

[dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.19](https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.19)

Efecto de Microemulsiones de Aceites Esenciales Sobre el Eritrocito Humano y Bacterias Patógenas

Effect of Microemulsions of Essential Oils on Human Erythrocyte and Pathogens Bacteria

M. A. López-Mata¹, E. Valbuena-Gregorio¹, L. Quihui-Cota², G. G. Morales-Figueroa², S. Ruiz-Cruz³,
J. C. Campos-García¹, E. Díaz-Meza¹, D. E. Pablos-Rodríguez¹

¹Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Campus Cajeme, Blvd. Bordo Nuevo S/N, A.P. 85040, Antigua Providencia, Cd. Obregón, Sonora, México.

²Departamento de Nutrición Pública y Salud, Coordinación de Nutrición, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera al Ejido la Victoria Km. 0.6, A.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

³Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero #818 Sur, C.P. 85000, Cd. Obregón, Sonora, México.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las microemulsiones de aceite esencial de romero (AER) y árbol de té (AET) sobre el eritrocito humano y microorganismos patógenos. Para ello, se elaboraron microemulsiones de AER y AET al 8.0% (v/v), 5.0% (v/v) y 2.5% (v/v). Las microemulsiones fueron probadas sobre el eritrocito humano para determinar el porcentaje de hemólisis, el porcentaje de inhibición de hemólisis y su actividad antibacterial contra *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*. Las microemulsiones con AER no presentaron actividad hemolítica significativa, caso contrario con las microemulsiones de AET al 8.0% ($\approx 70\%$) y 5.0% (33%) que presentaron mayor actividad hemolítica. Las microemulsiones de AER protegieron significativamente al eritrocito contra la presencia de radicales libres, en comparación con aquellas de AET ($p < 0.05$). Además, las emulsiones de AET al 8.0% mostraron efectos antibacterianos contra *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* mientras que AER al 8.0% solo mostraron efecto contra *E. coli* O157:H7. La limitante del estudio fue que no utilizamos células nucleadas para establecer si los aceites esenciales dañan el material nuclear. Sin embargo, observamos que el tipo y la cantidad de aceite utilizado pueden tener implicaciones serias sobre la membrana eritrocitaria. Se concluye que las microemulsiones de AER presentaron mejor efecto protector eritrocitario, mientras que las microemulsiones de AET presentaron mejor actividad antibacterial contra las bacterias estudiadas, pero con mayor efecto tóxico sobre el eritrocito.

PALABRAS CLAVE: Aceites esenciales, antibacterial, hemólisis, microemulsiones.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of microemulsions of rosemary (AER) and tea tree (AET) essential oils on human erythrocyte and pathogen bacteria. Microemulsions of each oil were prepared at 8.0% (v/v), 5.0% (v/v) and 2.5% (v/v), and they were tested on human erythrocyte to determine the hemolysis percentage, hemolysis inhibition percentage and the antibacterial capacity against *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*. All AER microemulsions showed no significant hemolytic activity. On the contrary, AET microemulsions showed hemolytic effect but those in concentrations of 8.0% ($\approx 70\%$) and 5.0% (33%) showed the highest effect. In addition, AER microemulsions showed protective effect against free radicals in comparison with the AET microemulsions ($p < 0.05$). On the other hand, the AET microemulsion at 8.0% showed antibacterial effect against *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*, and the AER at 8.0% showed antibacterial effect against *E. coli* O157:H7. The limitation of this study was that nucleated cells were not used to observe the damage of the essential oils on nuclear material. However, the observed damage of erythrocyte's membrane is depending on type and amount of used oil. Therefore, it can be concluded that the AER microemulsions showed better protective effect of erythrocytes, while AET microemulsions showed better antibacterial effect against the tested bacteria, although with toxic effect on the erythrocytes.

KEYWORDS: Essential oil, antibacterial, hemolysis, microemulsions.

Correspondencia

DESTINATARIO: M. A. López-Mata

INSTITUCIÓN: Departamento de Ciencias de la Salud,
Universidad de Sonora, Campus Cajeme

DIRECCIÓN: Blvd. Bordo Nuevo S/N, A.P. 85040,
Antiguo Providencia, Cd. Obregón, Sonora, México

TELÉFONO: 01 (644) 410-5270

CORREO ELECTRÓNICO: marco.lopez@cajeme.uson.mx

Fecha de recepción:

15 de octubre de 2016

Fecha de aceptación:

26 de diciembre de 2016

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE) son una mezcla de sustancias químicas complejas con un perfil fuertemente aromático, que son obtenidos a partir de las plantas ^[1]. Los AE y sus extractos, continúan en uso por la medicina popular, aunque actualmente la industria farmacéutica y cosmética, han aumentado el interés por estos, debido al relativo estatus de seguridad y a la amplia aceptación por la población ^[2], debido a las diversas propiedades antimicrobianas y antioxidantes ^[3, 4, 5]. Sin embargo, las limitaciones en el uso y aplicación de los AE se atribuyen principalmente a la naturaleza fotosensible, volátil e hidrofóbica, lo que a su vez ha estimulado la búsqueda de nuevos sistemas de conservación ^[6]. Entre estos sistemas se encuentran los procesos de microencapsulación que involucra la incorporación de compuestos bioactivos en pequeñas cápsulas. Varias técnicas han sido utilizadas para encapsular compuestos bioactivos las cuales incluye secado por pulverización, enfriamiento por pulverización, extrusión, cobertura de lecho fluidizado, liposomas, coacervación y emulsión ^[7]. Uno de los sistemas que ha merecido especial atención para la encapsulación de AE ha sido el uso de emulsiones ^[8]. La finalidad de una emulsión es lograr que los compuestos de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica puedan coexistir de manera más estable ^[4]. En particular, se le han atribuido diversas ventajas sobre otros tipos de sistema con respecto a la liberación y el incremento de la biodisponibilidad de los componentes bioactivos ^[9].

Por otro lado, existen diversos AE, pero aquellos del árbol de té [AET] (*Melaleuca alternifolia*) ha ganado buena reputación como un material bioactivo seguro. Estudios previos han publicado que el AET posee propiedades antibacteriales, antiinflamatorias, anticancerígenas y acaricidas [10]. Este amplio espectro de actividad biológica ha sido atribuido a la presencia de terpineno-4-ol, γ -terpineno y α -terpino ^[11]. Otro aceite que se ha utilizado en la medicina tradicional como analgésico y antiinflamatorio, es el aceite esencial de romero [AER] (*Rosmarinus officinalis*). Algunos estudios han evidenciado que sus

efectos farmacológicos han sido atribuidos principalmente a la presencia de diterpenos, carnosol, ácido carnósico y ácido rosmarínico ^[12]. Sin embargo, se desconocen los efectos que pudieran tener al ser aplicados como microemulsiones de AER y AET sobre las células humanas (modelo eritrocitario) y microorganismos patógenos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el tamaño, el efecto antibacteriano, hemolítico y de protección al eritrocito de las microemulsiones de AER y AET.

METODOLOGÍA

Preparación de las Emulsiones de AET y AER: Fueron elaboradas con base a lo establecido por Rao y McClements ^[9], con algunas ligeras modificaciones. Para ello, se prepararon emulsiones al 8% (v/v), 5% (v/v) y 2.5% (v/v), tanto para AET y AER. Para ello los AET (SARC supply solutions, USA; densidad relativa 0.898 g/cm³ a 25 °C) y AER (SARC supply solutions, USA; densidad relativa 0.903 g/cm³ a 25 °C), se mezclaron con tween 80 (polioxietilensorbitano monooleato 80) (1% v/v) y una solución de buffer fosfato (PBS) a un pH de 7.4 y posteriormente se agitaron a una velocidad constante 200 RPM por 20 minutos hasta adquirir una consistencia lechosa y homogénea. Las emulsiones fueron conservadas en viales de color ámbar a 5 °C.

Tamaño: Se realizó por el método de Poyato et al. ^[13], haciendo una medición del diámetro de las micelas en un microscopio óptico Ziess Primo Star (Carl Zeiss Microscopy GmbH), adicionado con una cámara AxioCamERc 5s Ziess (Alemania). Después, se caracterizaron por tamaño de micelas encontradas en 3 campos (40x). Los rangos de distribución de los tamaños de las emulsiones fueron reportados en rangos de amplitud de 2-110 μ m (AER) y 4-60 μ m (AET).

Porcentaje de Hemólisis: Se realizó con base a lo establecido por Sundaram et al. ^[14], con las modificaciones siguientes; se utilizaron muestras de sangre humana recolectadas en un tubo con anticoagulante EDTA (ácido etildiamino tetraacético). La muestra fue centrifugada a 350 g por 5 minutos, se descartó el plasma y se recolectó el

paquete eritrocitario. Los eritrocitos fueron lavados en tres ocasiones con 3 mL de solución salina al 0.9% (p/v), siendo centrifugados después de cada lavado a 350 g por 5 minutos. Después, se preparó una suspensión de eritrocitos al 5% (v/v). Para determinar la hemólisis eritrocitaria se adicionaron 1979 μL de PBS y 14 μL de la suspensión de eritrocitos al 5% (v/v) con 7 μL de cada una de las emulsiones de AET o AER, al 8% (v/v), 5% (v/v) y 2.5% (v/v) de manera independiente. También se utilizó un tubo control con las mismas cantidades antes descritas, pero con agua (100% hemólisis). Una vez confrontada las emulsiones con el eritrocito, se colocaron en agitación constante a 37 °C por 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron (350 g por 5 min) y los sobrenadantes se leyeron a 540 nm en un fotómetro semi-automático SPINLAB (Spinreact S.A.). Posteriormente se calculó el porcentaje de hemólisis (1):

$$\% \text{ de Hemólisis} = \left(\frac{\text{AM} \times 100}{\text{AHT}} \right) \quad (1)$$

Donde: AM=Absorbancia de la muestra (eritrocitos-emulsión y PBS) y AHT=Absorbancia de la hemólisis total.

Porcentaje de Inhibición de Hemólisis: Para ello se preparó una suspensión de eritrocitos al 5% (v/v) que se expuso con los preparados de las emulsiones y peróxido de hidrógeno. La cantidad de emulsión utilizada en el presente análisis fue de 7 μL de cada una de las emulsiones y 2.5 μL de peróxido de hidrógeno al 30% (v/v). También se utilizó un control de 100% de hemólisis, que se preparó con agua y suspensión de eritrocitos. Una vez que se expuso el eritrocito a la emulsión y al oxidante, se incubaron a 37 °C por 2 h. Posterior al tiempo de incubación, la muestras se centrifugaron a 350 g por 5 minutos, se descartó el precipitado y el sobrenadante se introdujo a un analizador semi-automático SPINLAB y se leyó a 540 nm [15]. Para establecer el grado de protección al eritrocito por las emulsiones, se calculó el porcentaje de inhibición de hemólisis (2):

$$\% \text{ de Inhibición de hemólisis} = \left(\frac{\text{Abs muestra} \times 100}{\text{Abs total}} \right) - 100 \quad (2)$$

Abs muestra: Absorbancia de la mezcla de suspensión de eritrocitos, emulsión y oxidante.

Abs total: Absorbancia obtenida de la mezcla de agua, más suspensión de eritrocitos y oxidante.

Actividad Antibacterial: Se utilizó el método descrito por Hu et al. [16] modificado, donde se determinó la sensibilidad bacteriana en cepas de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43890) y *S. aureus* (ATCC 9144) expuestas a las emulsiones preparadas de AET y AER a diferentes concentraciones [8.0% (v/v), 5.0% (v/v) y 2.5% (v/v)]. El ensayo para la determinación del efecto inhibitorio de las emulsiones, se realizó por medio de la adición de 100 μL de caldo nutritivo inoculado con aproximadamente 1×10^6 ufc/mL de cada cepa. A cada caldo se le adicionaron emulsiones en sus diferentes concentraciones 200 μL y se ajustó hasta 10 mL con PBS estéril. Posteriormente, el caldo se incubó a 37 °C por 24 h, con agitación ocasional. Una vez finalizada la incubación, el contenido de los caldos (100 μL) fueron depositados en placas de agar Muller-Hinton (por triplicado) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Después, se procedió con la cuenta de colonias desarrolladas. Con los datos obtenidos se realizó el cálculo para la determinación del efecto antibacteriano (3):

$$\text{Tasa de \% de inhibición} = \frac{(\text{A}-\text{B}) \times 100}{\text{A}} \quad (3)$$

Dónde: A= Número de colonias en control y B= Número de colonias desarrolladas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tamaño: Las micelas fueron clasificadas de acuerdo a los diferentes tamaños que presentaron en las distintas concentraciones de emulsiones. Para las emulsiones preparadas con AER se pudo observar que el diámetro de la partícula predominante fue de 2 a 35 μm (Figura 1).

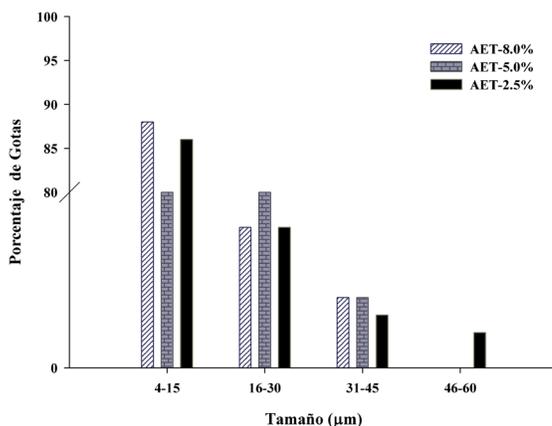
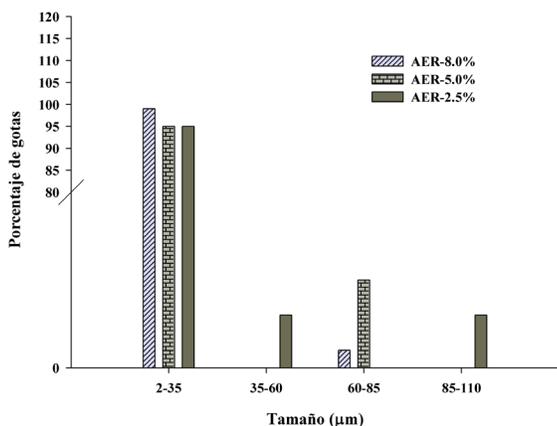


FIGURA 1: Distribución de los tamaños de gota de las microemulsiones de AER.

FIGURA 2: Distribución de los tamaños de gota de las microemulsiones de AET.

En las emulsiones preparadas con AET (Figura 2), los diámetros del tamaño de la partícula fueron más variados, con mayor porcentaje de partículas con diámetros de 4-15 μm, seguido por partículas con diámetros de 16 a 30 μm. Para el caso de las emulsiones con AER, se observó una cantidad mínima de partículas con diámetros mayores de los rangos ya mencionados.

Según Salager [17], el tamaño de la gota y la distribución de tamaños son dos tipos de información muy importantes, ya que por un lado dan lugar a características de las emulsiones, y por otro son útiles para definir estabilidad.

Porcentaje de Hemólisis: El termino hemólisis hace referencia al proceso de destrucción de los eritrocitos, que genera la liberación de los componentes intraeritrocitarios, por lo tanto, la prueba de porcentaje de hemólisis se utiliza para conocer el efecto provocado sobre la célula eritrocitaria al enfrentarla con emulsiones de AET y AER en diversas concentraciones de aceites esenciales.

En la Figura 3 podemos observar que conforme se aumenta la concentración de AET, se incrementa significativamente el efecto hemolítico sobre la células eritrocitarias ($p < 0.05$).

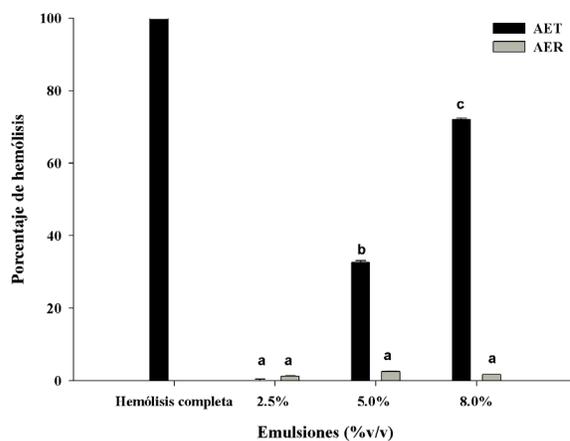


FIGURA 3. Porcentaje de hemólisis de las emulsiones de AER y AET.

El máximo incremento de hemólisis fue hasta de 70% para las emulsiones cargadas con 8.0% y de 32% para la concentración del 5.0%. En cambio para las emulsiones con 2.5%, la hemólisis presente no fue significativa. No se han encontrado reportes previos de los efectos del aceite de AET sobre los eritrocitos de animales o humanos. Pero otros estudios han evidenciado que AET puede tener la capacidad de desnaturar proteínas y alterar la estructura de la membrana celular [18]. Otra parte importante que se ha estudiado de AET, ha sido su efecto sobre células epiteliales y fibroblastos. Además se ha observado que a bajas concentraciones de AET, los efectos

citotóxicos son bajos, pero se incrementan cuando se aumenta la concentración y el tiempo de contacto de AET con las células eritrocitarias [19]. En el caso de las emulsiones preparadas con AER, se observó que el incremento en la concentración, no se asoció con un aumento en la hemólisis. Esto nos indicó que las concentraciones estudiadas no tienen efectos citotóxicos para la célula eritrocitaria. Estudios previos han evidenciado que AER administrado al 4% sobre el área de una herida de un ratón modelo, induce infiltración de macrófagos y consecuentemente la proliferación de fibroblastos. Esto ha sugerido que la AER puede proteger a las células e incluso acortar el tiempo de recuperación de las heridas [20]. Al igual que el estudio anterior, en nuestro estudio también observamos un efecto de protección importante sobre el eritrocito humano. Por otro lado, durante la preparación de las emulsiones con los aceites esenciales se utilizó un surfactante no iónico (tween 80) el cual tiene la capacidad de incrementar la permeabilidad de la membrana de los eritrocitos de sustancias de peso molecular bajo causando hemólisis por presión osmótica coloidal [21]. El estudio anterior, desafortunadamente usó células obtenidas de un banco de sangre con ≈ 21 días después de la venopunción. Igualmente, el tiempo de almacenamiento y la conservación de las células pudieron haber sido también una causa importante de hemólisis por senescencia y por proceso, los cuales fueron factores que no ajustaron en ese estudio. En nuestro estudio, podemos considerar que la influencia de tween 80 sobre células obtenidas de reciente venopunción (≈ 5 horas) podría representar una baja hemólisis. Esto se concluyó cuando las emulsiones de AET y AER fueron preparadas con las mismas concentraciones de tween 80 y como se observa en la Figura 3, el efecto hemolítico observado por las emulsiones elaboradas con AER, fué muy bajo, mientras que en AET el efecto se elevaba en relación al incremento en la concentración de aceite esencial.

Porcentaje de Inhibición de Hemólisis: Contrario a la prueba de porcentaje de hemólisis, la determinación del porcentaje de inhibición de hemólisis tiene la finalidad de medir la capacidad que tienen ciertas sustancias (antioxidantes) para proteger al eritrocito, bajo condiciones de ataque a la membrana celular (oxidante). En el presente estudio se generó un proceso

de peroxidación para producir radicales libres, que es una de las principales causas de daños y destrucción de la membrana eritrocitaria. En la Figura 4, se observa que la emulsión cargada con AER presentó mayor capacidad de inhibición de hemólisis ($p < 0.05$) en todas sus concentraciones comparadas con las de AET.

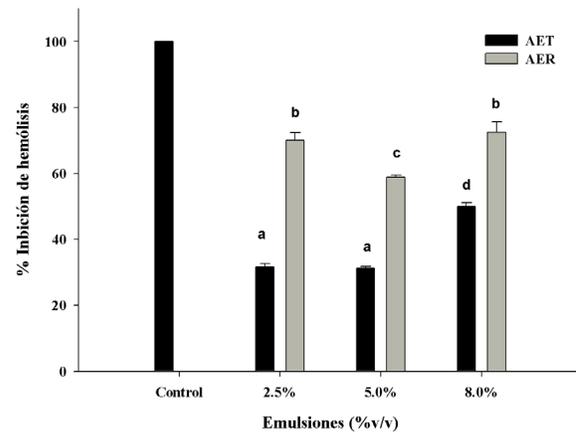


FIGURA 4. Porcentaje de inhibición de hemólisis de emulsiones de aceite de AET y AER.

De manera específica se pudo observar que las emulsiones de AER al 2.5% y 8.0% mostraron porcentajes de inhibición de hemólisis $>70\%$. En cuanto a las emulsiones de AET se observó un porcentaje de inhibición de hemólisis $<40\%$ para las emulsiones cargadas al 2.5% y 5.0%, mientras que para una concentración del 8.0%, el porcentaje de inhibición de hemólisis fue $>40\%$. También se observó que las emulsiones con AER fueron más eficientes en proteger al eritrocito contra el ataque oxidativo, que las cargadas con AET. Por el contrario, Yesil-Celiktas *et al.* [22] monitorearon la capacidad de extractos de romero para inhibir el ataque oxidativo (H_2O_2) a la membrana eritrocitaria, con la consecuente producción de malondialdehído, un componente mutagénico y carcinogénico que resulta de la inserción de un átomo de oxígeno en el componente lipídico de la membrana. Ellos observaron que los extractos de romero presentaban una baja protección a la peroxidación de la membrana del eritrocito, con respecto a antioxidantes conocidos (BHT), que eran atribuidos a sus componentes hidrofóbicos. Es importante mencionar que en nuestro estu-

dio, se evaluaron las emulsiones de AER y no extractos, los cuales pueden contener diversos solventes. Esto nos podría indicar que las formas en las que se prueban los antioxidantes pueden estar en función de su disponibilidad de sus componentes bioactivos. Por otro lado, podemos mencionar que AET ha sido reconocido por su capacidad antioxidante, particularmente por la presencia de α -terpineno [23]. La estimación de la capacidad antioxidante de AET ha sido reportada por DPPH o ABTS u otros métodos que se fundamentan en reacciones químicas in vitro y que puede ser diferente a lo que realmente sucede en el cuerpo humano. Esto significa, que aunque la estimación de la capacidad antioxidante del AET sea alta, esto no necesariamente puede traducirse en un efecto benéfico para las células humanas (Figura 3). Previamente, se ha observado que AET puede exhibir cierta toxicidad sobre células humanas (no eritrocitarias) en función de la concentración y tiempo de contacto [20]. Estudios recientes han identificado que α -terpineno puede oxidarse fácilmente produciendo epóxidos alílicos, que pueden ser alérgenos de importancia [24].

Actividad Antibacteriana: En la Tabla 1, se puede observar que la emulsión de AET y AER al 8.0%, presentaron inhibición alta sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7. Por otro lado, el crecimiento de *S. aureus* fue inhibido en un 100% y 99% por la emulsión de AET al 8.0% y 5.0% respectivamente. En cambio, ninguna emulsión cargada con AER, presentó efecto inhibitorio contra *S. aureus*.

En el caso de AET, Orozco *et al.* [25], también observaron actividad antibacteriana significativa durante la exposición de microemulsiones con AET contra cepas de *E. coli*. Otros estudios, también han evidenciado que AET puede ser usada en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* [27]. Actualmente se atribuye la propiedad antibacteriana de AET a los compuestos como el terpineno-4-ol, linalol y α -terpineol. Se ha observado que estos compuestos (terpineno-4-ol, principalmente) pueden afectar la pared celular bacteriana, provocando daño en el núcleo celular [11]. Este mecanismo de acción podría explicar el efecto de AET sobre las células de *E. coli* [26]. Por otro lado, Ojeda-Sana *et al.* [28], aseguraron que los componentes de AER como el 1-8 cineol, alcanfor, verbenone y borneol pueden ser

capaces de romper la membrana celular de *E. coli*. Con respecto a su selectividad bacteriana, se ha considerado que AER suele ser más efectivo contra bacterias Gram negativas que contra Gram positivas [29]. Esto podría explicar la ausencia de inhibición de crecimiento contra *S. aureus*. El mecanismo

TABLA 1. Actividad antibacteriana de las emulsiones de AET y AER.

Emulsiones (%v/v)	% de Inhibición	
	<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC43890)	<i>S. aureus</i> (ATCC9144)
AET -8.0%	99	100
AET -5.0%	NI	99
AET -2.5%	NI	NI
AER-8.0%	99	NI
AER-5.0%	NI	NI
AER-2.5%	NI	NI

NI= no inhibición

de acción de AER contra los Gram negativos aún no está bien elucidado pero existe evidencia que indica que los primeros efectos ocurren sobre la membrana externa. Sin embargo, para que esto suceda, la concentración de AER debe encontrarse en cantidades suficientes para permitir que sus componentes se difundan a través de la cobertura de lipopolisacáridos [30]. Previamente también se ha reportado que los daños en la membrana externa pueden progresar más rápidamente que los ocurridos en la membrana citoplasmática [31].

CONCLUSIONES

El tamaño de gota de las microemulsiones de los AE estudiados fue predominantemente entre 2 a 35 μ m. También encontramos que las emulsiones con AER en las concentraciones evaluadas inhiben la lisis del eritrocito expuesto a peróxido de hidrógeno. En relación al efecto antimicrobiano, solo las emulsiones con concentración más altas de AER y AET lograron inhibir el crecimiento in vitro de *E. coli*. Por otro lado, las emulsiones de AET mostraron actividad antimicrobiana significativa contra *E. coli* y *S. aureus*. A pesar de que mostraron buena actividad antibacteriana, las de AET mostraron efecto hemolítico sobre el eritrocito humano, lo cual representan desventaja en un posible uso para fines terapéuticos en humanos. Finalmente este estudio sugiere que es importante seguir estudiando los efectos tóxicos del AET sobre las células humanas.

REFERENCIAS

- [1] S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review" *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 94, no. 3, pp. 223-253, 2004. DOI: [10.1016/j.jfoodmicro.2004.03.022](https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2004.03.022)
- [2] L. Salvia-Trujillo, A. Rojas-Graü, R. Soliva-Fortuny, and O. Martín-Belloso, "Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils" *Food Hydrocolloid.*, vol. 43, pp. 547-556, 2015. DOI: [10.1016/j.foodhyd.2014.07.012](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.012)
- [3] U. Buranasuksombat, Y. J. Kwon, M. Turner, and B. Bhandari, "Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties" *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 20, no. 3, pp. 793-800, 2011. DOI: [10.1007/s10068-011-0110-x](https://doi.org/10.1007/s10068-011-0110-x)
- [4] W. C. Hsieh, C. P. Chang, and Y. L. Gao, "Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments" *Colloid. Surface. B.*, 53, 209-214, 2006. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2006.09.008](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.09.008)
- [5] G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, and R. Bruni, "Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods" *Food Chem.*, vol. 91, no. 4, pp. 621-632, 2005. DOI: [10.1016/j.foodchem.2004.06.031](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031)
- [6] A. Herman, A. P. Herman, B. W. Domagalska, and A. Mlynarczyk, "Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion" *Indian J. Microbiol.*, vol. 53, no. 2, pp. 232-237, 2013. DOI: [10.1007/s12088-012-0329-0](https://doi.org/10.1007/s12088-012-0329-0)
- [7] A. Lopez-Rubio, R. Gavara, and J. M. Lagaron, "Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials" *Trends Food Sci. Tech.*, vol. 17, no. 10, pp. 567-575, 2006. DOI: [10.1016/j.tifs.2006.04.012](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.012)
- [8] V. Đorđević, B. Balanč, A. Belščak-Cvitanović, S. Lević, K. Trifković, A. Kalušević, I. Kostić, D. Komes, B. Bugarski, and V. Nedović, "Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds" *Food Eng. Rev.*, vol. 7, no. 4, pp. 452-490, 2015. DOI: [10.1007/s12393-014-9106-7](https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7)
- [9] J. Rao, and D. McClements, "Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability" *Food Hydrocolloid.*, vol. 29, no. 2, pp. 326-334, 2012. DOI: [10.1016/j.foodhyd.2012.04.008](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.008)
- [10] J. Y. Yang, K. S. Cho, N. H. Chung, C. H. Kim, J. W. Suh, and H. S. Lee, "Constituents of volatile compounds derived from *Melaleuca alternifolia* leaf oil and acaricidal toxicities against house dust mites" *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, vol. 56, no. 1, pp. 91-94, 2013. DOI: [10.1007/s13765-012-2195-1](https://doi.org/10.1007/s13765-012-2195-1)
- [11] C. F. Carson, K. A. Hammer, and T. V. Riley, "Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties" *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 50-62, 2006. DOI: [10.1128/CMR.19.1.50-62.2006](https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006)
- [12] A. Rašković, I. Milanović, N. Pavlović, T. Čebović, S. Vukmirović, and M. Mikov, "Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential" *BMC Complem. Altern. M.*, vol. 14, no. 1, pp. 1, 2014. DOI: [10.1186/1472-6882-14-225](https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-225)
- [13] C. Poyato, I. Navarro-Blasco, M. Calvo, R. Cavero, I. Astiasarán, and D. Ansorena, "Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity" *Food Res. Int.*, vol. 51, pp. 132-140, 2012. DOI: [10.1016/j.foodres.2012.11.032](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.032)
- [14] S. Sundaram, S. Anjum, P. Dwivedi, and G. K. Rai, "Antioxidant activity and protective effect of Banana peel against oxidative hemolysis of human erythrocyte at different stages of ripening" *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 164, no. 7, pp. 1192-1206, 2011. DOI: [10.1007/s12010-011-9205-3](https://doi.org/10.1007/s12010-011-9205-3)
- [15] D. Slameňová, E. Horváthová, Z. Kováčiková, K. Kozics, and L. Hunáková, L. "Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H₂O₂ and DMNQ" *Food Chem.*, vol. 129, no.1, pp. 64-70, 2011. DOI: [10.1016/j.foodchem.2011.04.020](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.020)
- [16] Y. Hu, Y. Yang, Y. Ning, C. Wang, and Z. Tong, "Facile Preparation of Artemisia argyi oil-loaded antibacterial microcapsules by hydroxyapatite-stabilized pickering emulsion templating" *Colloid. Surface. B.*, vol. 112, pp. 96-102, 2013. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2013.08.002](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.002)
- [17] J. L. Salager, "Formulación, composición y fabricación de emulsiones para obtener las propiedades deseadas" *Escuela de Ingeniería Química de la ULA. Universidad de los Andes. Parte B. Versión 2*: pp. 1-43, 1999.
- [18] J. A. Cuaron, "Mechanisms involved in the response and reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to tea tree oil: doctoral dissertation" *New Mexico State University*, pp.1-64, 2012.
- [19] T. A. Söderberg, A. Johansson, and R. Gref, "Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells" *Toxicology* vol. 107, pp. 99-109, 1996. DOI: [10.1016/0300-483X\(95\)03242-8](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)03242-8)
- [20] H. Nejati, M. R. Farahpour, and M. N. Nagadehi, Topical Rosemary officinalis essential oil improves wound healing against disseminated *Candida albicans* infection in rat model. *Comp. Clin. Path.*, vol. 24, no. 6, pp. 1377-1383, 2015. DOI: [10.1007/s00580-015-2086-z](https://doi.org/10.1007/s00580-015-2086-z)
- [21] J. Bielawski, et al. Hemolytic activity of the non-ionic detergents tween 80 and triton X-100. *Biol. Bull. Poznań.*, vol. 24, pp. 27-41, 1995.
- [22] O. Yesil-Celiktas et al. "Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times" *Eur. Food Res. Technol.*, 224, no. 4, pp. 443-451, 2007. DOI: [10.1007/s00217-006-0306-0](https://doi.org/10.1007/s00217-006-0306-0)
- [23] H. J. Kim et al. "Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components" *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 10, pp. 2849-2854, 2004. DOI: [10.1021/jf035377d](https://doi.org/10.1021/jf035377d)
- [24] J. Rudbäck et al. "α-Terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure" *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 25, no. 3, pp. 713-721, 2012. DOI: [10.1021/tx200486f](https://doi.org/10.1021/tx200486f)
- [25] M. Orozco, A. Ochoa, and A. Niño "Desarrollo y evaluación de microemulsiones de aceites esenciales de árbol de té, clavo, canela y de una mezcla de extractos cítricos como antimicrobianos" *Memorias del XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. 2011.
- [26] A. B. Arweiler, N. Donos, L. Netuschil, E. Reich, and A. Sculean, "Clinical and antibacterial effect of tea tree oil-a pilot study" *Clin. Oral Investig.*, vol. 4, no. 2, pp. 70-73, 2000. DOI: [10.1007/s007840050118](https://doi.org/10.1007/s007840050118)
- [27] L. Halcón, and K. Milkus, "Staphylococcus aureus and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial" *Am. J. Infec. Control.*, vol. 32, no. 7, pp. 402-408, 2004. DOI: [10.1016/j.ajic.2003.12.008](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2003.12.008)
- [28] A. Ojeda-Sana, C. Baren, M. Elechosa, M. Juárez, and S. Moreno, "New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components" *Food Control.*, vol. 31, no. 1, pp. 189-195, 2012. DOI: [10.1016/j.foodcont.2012.09.022](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.022)
- [29] Y. Zaouali T. Bouzaine, and M. Boussaid, "Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities" *Food Chem. Toxicol.*, vol. 48, no. 11, pp. 3144-3152, 2010. DOI: [10.1016/j.fct.2010.08.010](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.010)
- [30] I. De Medeiros Barbosa, J. A. et al. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in leafy vegetables. *Food control*, vol. 59, pp. 468-477, 2016. DOI: [10.1016/j.foodcont.2015.06.017](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.017)
- [31] G. Mazzarrino et al. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, vol. 50, pp. 794-803, 2015. DOI: [10.1016/j.foodcont.2014.10.029](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.029)