicionales sin comprometer su capacidad antioxidante.

En contraste con el aceite de orégano, los resultados revelan una notable diferencia en la actividad antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol en su forma libre y encapsulada. Mientras que el  $\alpha$ -tocoferol libre presenta una actividad del 40.58%, el  $\alpha$ -tocoferol encapsulado en nanopartículas alcanza un valor significativamente mayor, con una actividad antioxidante del 91.17%. Estos datos sugieren que la nanoencapsulación mejora sustancialmente la actividad antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol. Una posible explicación es que las nanopartículas protegen al  $\alpha$ -tocoferol de la degradación u oxidación prematura, preservando su capacidad antioxidante de manera más efectiva. Además, es importante señalar que el quitosano, utilizado en la encapsulación, ha sido reportado por su propia actividad antioxidante, lo cual también podría influir en los resultados obtenidos en este ensayo, algo que no ocurrió con el carvacrol. Por otro lado, la encapsulación puede mejorar la solubilidad o biodisponibilidad del  $\alpha$ -tocoferol, facilitando su interacción con los radicales libres en medios acuosos, como fue el caso del ensayo ABTS.

**Tabla 4.** Actividad antioxidante de los distintos lotes de nanopartículas sintetizados.

Muestra	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Actividad antioxidante en ABTS %
Aceite de orégano libre	7,550	91.85
Cs/Or NPs	7,550	91.84
$\alpha$ -Tocoferol libre	298	40.58
Cs/ $\alpha$ -Toc NPs	298	91.17



**Gráfica 2.** Actividad antioxidante de los distintos lotes de nanopartículas sintetizados.

**Tabla 5.** Actividad antioxidante de los distintos lotes de nanopartículas sintetizados, comparados con sus equivalentes en Trolox y BHT, según las curvas de calibración elaboradas.

	Concentración	Eq. Trolox	Eq. BHT
	μg/mL	μg/mL	μg/mL
Aceite de orégano libre	7,550	102.62	243.84
Cs/Or-NPs	7,550	102.61	243.81
α-Tocoferol libre	298	44.36	106.67
Cs/α-Toc-NPs	298	101.85	242.02

Cervantes-Millán también llevó a cabo pruebas para evaluar el estrés oxidativo al incorporar nanopartículas de Cs/α-Toc en la dieta del organismo. Se realizó un ensayo in vivo de estrés oxidativo, exponiendo a los organismos a un estrés agudo durante dos horas, tras lo cual se tomaron muestras aleatorias de hepatopáncreas. Se evaluó la expresión de genes que codifican para las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa, todas ellas clave en la defensa antioxidante enzimática. Los resultados mostraron una diferencia significativa en la expresión de estos genes en el tratamiento con tocoferol, en comparación con el resto de los tratamientos. Esto sugiere que el tocoferol encapsulado en las nanopartículas de Cs/α-Toc permanece activo, lo que refuerza la hipótesis de que las nanopartículas sintetizadas en el presente estudio pueden actuar como nanoreactores en organismos como *L. vannamei*. Aunque exista la

posibilidad de que el componente no se libere completamente en un medio lipofílico, su actividad antioxidante sigue siendo eficiente dentro del organismo.

## 8. Conclusiones

Se logró la nanoencapsulación de *Origanum vulgare* y  $\alpha$ -tocoferol mediante el método de gelación iónica, obteniéndose nanopartículas con tamaños promedio de 94 nm y 150 nm, respectivamente.

La eficiencia de encapsulación fue 100% para *Origanum vulgare* y 20% para  $\alpha$ -tocoferol.

Se desarrollaron métodos precisos para la cuantificación de *Origanum vulgare* y  $\alpha$ -tocoferol utilizando espectrofotometría UV-vis, con picos de absorbancia a 281 nm y 290 nm, respectivamente.

Las nanopartículas sintetizadas no mostraron liberación de los componentes bioactivos al ser expuestas a un medio lipofílico, como el aceite de hígado de bacalao, tras 2 y 24 horas de agitación. Habría que considerar aspectos fisiológicos para determinar si se libera en el organismo.

Se demostró que la encapsulación de estos bioactivos en quitosano mediante gelación iónica no afecta su actividad antioxidante. El  $\alpha$ -tocoferol mostró un 40% de actividad antioxidante en su forma libre y un 91% encapsulado, lo que confirma que la encapsulación protege sus propiedades. Para *Origanum vulgare*, la actividad antioxidante fue similar tanto en su forma libre como encapsulada (91%).

Las nanopartículas sintetizadas en este estudio podrían funcionar como nanoreactores en organismos como *Litopenaeus vannamei*, donde se ha demostrado que estas nanopartículas pueden penetrar el tejido del hepatopáncreas y reducir el estrés oxidativo cuando se utilizan nanopartículas de Cs/ $\alpha$ -Toc.

## 9. Referencias

- Abate, T. G., Nielsen, R., & Tveterås, R. (2016). Stringency of environmental regulation and aquaculture growth: A cross-country analysis. *Aquaculture Economics & Management*, *20*(2), 201–221. <https://doi.org/10.1080/13657305.2016.1156191>
- Abdullah, A. N., Myers, B., Stacey, N., Zander, K. K., & Garnett, S. T. (2017). The impact of the expansion of shrimp aquaculture on livelihoods in coastal Bangladesh. *Environment, Development and Sustainability*, *19*(5), 2093–2114. <https://doi.org/10.1007/s10668-016-9824-5>
- Aboudzadeh, M. A., Mehravar, E., Fernandez, M., Lezama, L., & Tomovska, R. (2018). Low-Energy Encapsulation of  $\alpha$ -Tocopherol Using Fully Food Grade Oil-in-Water Microemulsions. *ACS Omega*, *3*(9), 10999–11008. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01272>
- Afonso, C., Bandarra, N. M., Nunes, L., & Cardoso, C. (2016). Tocopherols in Seafood and Aquaculture Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(1), 128–140. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.694920>
- Ahmed, I., Reshi, Q. M., & Fazio, F. (2020). The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: A review. *Aquaculture International*, *28*(3), 869–899. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00501-3>
- Almeida, M. M. B., de Sousa, P. H. M., Arriaga, Â. M. C., do Prado, G. M., Magalhães, C. E. de C., Maia, G. A., & de Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, *44*(7), 2155–2159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.051>
- Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W., & Zhong, F. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids*

- and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, 137–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.10.040>
- Aresta, A., Calvano, C. D., Trapani, A., Cellamare, S., Zambonin, C. G., & De Giglio, E. (2013). Development and analytical characterization of vitamin(s)-loaded chitosan nanoparticles for potential food packaging applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4), 1592.  
<https://doi.org/10.1007/s11051-013-1592-7>
- Aresta, A., Calvano, C. D., Trapani, A., Zambonin, C. G., & De Giglio, E. (2014).  $\alpha$ -Tocopherol/chitosan-based nanoparticles: Characterization and preliminary investigations for emulsion systems application. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(2), 2230. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-2230-0>
- 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>
- Bailey, B. (2016). *Determination of Tocotrienols and Tocopherols Using HPLC-ECD*.  
<https://www.semanticscholar.org/paper/Determination-of-Tocotrienols-and-Tocopherols-Bailey/7adefdbc5cafd35dbb06b8f0c332b2404de12bf>
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 604–615.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.073>
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4)
- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91–100.

- Cervantes Millán, J. E., Viana Castrillón, M. T., Universidad, N. A. de M., & Universidad, N. A. de M. (2022). *Encapsulación de tocoferol en nanopartículas de quitosano para inhibir estrés oxidativo en el camarón blanco, Litopenaeus vannamei*.
- Chanput, W., Krueyos, N., & Ritthiruangdej, P. (2016). Anti-oxidative assays as markers for anti-inflammatory activity of flavonoids. *International Immunopharmacology*, *40*, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.038>
- Christaki, E., Giannenas, I., Bonos, E., & Florou-Paneri, P. (2020). Chapter 2—Innovative uses of aromatic plants as natural supplements in nutrition. In P. Florou-Paneri, E. Christaki, & I. Giannenas (Eds.), *Feed Additives* (pp. 19–34). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00002-9>
- Chroho, M., Roupahel, Y., Petropoulos, S. A., & Bouissane, L. (2024). Carvacrol and Thymol Content Affects the Antioxidant and Antibacterial Activity of *Origanum compactum* and *Thymus zygis* Essential Oils. *Antibiotics*, *13*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020139>
- Cicalău, G. I. P., Babes, P. A., Calniceanu, H., Popa, A., Ciavoi, G., Iova, G. M., Ganea, M., & Scrobotă, I. (2021). Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Carvacrol and Magnolol, in Periodontal Disease and Diabetes Mellitus. *Molecules*, *26*(22), 6899. <https://doi.org/10.3390/molecules26226899>
- de Moura, M. R., Aouada, F. A., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Krochta, J. M., & Mattoso, L. H. C. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, *92*(4), 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.015>
- Diffey, B. L. (2002). Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, *28*(1), 4–13. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00204-9](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00204-9)

- Elumalai, P., Kurian, A., Lakshmi, S., Faggio, C., Esteban, M. A., & Ringø, E. (2020). Herbal Immunomodulators in Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(1), 33–57.  
<https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1779651>
- Estrada, D. M. (2023). *Efecto del resveratrol nanoencapsulado en la viabilidad de cultivos de adipocitos en monocapa y esferoidales*.  
<http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/7718868>
- Fernández-Quiroz, D., Tohidi, M. M., Paymard, B., & Lucero-Acuña, A. (2023). Chapter 9 - Immobilization of essential oils in biopolymeric matrices: Recent approaches for controlled delivery systems. In A. Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 78, pp. 365–401). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91253-2.00005-4>
- Firmino, J. P., Galindo-Villegas, J., Reyes-López, F. E., & Gisbert, E. (2021). Phytogetic Bioactive Compounds Shape Fish Mucosal Immunity. *Frontiers in Immunology*, 12, 695973.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.695973>
- Gamze, Ö. A. (2020). Quantitative Determination of  $\alpha$ -Tocopherol in Pharmaceutical Soft Capsule by Spectrophotometry. *Experimed*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.26650/experimed.2020.0009>
- 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), Article 13.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26134055>
- Griffiths, H. R. (2016). Antioxidants: Characterization and Analysis. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 221–226). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00037-4>

- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, *142*(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hernández, Y., Rodríguez-Rodríguez, Y., Rojas, A., & Camejo, A. (2022). *Producción de quitosano a partir de desechos de camarón (Penaeus vannamei) para el tratamiento de agua contaminada con metales pesados.*
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., & Carnevali, O. (2021). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, *29*(2), 198–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1795616>
- Jiang, Q., Im, S., Wagner, J. G., Hernandez, M. L., & Peden, D. B. (2022). Gamma-tocopherol, a major form of vitamin E in diets: Insights into antioxidant and anti-inflammatory effects, mechanisms, and roles in disease management. *Free Radical Biology & Medicine*, *178*, 347–359. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.012>
- Jolly, C. M., Nyandat, B., Yang, Z., Ridler, N., Matias, F., Zhang, Z., Murekezi, P., & Menezes, A. (2023). Dynamics of aquaculture governance. *Journal of the World Aquaculture Society*, *54*(2), 427–481. <https://doi.org/10.1111/jwas.12967>
- Khalid, K., Ishak, R., & Chowdhury, Z. Z. (2024). Chapter 15—UV–Vis spectroscopy in non-destructive testing. In A. Otsuki, S. Jose, M. Mohan, & S. Thomas (Eds.), *Non-Destructive Material Characterization Methods* (pp. 391–416). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91150-4.00021-5>
- Kim, S. (2018). Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities. *International Journal of Polymer Science*, *2018*, e1708172. <https://doi.org/10.1155/2018/1708172>

- Komaiko, J. S., & McClements, D. J. (2016). Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 331–352. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12189>
- Li, L.-R., Liu, C.-G., & Wei, Y.-J. (2011). [Fluorescence spectra and absorption spectra of carvacrol]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi = Guang Pu*, 31(10), 2763–2766.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., & Cameán, A. M. (2015). In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro*, 29(4), 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.006>
- Londoño Londoño, J. A. (2012). Antioxidantes: Importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *Desarrollo y transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.  
<https://scholar.google.com/scholar?cluster=16114167391977704732&hl=en&oi=scholar>
- Ma, Z., Garrido-Maestu, A., & Jeong, K. C. (2017). Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydrate Polymers*, 176, 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.082>
- Marin, O. (2022). EXPERIMENTACIÓN PARA EL APROVECHAMIENTO FITOQUÍMICO DEL MANGOSTINO.
- Niculae, G., Lacatusu, I., Bors, A., & Stan, R. (2014). Photostability enhancement by encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol into lipid-based nanoparticles loaded with a UV filter. *Comptes Rendus Chimie*, 17(10), 1028–1033. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.12.007>
- Piccollo, M., Aceto, M., & Vitorino, T. (2019). UV-Vis spectroscopy. *Physical Sciences Reviews*, 4(4).  
<https://doi.org/10.1515/psr-2018-0008>
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641–678.  
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>

- Raederstorff, D., Wyss, A., Calder, P. C., Weber, P., & Eggersdorfer, M. (2015). Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *British Journal of Nutrition*, *114*(8), 1113–1122.  
<https://doi.org/10.1017/S000711451500272X>
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Sarter, S., Sasal, P., & Caruso, D. (2021). Moving towards more sustainable aquaculture practices: A meta-analysis on the potential of plant-enriched diets to improve fish growth, immunity and disease resistance. *Reviews in Aquaculture*, *13*(1), 537–555.  
<https://doi.org/10.1111/raq.12485>
- Ross Hallett, F. (1999). Scattering and Particle Sizing Applications\*. In J. C. Lindon (Ed.), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)* (pp. 2488–2494). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374413-5.00277-3>
- Sainz, R. M., Lombo, F., & Mayo, J. C. (2012). Radical Decisions in Cancer: Redox Control of Cell Growth and Death. *Cancers*, *4*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/cancers4020442>
- Schaich, K., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, *14*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Shariatnia, Z. (2019). Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in Colloid and Interface Science*, *263*, 131–194. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.008>
- Sharpe, M. R. (1984). Stray light in UV-VIS spectrophotometers. *Analytical Chemistry*, *56*(2), 339A-356A.  
<https://doi.org/10.1021/ac00266a003>
- Song, C., Sun, C., Liu, B., & Xu, P. (2023). Oxidative Stress in Aquatic Organisms. *Antioxidants*, *12*(6), 1223.  
<https://doi.org/10.3390/antiox12061223>
- Suphoronski, S. A., Chideroli, R. T., Facimoto, C. T., Mainardi, R. M., Souza, F. P., Lopera-Barrero, N. M., Jesus, G. F. A., Martins, M. L., Di Santis, G. W., de Oliveira, A., Gonçalves, G. S., Dari, R., Frouel, S., & Pereira, U. P. (2019). Effects of a phytogetic, alone and associated with potassium diformate,

- on tilapia growth, immunity, gut microbiome and resistance against francisellosis. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42480-8>
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(1), 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024>
- Trombino, S., Poerio, T., Curcio, F., Piacentini, E., & Cassano, R. (2022). Production of  $\alpha$ -Tocopherol–Chitosan Nanoparticles by Membrane Emulsification. *Molecules*, 27(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules27072319>
- Wang, X., & Quinn, P. J. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, 38(4), 309–336. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(99\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(99)00008-9)
- Wani, T. U., Pandith, A. H., & Sheikh, F. A. (2021). Polyelectrolytic nature of chitosan: Influence on physicochemical properties and synthesis of nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 65, 102730. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102730>
- Weiss, J., Gaysinsky, S., Davidson, P., & McClements, D. (2009). Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials. In *Global Issues in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374124-0.00024-7>
- Yanat, M., & Schroën, K. (2021). Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging. *Reactive and Functional Polymers*, 161, 104849. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.104849>
- Yang, Y. (2023). Chitosan nanocarriers containing essential oils as a green strategy to improve the functional properties of chitosan: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Zambrano-Zaragoza, M. L., Mercado-Silva, E., Del Real L., A., Gutiérrez-Cortez, E., Cornejo-Villegas, M. A., & Quintanar-Guerrero, D. (2014). The effect of nano-coatings with  $\alpha$ -tocopherol and xanthan gum on shelf-life and browning index of fresh-cut “Red Delicious” apples. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.09.008>

Zhang, J., Hassane Hamadou, A., Chen, C., & Xu, B. (2023). Entrapment of carvacrol in zein-trehalolipid nanoparticles via pH-driven method and antisolvent co-precipitation: Influence of loading approaches on formation, stability, and release. *LWT*, *183*, 114916.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114916>