

Modelado de cinética de liberación y potencial de control fúngico de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) encapsulado

Release kinetics modeling and fungal control potential of encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil

Muñoz-González, B. I.¹, Sandoval-Castilla, O.¹, Meléndez-Gómez, N. J.¹, Hahn-Schlam, F.², Valle-Guadarrama, S.^{1*}.

¹Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. México-Texcoco km 38.5, Chapingo, 56230, Texcoco de Mora, México. ²Departamento de Irrigación. Universidad Autónoma Chapingo. México-Texcoco km 38.5, Chapingo, 56230, Texcoco de Mora, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Muñoz-González, B. I., Sandoval-Castilla, O., Meléndez-Gómez, N. J., Hahn-Schlam, F., Valle-Guadarrama, S. (2022). Release kinetics modeling and fungal control potential of encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil. *Revista Bio Ciencias* 9, e1168. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1168>



ABSTRACT

Essential oils have antifungal properties and their volatilization can be controlled through encapsulation. The work aimed at controlling the release kinetics of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil through ionic gelation encapsulation to assess the potential of inhibiting the development of *Penicillium* spp. Thyme essential oil was encapsulated with sodium alginate (NaAlg; 0.5 and 1.0 %), calcium chloride (CaCl₂; 0.8 and 2.5 %), and different residence times in the calcium solution (10, 20, 40, and 60 min). Batches of capsules were placed in closed containers and volatilization was monitored. The release kinetics was modeled and evaluated through transient regime mass balances. Capsules had diameter and thickness between 2.16-2.81 and 0.20-0.46 mm, respectively. The best systems used AlgNa/

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: March 03rd 2021.

Accepted/Aceptado: April 26th 2022.

Available on line/Publicado: May 06th 2022.

RESUMEN

Los aceites esenciales tienen propiedades antifúngicas y su volatilización se puede controlar mediante encapsulado. El trabajo tuvo como objetivo controlar la cinética de liberación del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) mediante el encapsulado con gelación iónica para evaluar el potencial de inhibición del desarrollo de *Penicillium* spp. El aceite esencial de tomillo se encapsuló con alginato de sodio (NaAlg; 0.5 y 1.0 %), cloruro de calcio (CaCl₂; 0.8 y 2.5 %) y diferentes tiempos de residencia en la solución de calcio (10, 20, 40 y 60 min). Se colocaron lotes de cápsulas en recipientes cerrados y se controló la volatilización. La cinética de liberación se modeló y evaluó mediante balances de materia en régimen transitorio. Las cápsulas tuvieron diámetro y grosor entre 2.16-2.81 y 0.20-0.46 mm, respectivamente. Los mejores sistemas utilizaron AlgNa/CaCl₂ - 1.0/0.8 %, con residencia en la solución de calcio de 10 y 20 min, obteniendo eficiencias de encapsulado de 94.0 y 90.1 %, respectivamente. El hongo *Penicillium digitatum* se inhibió mediante la liberación controlada del aceite esencial.

*Corresponding Author:

Salvador Valle-Guadarrama. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. México-Texcoco km 38.5, Chapingo, 56230, Texcoco de Mora, México. E-mail: svalleg@taurus.chapingo.mx

CaCl₂ - 1.0/0.8 %, with residence in the calcium solution of 10 and 20 min, obtaining encapsulation efficiencies of 94.0 and 90.1 %, respectively. *Penicillium digitatum* was inhibited through the controlled release of the essential oil.

KEY WORDS

Antimicrobial agents; ionic gelation; mass balance; modeling.

Introduction

The postharvest life of horticultural products is frequently limited by rot due to fungal development (da Silva *et al.*, 2019). A specific case is given by the affectation of fruits such as apple (Heinmaa *et al.*, 2019) and citrus (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2020) by *Penicillium* spp., which may limit consumption and shelf life. The use of plant extracts can reduce microbial development (León-Fernández *et al.*, 2019). Among available alternatives, essential oils can be used to address such problems (Antonioli *et al.*, 2020; Perczak *et al.*, 2020). In particular, the use of a wide spectrum essential oil as that of thyme (*Thymus vulgaris*) may constitute an option against several fungal species (Reyes-Jurado *et al.*, 2019).

Essential oils (Eo) are liquid mixtures of volatile organic compounds, belonging mainly to the terpenes group. They have lipophilic character, strong aromatic properties, and their biosynthesis occurs as part of the secondary metabolism of some groups of plants, mainly through the mevalonic acid pathway (Rehman *et al.*, 2016). Terpenoids and phenylpropanoids are the main constituents of Eo, which provide them with a characteristic aroma and different biological properties (da Silva *et al.*, 2020). Also, they act as antimicrobial (Danzi *et al.*, 2020), and insecticidal agents (Benelli & Pavela, 2018). On this basis, Eo can be applied in food preservation (Fellenberg *et al.*, 2020), in alternative medicine, and in the therapeutic area (Rivera *et al.*, 2015).

In order to favor an adequate inhibitory effect, direct contact of the plant extract with the vegetable to be protected has been frequently recommended (Rusin *et al.*, 2021). In this regard, the essential oils have been used as part of biopolymeric coatings (Akhter *et al.*,

PALABRAS CLAVE

Agentes antimicrobianos; balance de materia; gelación iónica; modelado.

Introducción

La vida postcosecha de los productos hortofrutícolas se ve frecuentemente limitada por pudrición causada por hongos (da Silva *et al.*, 2019). Un caso específico se tiene en frutos como manzana (Heinmaa *et al.*, 2019) y cítricos (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2020) afectados por *Penicillium* spp., donde los hongos pueden limitar el consumo y la vida útil en postcosecha. El uso de extractos de plantas puede reducir el desarrollo microbiano (León-Fernández *et al.*, 2019). Entre las alternativas disponibles está el uso de aceites esenciales (Antonioli *et al.*, 2020; Perczak *et al.*, 2020). En particular, el uso de un aceite esencial de amplio espectro, como el de tomillo (*Thymus vulgaris*), puede ser una opción frente a diversas especies de hongos (Reyes-Jurado *et al.*, 2019).

Los aceites esenciales (Eo) son mezclas líquidas de compuestos orgánicos volátiles, pertenecientes principalmente al grupo de los terpenos. Tienen carácter lipofílico, fuertes propiedades aromáticas y su biosíntesis ocurre como parte del metabolismo secundario de algunos grupos de plantas, principalmente a través de la vía del ácido mevalónico (Rehman *et al.*, 2016). Los terpenoides y fenilpropanoides son los principales constituyentes de los Eo, los cuales les aportan un aroma característico y diferentes propiedades biológicas (da Silva *et al.*, 2020). Además, actúan como agentes antimicrobianos (Danzi *et al.*, 2020) e insecticidas (Benelli & Pavela, 2018). Sobre esta base, los Eo se pueden aplicar en la conservación de alimentos (Fellenberg *et al.*, 2020), en la medicina alternativa y en el área terapéutica (Rivera *et al.*, 2015).

Para favorecer un efecto inhibitorio adecuado, se recomienda frecuentemente un contacto directo del extracto vegetal con el material a proteger (Rusin *et al.*, 2021). En este sentido, los aceites esenciales se han usado como parte de recubrimientos biopoliméricos (Akhter *et al.*, 2019) para reducir el desarrollo microbiano (Naeem *et al.*, 2018). Sin embargo, estos materiales a menudo deben incluir un componente lipídico para reducir la permeabilidad al vapor de agua (Galus & Kadzińska, 2015), lo que limita la acción de los Eo debido a un efecto de disolución. Según Peretto

2019) to reduce microbial development (Naeem *et al.*, 2018). However, these materials must often include a lipid component to reduce permeability to water vapor (Galus & Kadzińska, 2015), which limits the action of the Eo due to a dissolution effect. According to Peretto *et al.* (2014), the controlled release of an Eo in the headspace of the system to be protected can cause greater inhibitory effect, which suggests that an encapsulated handling should be done.

Encapsulation consists of trapping one substance by another of polymeric nature (Zuidam & Shimoni, 2010). Among the advantages of encapsulation are the controlled release of such substance, the stability of active ingredients, increase of bioavailability, protection of the loaded ingredients from degradation, masking off-flavors, including bitterness and astringency of some ingredients, increasing of flavor and food safety, and improvement of stability against oxidation (Barroso *et al.*, 2021).

The essential oils are volatile at ambient conditions and can be degraded by oxygen. Therefore, it is necessary to increase the stability, the activity, and the volatilization rate, which can be attended through an encapsulation technique (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020). The ionic gelation by drip extrusion is a simple and efficient encapsulation method. The technique has low cost and low requirement of sophisticated equipment (Aceval *et al.*, 2019), which give it high potential to be part of a technology transfer strategy aimed at the use of essential oils. Ionic gelation is based on the use of anionic polymers such as sodium alginate which, when combined with calcium ions, induce the formation of a gel, which finally creates a capsule (Bušić *et al.*, 2018; Caporaso & Formisano, 2016) that traps the solution components. The controlled release of an encapsulated component constitutes one of the main goals of this practice and depends on the structure of capsules (Gorbunova *et al.*, 2018), including porosity (Bušić *et al.*, 2018), which may depend on the gelation time (González *et al.*, 2015). In this context, the work aimed at controlling the release kinetics of thyme essential oil through ionic gelation encapsulation to assess the potential of inhibiting the development of *Penicillium* spp.

Material y Methods

Chemical reagents

Calcium chloride (CaCl₂), ethanol (EtOH96),

et al. (2014), la liberación controlada de un Eo en el espacio de cabeza del sistema a proteger puede provocar un mayor efecto inhibitorio, lo que sugiere que se debe realizar un manejo encapsulado.

El encapsulado consiste en atrapar una sustancia con otra de naturaleza polimérica (Zuidam & Shimoni, 2010). Entre las ventajas del encapsulado se encuentran la liberación controlada de dicha sustancia atrapada, la estabilidad de los ingredientes activos, el aumento de la biodisponibilidad, la protección de los ingredientes de la degradación, el enmascaramiento de sabores desagradables, incluyendo el amargor y astringencia de algunos ingredientes, el mejoramiento del sabor y la seguridad alimentaria y la mejora de la estabilidad frente a la oxidación (Barroso *et al.*, 2021).

Los aceites esenciales son volátiles en condiciones ambientales y pueden degradarse con el oxígeno. Por tanto, es necesario incrementar la estabilidad, la actividad y la tasa de volatilización, lo que puede ser atendido mediante una técnica de encapsulado (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020). La gelación iónica por extrusión por goteo es un método de encapsulado sencillo y eficaz. La técnica tiene bajo costo y bajo requerimiento de equipos sofisticados (Aceval *et al.*, 2019), lo que le otorga un alto potencial para ser parte de una estrategia de transferencia de tecnología orientada al uso de aceites esenciales. La gelación iónica se basa en el uso de polímeros aniónicos como el alginato de sodio que, al combinarse con iones de calcio, inducen la formación de un gel, que finalmente crea una cápsula (Bušić *et al.*, 2018; Caporaso & Formisano, 2016) que atrapa los componentes de la solución. La liberación controlada de un componente encapsulado constituye uno de los principales objetivos de esta práctica y depende de la estructura de las cápsulas (Gorbunova *et al.*, 2018), incluida la porosidad (Bušić *et al.*, 2018), que puede depender del tiempo de gelación (González *et al.*, 2015). En este contexto, el trabajo tuvo como objetivo controlar la cinética de liberación de aceite esencial de tomillo mediante su encapsulado por gelación iónica para evaluar el potencial de inhibición del desarrollo de *Penicillium* spp.

Material y Métodos

Reactivos químicos

Los reactivos cloruro de calcio (CaCl₂), etanol (EtOH96), glutaraldehído, alginato de sodio (C₆H₇O₆Na;

glutaraldehyde, sodium alginate ($C_6H_7O_6Na$; AlgNa), and tween 80 were acquired with Reactivos Química Meyer S.A de C.V. Sodium cacodylate buffer ($(CH_3)_2AsO_2Na$) was acquired with Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V.

Ionic gelation encapsulation

Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil (Eo) provided by Laitz S.A. de C.V. (Mexico) was used. Eo was mixed with tween 80 at 1:1 ratio. Homogenization was applied with an Ultra-Turrax equipment (T25 basic, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) operated at 13,500 rpm during 4 min. Solutions of AlgNa were prepared at 0.5 and 1.0 % and solutions of $CaCl_2$ at 0.8 and 2.5 %. The Eo-tween mixture was combined with each of the AlgNa solutions to form emulsions with 2000 $mL\ m^{-3}$ Eo. The Eo-AlgNa emulsions were dropped into the $CaCl_2$ solutions, where residence was allowed for 10, 20, 40, and 60 min. At the end of each time, the formed capsules were washed twice by immersion in distilled water for 10 s to remove superficial calcium and they were stored in distilled water at 4 °C. Based on the combination of AlgNa/ $CaCl_2$ conditions, treatments 0.5/0.8, 0.5/2.5, 1.0/0.8, and 1.0/2.5 were formed with different gelation times. Capsules were evaluated in terms of diameter (D_c , mm) and wall thickness (T , mm) with a digital Vernier. The nucleus diameter (D_n , mm) was determined with Equation (1).

$$D_n = D_c - 2T$$

Essential oil release kinetics

A methodology was developed to evaluate essential oil concentration in emulsions. Solutions of Eo were prepared in ethyl alcohol 96° (EtOH96) in the range of 100 to 2000 $mL\ m^{-3}$ and absorbance at 275 nm was read with an UV-vis spectrophotometer (DR 500, HACH, Germany). A linear regression was applied and Equation (2) was obtained with a determination coefficient of 0.9993, where Abs is absorbance and C_{eo} is Eo concentration ($mL\ m^{-3}$).

$$C_{eo} = (130.28)(Abs) + 1.2806$$

Capsules were prepared as described above. From each treatment, 33 samples of capsules weighing between 1 and 3 g were formed and placed at 25 °C. At intervals of 12 h, until completing 120 h, capsule samples were removed from each treatment to evaluate

AlgNa) y tween 80 se adquirieron con Reactivos Química Meyer S.A de C.V. El buffer de cacodilato de sodio ($(CH_3)_2AsO_2Na$) se adquirió con Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V.

Encapsulado por gelación iónica

Se utilizó aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) (Eo) proporcionado por Laitz S.A. de C.V. (México). Se mezcló Eo con tween 80 en proporción 1:1. Se aplicó homogeneización con un equipo Ultra-Turrax (T25 basic, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) operado a 13,500 rpm durante 4 min. Se prepararon soluciones de AlgNa al 0.5 y 1.0 % y soluciones de $CaCl_2$ al 0.8 y 2.5 %. La mezcla de Eo-tween se combinó con cada una de las soluciones de AlgNa para formar emulsiones con 2000 $mL\ m^{-3}$ de Eo. Las emulsiones de Eo-AlgNa se vertieron en las soluciones de $CaCl_2$, donde se permitió residencia de 10, 20, 40 y 60 min. Al final de cada tiempo, las cápsulas formadas se lavaron dos veces por inmersión en agua destilada durante 10 s para eliminar el calcio superficial y se almacenaron en agua destilada a 4 °C. Con la combinación de las condiciones de AlgNa/ $CaCl_2$, se formaron los tratamientos 0.5/0.8, 0.5/2.5, 1.0/0.8 y 1.0/2.5 con diferentes tiempos de gelación. Las cápsulas se evaluaron en términos de diámetro (D_c , mm) y espesor de pared (T , mm) con un Vernier digital. Con esta información, se determinó el diámetro del núcleo (D_n , mm) con la Ecuación (1).

(1).

Cinética de liberación de aceite esencial

Se desarrolló una metodología para evaluar la concentración de aceite esencial en las emulsiones. Se prepararon soluciones de Eo en alcohol etílico de grado 96° (EtOH96) en el intervalo de 100 a 2000 $mL\ m^{-3}$ y se leyó absorbancia a 275 nm con un espectrofotómetro UV-vis (DR 500, HACH, Alemania). Se aplicó una rutina de regresión lineal y se obtuvo la Ecuación (2) con coeficiente de determinación de 0.9993, donde Abs es absorbancia y C_{eo} es Eo concentración de Eo ($mL\ m^{-3}$).

(2).

Se prepararon cápsulas con el procedimiento descrito anteriormente. De cada tratamiento, se formaron 33 muestras de cápsulas que pesaban entre 1 y 3 g y se colocaron a 25 °C. A intervalos de 12 h y hasta completar 120 h, se retiraron muestras de cápsulas de cada tratamiento

Eo content. Each sample was ground in the Ultra Turrax equipment for 5 min at 13,500 rpm in 40 mL EtOH96. The system was allowed to settle, the liquid absorbance was measured at 275 nm, the concentration of Eo was quantified with Equation (2), and the volume of Eo (V_{eo} , m^3) was evaluated with Equation (3), which was divided by the initial mass of capsules (m_c , kg) to obtain a nominal concentration (C_{nom} , $m^3 kg^{-1}$) for each time (Equation 4).

$$(V_{eo}) = C_{eo}/(25 \times 10^9)$$

$$C_{nom} = V_{eo}/m_c \quad (4)$$

Data were fitted to Equation (5) using the software Sigma Plot (SPSS Inc., 2000) and the resulting model was derived with respect to time (Equation 6), where k_1 ($m^3 kg^{-1}$), k_2 ($m^3 kg^{-1}$), and k_3 (s^{-1}) are regression constants, t is time (s) and dC_{nom}/dt is essential oil release rate ($m^3 s^{-1}$).

$$C_{nom} = k_1 + k_2[1 - \exp(-k_3(t))] \quad (5)$$

$$\frac{dC_{nom}}{dt} = k_2 k_3 \exp(-k_3 t) \quad (6)$$

A container of volume V_r (m^3) was considered with a mass of capsules (m_c , kg) inside. A transient mass balance for essential oil took the form of Equation (7), where $(\dot{m}_{eo})_i$ and $(\dot{m}_{eo})_o$ are input and output mass flows ($kg s^{-1}$) of essential oil to the recipient headspace (Hs).

$$(\dot{m}_{eo})_i - (\dot{m}_{eo})_o = \frac{d(m_{eo})_r}{dt} \quad (7)$$

Container hermetic conditions were accepted, which allowed the output flow to be considered null [$(\dot{m}_{eo})_o = 0$]. Equation (8) was obtained by dividing Equation (7) by the density of the essential oil (ρ_{eo} , $kg m^{-3}$), where $(\dot{m}_{eo})_r$ is mass of essential oil in Hs (kg) and $(\dot{V}_{eo})_i$ is essential oil input flow ($m^3 s^{-1}$).

$$(\dot{V}_{eo})_i = \frac{(\dot{m}_{eo})_i}{\rho_{eo}} = \frac{d(\frac{m_{eo}}{\rho_{eo}})_r}{dt} \quad (8)$$

The right side of Equation (8) describes the variation of the essential oil volume inside the recipient (Equation 9) and, after the division of both sides by the container volume Equation (10) was obtained, where $(V_{eo})_r$ (m^3)

para evaluar el contenido de Eo. Cada muestra fue molida con equipo Ultra Turrax durante 5 min a 13,500 rpm en 40 mL de EtOH96. Se dejó sedimentar el sistema, se midió la absorbancia del líquido a 275 nm, se cuantificó la concentración de Eo con la Ecuación (2) y se evaluó el volumen de Eo (V_{eo} , m^3) con la Ecuación (3), que se dividió por la masa inicial de cápsulas (m_c , kg) para obtener una concentración nominal (C_{nom} , $m^3 kg^{-1}$) para cada tiempo (Ecuación 4).

(3).

Los datos se ajustaron a la Ecuación (5) utilizando el software Sigma Plot (SPSS Inc., 2000) y el modelo resultante se derivó con respecto al tiempo (Ecuación 6), donde k_1 ($m^3 kg^{-1}$), k_2 ($m^3 kg^{-1}$) y k_3 (s^{-1}) son constantes de regresión, t es el tiempo (s) y dC_{nom}/dt es tasa de liberación de aceite esencial ($m^3 s^{-1}$).

Se consideró un recipiente de volumen V_r (m^3) con una masa de cápsulas (m_c , kg) en su interior. Un balance transitorio de masa para el aceite esencial tomó la forma de la Ecuación (7), donde $(\dot{m}_{eo})_i$ y $(\dot{m}_{eo})_o$ son flujos máxicos de entrada y salida ($kg s^{-1}$), respectivamente, de aceite esencial al espacio de cabeza del recipiente (Hs).

(7).

Se aceptaron condiciones herméticas en el contenedor, lo que permitió tener nulo caudal de salida [$(\dot{m}_{eo})_o = 0$]. La Ecuación (8) se obtuvo dividiendo la Ecuación (7) por la densidad del aceite esencial (ρ_{eo} , $kg m^{-3}$), donde $(\dot{m}_{eo})_r$ es la masa de aceite esencial en Hs del recipiente (kg) y $(\dot{V}_{eo})_i$ es el flujo de entrada de aceite esencial ($m^3 s^{-1}$).

El lado derecho de la Ecuación (8) describe la variación del volumen de aceite esencial dentro del recipiente (Ecuación 9) y, después de dividir ambos lados por el volumen del recipiente (V_r) se obtuvo la Ecuación (10), donde $(V_{eo})_r$ (m^3) se obtuvo

was obtained as $(m_{eo}/\rho_{eo})_r$ and X_{eo} is essential oil concentration in headspace (volume fraction).

como $(m_{eo}/\rho_{eo})_r$ y X_{eo} es la concentración de aceite esencial en el espacio de cabeza (fracción de volumen).

$$(\dot{V}_{eo})_i = \frac{d(V_{eo})_r}{dt} \quad (9).$$

$$\frac{(\dot{V}_{eo})_i}{V_r} = \frac{d(V_{eo}/V_r)_r}{dt} \rightarrow \frac{(\dot{V}_{eo})_i}{V_r} = \frac{d(x_{eo})_r}{dt} \quad (10).$$

The essential oil that was incorporated into the headspace came from capsules placed in the container. Thus, the product of essential oil concentration change of capsules and the mass of capsules (m_c) placed in the container described the magnitude of the input flow of essential oil $(\dot{V}_{eo})_i$, as shown by Equation (11), where the negative sign indicates that the loss of essential oil in the capsules constitutes gain in the headspace.

El aceite esencial que se incorporó al espacio de cabeza provino de cápsulas colocadas en el recipiente. Así, el producto del cambio de concentración de aceite esencial de las cápsulas y la masa de las cápsulas (m_c) colocadas en el recipiente describió la magnitud del flujo de entrada de aceite esencial $(\dot{V}_{eo})_i$, como se muestra en la Ecuación (11), donde el signo negativo indica que la pérdida de aceite esencial en las cápsulas constituye una ganancia en el espacio de cabeza.

$$(\dot{V}_{eo})_i = m_c \left(-\frac{dC_{nom}}{dt} \right) \quad (11).$$

The substitution of Equation (11) into Equation (10) resulted in Equation (12) and the consideration of Equation (6) in Equation (12) resulted in Equation (13), which constituted the transient mass balance of the essential oil in the container headspace over time, where $d(x_{eo})_r/dt$ is the variation of essential oil concentration inside the container ($\text{mL m}^{-3} \text{s}^{-1}$) and the constant 10^6 is a unit's conversion factor.

La sustitución de la Ecuación (11) en la Ecuación (10) resultó en la Ecuación (12). Asimismo, la consideración de la Ecuación (6) en la Ecuación (12) resultó en la Ecuación (13), que constituyó el balance de masa transitorio del aceite esencial en el espacio de cabeza del contenedor a lo largo del tiempo, donde $d(x_{eo})_r/dt$ es la variación de la concentración de aceite esencial dentro del contenedor ($\text{mL m}^{-3} \text{s}^{-1}$) y la constante 10^6 es un factor de conversión de unidades.

$$\left(\frac{m_c}{V_r} \right) \left(-\frac{dC_{nom}}{dt} \right) = \frac{d(x_{eo})_r}{dt} \quad (12).$$

$$\frac{d(x_{eo})_r}{dt} = (10^6) \left(\frac{m_c}{V_r} \right) [-k_2 k_3 \exp(-k_3 t)] \quad (13).$$

Equation (13) was solved with the Fourth Order Runge-Kutta method (Burden & Faires, 2010) and results were fitted to models with the form of Equation (14) to facilitate the analysis, where k_4 (mL m^{-3}) and k_5 (s^{-1}) are regression constants, and x_{eo} is essential oil concentration (mL m^{-3}). Values of k_4 and k_5 were subjected to analysis of variance and treatment means comparison routines with the Tukey test, with a significance level of 0.05.

La Ecuación (13) se resolvió con el método de Runge-Kutta de cuarto orden (Burden & Faires, 2010) y los resultados se ajustaron a modelos con la forma de la Ecuación (14) para facilitar el análisis, donde k_4 (mL m^{-3}) y k_5 (s^{-1}) son constantes de regresión y x_{eo} es la concentración de aceite esencial (mL m^{-3}). Los valores de k_4 y k_5 fueron sometidos a análisis de varianza y rutinas de comparación de medias de tratamiento con la prueba de Tukey, con nivel de significancia de 0.05.

$$x_{eo} = k_4 [1 - \exp(-k_5 t)] \quad (14).$$

Encapsulation efficiency

AlgNa/CaCl₂ treatments corresponding to 0.5/0.8 and 1.0/0.8 were selected to evaluate the encapsulation efficiency. Samples of capsules of 1 g were crushed in the Ultra-Turrax equipment for 5 min at 13,500 rpm and mixed with 40 mL EtOH96. After settling, absorbance was measured at 275 nm in the liquid with an UV-vis spectrophotometer (DR 500, HACH, Germany) and the theoretical concentration of essential oil (Ct) was determined with Equation (2). A second set of capsules weighing 1 g was sampled and rapidly washed in 40 mL EtOH96, but without trituration. Absorbance was measured and the superficial oil concentration (Cs) was evaluated. The encapsulation efficiency (η , %) was evaluated with Equation (15).

$$\eta = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100 \quad (15).$$

Microscopic structure

The structure of capsules was observed using a Jeol Scanning Electron Microscope (JMS-035; Jeol Ltd., Akishima, Japan). Capsules were fixed with 3 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for 24 h. The liquid was withdrawn and two additional washes with cacodylate buffer were carried out. Then, gradual dehydration was carried out with sequential washes in ethanol between 30 and 100 %. Drying at critical point was performed, a gold coating was applied, and samples were observed in the scanning electron microscope at 15,000x.

Evaluation of fungal inhibition

Orange fruits with fungal development were obtained from a local market. The contaminating fungus was sampled, incubated in Petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA) culture medium, and observed with an optical microscope to identify the species that were present. The fungus *Penicillium digitatum* was selected as a working model. Samples of such fungus were placed in immersion in 1 L of sterilized distilled water and successive dilutions were made up to 10⁻⁵. PDA culture media were prepared in Petri dishes and these were inoculated at the center with the microbial dilution with bacteriological loop. The plates were individually placed in closed 1 L containers. The AlgNa/CaCl₂ treatment corresponding to 1.0/0.8 with immersion of 10 min was used to conduct fungal inhibition tests. Samples of 1.0, 1.5, or 2.0 g were placed in felt bags inside the containers, together with the Petri dishes. A Control treatment was established with Petri dishes not exposed to the essential oil. Fungal growth was observed on the plates for five days.

Eficiencia de encapsulado

Se seleccionaron tratamientos AlgNa/CaCl₂ correspondientes a 0.5/0.8 y 1.0/0.8 para evaluar la eficiencia de encapsulado. Se trituraron muestras de cápsulas de 1 g en el equipo Ultra-Turrax durante 5 min a 13,500 rpm y se mezclaron con 40 mL de EtOH96. Después de la sedimentación, se midió la absorbancia a 275 nm en el líquido con un espectrofotómetro UV-vis (DR 500, HACH, Alemania) y se determinó la concentración teórica de aceite esencial (Ct) con la Ecuación (2). Se formó un segundo conjunto de cápsulas con peso de 1 g y se lavó rápidamente en 40 mL de EtOH96, pero sin trituration. Se midió la absorbancia y se evaluó la concentración superficial de aceite esencial (Cs). La eficiencia de encapsulación (η , %) se evaluó con la Ecuación (15).

Estructura microscópica

La estructura de las cápsulas se observó usando un microscopio electrónico de barrido Jeol (JMS-035; Jeol Ltd., Akishima, Japón). Las cápsulas se fijaron con glutaraldehído al 3 % en buffer de cacodilato 0.1 M durante 24 h. Se extrajo el líquido y se llevaron a cabo dos lavados adicionales con buffer de cacodilato. Luego, se realizó una deshidratación gradual con lavados secuenciales en etanol entre 30 y 100 %. Se realizó un secado en el punto crítico, se aplicó una capa de oro y las muestras se observaron en el microscopio electrónico de barrido a 15,000x.

Evaluación de inhibición fúngica

Se obtuvieron frutos de naranja con desarrollo fúngico en un mercado local. Se muestreó el hongo contaminante, se incubó en placas de Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y se observó con un microscopio óptico para identificar las especies presentes. El hongo *Penicillium digitatum* fue seleccionado como modelo de trabajo. Muestras de dicho hongo se colocaron en inmersión en 1 L de agua destilada esterilizada y se realizaron sucesivas diluciones hasta 10⁻⁵. Se prepararon medios de cultivo PDA en placas de Petri y se inocularon en el centro con la dilución microbiana mediante asa bacteriológica. Las placas se colocaron individualmente en recipientes cerrados de 1 L. Se utilizó el tratamiento AlgNa/CaCl₂ correspondiente a 1.0/0.8 con inmersión de 10 min para realizar las pruebas de inhibición fúngica. Se colocaron muestras de 1.0, 1.5 ó 2.0 g en bolsas de fieltro dentro de los contenedores, junto con las placas de Petri. Se estableció un tratamiento Control con placas de Petri no expuestas al aceite esencial. Se observó crecimiento de hongos en las placas durante cinco días.

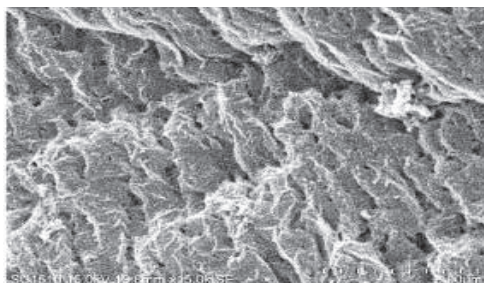
Data analysis

Behaviors of the essential oil encapsulation and release kinetics were evaluated considering three variation factors: the concentration of sodium alginate, with two levels (0.5 and 1.0 %), the concentration of calcium chloride, with two levels (0.8 and 2.5 %), and the immersion time in the solutions, with four levels (10, 20, 40, and 60 min). Data were subjected to analysis of variance, complemented with mean comparison routines applied with the Tukey's test, performed with a significance level of 0.5. All evaluations were carried out in triplicate.

Results and Discussion

Physical characteristics of capsules

Capsules of thyme essential oil were formed through ionic gelation with AlgNa and CaCl₂. Chains of D-mannuronic and L-guluronic acids interacted with calcium ions and formed a gel with a reticular structure (Ching *et al.*, 2017). When the AlgNa-Eo emulsion fell into the CaCl₂ solution, there was instantaneous gelation at the interface, which allowed the encapsulation of the Eo. Over time, the calcium ions diffused into each droplet and interacted with the AlgNa (Lee & Mooney, 2012). Gelation occurred by a cooperative union of calcium ions with residues of guluronic acid involving their dimerization. With the addition of calcium, the alignment of two opposite chains of guluronic acid with a hydrophilic cavity was induced and favored the union with calcium ions using oxygen atoms of the carboxylic groups, resulting in egg-box structures (Ching *et al.*, 2017). Scanning electron microscope observation showed several layers of alginate from the outside to the inside, which was not very evident with low gelation times, but it was very noticeable with longer times



Análisis de datos

Se evaluó el comportamiento de las cinéticas de encapsulado y liberación del aceite esencial considerando tres factores de variación: la concentración de alginato de sodio, con dos niveles (0.5 y 1.0 %), la concentración de cloruro de calcio, con dos niveles (0.8 y 2.5 %), y el tiempo de inmersión en las soluciones, con cuatro niveles (10, 20, 40 y 60 min). Los datos fueron sometidos a análisis de varianza, complementado con rutinas de comparación de medias aplicadas con la prueba de Tukey, realizada con un nivel de significancia de 0.5. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

Resultados y discusión

Características físicas de cápsulas

Se formaron cápsulas de aceite esencial de tomillo mediante gelación iónica con AlgNa y CaCl₂. En este proceso, las cadenas de los ácidos D-manurónico y L-gulurónico interactuaron con iones de calcio y formaron un gel con estructura reticular (Ching *et al.*, 2017). Cuando la emulsión de AlgNa-Eo cayó en la solución de CaCl₂, hubo una gelación instantánea en la interfase, lo que permitió el encapsulado del Eo. Con el tiempo, los iones de calcio se difundieron en cada gota e interactuaron con el AlgNa (Lee & Mooney, 2012). La gelación se produjo por la unión cooperativa de iones de calcio con residuos de ácido gulurónico que implican su dimerización. Con la adición de calcio, se indujo el alineamiento de dos cadenas opuestas de ácido gulurónico con una cavidad hidrofílica y se favoreció la unión con iones calcio utilizando átomos de oxígeno de los grupos carboxílicos, dando como resultado estructuras de caja de huevos (Ching *et al.*, 2017). La observación a través del microscopio electrónico de barrido mostró varias capas de alginato desde el exterior hacia el interior, lo cual fue poco evidente con tiempos de gelación bajos, pero muy notorio con tiempos más largos (Figura 1).

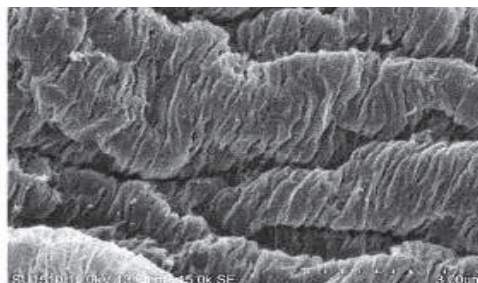


Figure 1. Structure of capsules obtained with ionic gelation from sodium alginate and calcium chloride solutions, with residence times in the calcium solution of 10 (left) and 20 min (right).

Figura 1. Estructura de cápsulas obtenidas con gelación iónica a partir de soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio, con tiempos de residencia en la solución de calcio de 10 (izquierda) y 20 min (derecha).

(Figure 1). Consistent with the report of Bušić *et al.* (2018), high porosity was found.

The capsules had a diameter in the range of 2.16 to 2.81 mm, similarly to that obtained by Aceval *et al.* (2019). Likewise, they had thickness between 0.20 and 0.46 mm and both dimensions were affected by the composition of the gelation system and by the residence time in the CaCl_2 solution (Figure 2). The increase in AlgNa favored larger encapsulation diameters. Due to the polymeric nature of such compound, the increase in concentration

En forma congruente con el reporte de Bušić *et al.* (2018), se encontró una alta porosidad.

Las cápsulas tuvieron diámetro en el rango de 2.16 a 2.81 mm, en forma similar a lo obtenido por Aceval *et al.* (2019). Asimismo, tuvieron espesores entre 0.20 y 0.46 mm y ambas dimensiones se vieron afectadas por la composición del sistema de gelación y por el tiempo de residencia en la solución de CaCl_2 (Figura 2). El aumento de AlgNa favoreció diámetros de encapsulado más grandes. Debido a la naturaleza polimérica de este compuesto,

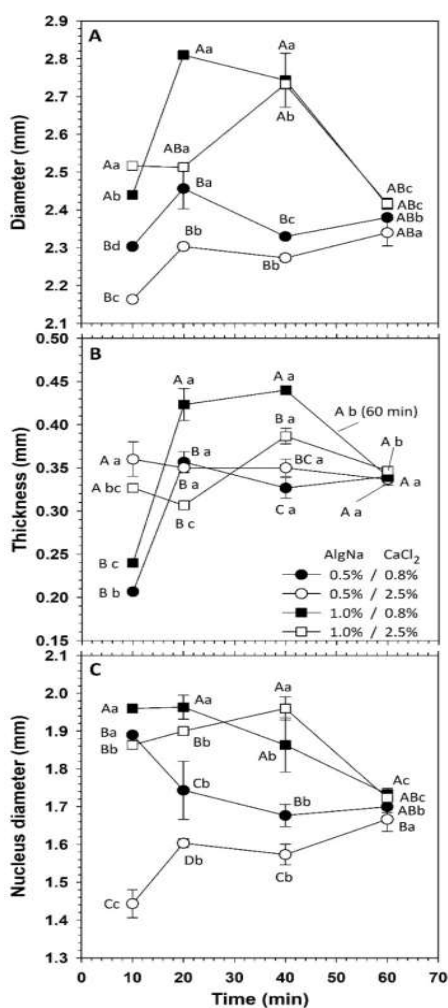


Figure 2. Dimensions of capsules prepared through ionic gelation. Equal capital letters indicate non-significant difference between means at the same time. Equal lowercase letters indicate non-significant difference between means within a treatment. Error bars indicate standard deviations.

Figura 2. Dimensiones de cápsulas preparadas por gelación iónica. Letras mayúsculas iguales indican diferencia no significativa entre medias del mismo tiempo. Letras minúsculas iguales indican diferencia no significativa entre medias dentro de un mismo tratamiento. Las barras de error indican desviaciones estándar.

caused higher viscosity, which caused a larger droplet size at the outlet of the dosing elements. Likewise, the capsule diameter tended to increase with higher concentration of CaCl_2 , but the contrast was significant only with residence times greater than 10 min.

Although gelation occurs instantaneously, the calcium ions diffuse inwards as time passed, causing a larger capsule size (Ching *et al.*, 2017). However, the time in the calcium solution affected the diameter of capsules in different manner. With 0.5 % AlgNa, the diameter remained in the range of 2.16 to 2.45 mm and, although with immersion of 20 min values were higher, the contrast was considered moderate.

With 1.0 % of AlgNa, the residence time caused increase in diameter with the transition from 10 to 20-40 min of immersion, but a reduction in size was observed with 60 min. With long residence times, the capsules reached a homogeneous size, independently of the composition, with an average value of 2.39 (± 0.04) mm at 60 min and, although the contrast with respect to 10-min immersion was significant ($p \leq 0.05$), the difference only varied within 2.55-5.67 %.

In the case of thickness, encapsulation with 2.5 % CaCl_2 caused values of 0.34 (± 0.03) mm, with no significant difference between different times, which suggested that, from the first contact of AlgNa with calcium ions, the gel membrane properties were not affected by additional residence times. On the other hand, with 0.8 % CaCl_2 , the thickness varied within 0.20-0.24 mm with 10 min immersion and between 0.35 and 0.44 mm with times of 20-40 min.

The procedure used corresponded to a direct gelation and the thickness of the membrane capsule is proportional to the reaction time in the calcium bath (Caporaso & Formisano, 2016), so the development of the capsule must be stopped by removing the spheres from the solution. Although this coincided with the systems with 0.8 % CaCl_2 , it was not observed with 2.5 % concentration. However, similarly to the diameter, with a time of 60 min, the thickness tended to a homogeneous value of 0.34 (± 0.01) mm in all systems, without significant difference between them (Figure 2B).

The time of 60 min was the longest period evaluated at work. As time passes, the porosity of the capsular membrane decreases due to a greater polymer crosslinking

el aumento de concentración provocó mayor viscosidad, lo que provocó un tamaño de gota mayor en la salida de los elementos dosificadores. Asimismo, con mayor concentración de CaCl_2 , el diámetro de cápsula tendió a aumentar, pero el contraste fue significativo sólo con tiempos de residencia superiores a 10 min.

Aunque la gelación ocurre instantáneamente, los iones de calcio se difunden hacia adentro a medida que pasa el tiempo, lo que provoca un tamaño de cápsula más grande (Ching *et al.*, 2017). Sin embargo, el tiempo en la solución de calcio afectó al diámetro de las cápsulas de diferente manera. Con 0.5 % de AlgNa, el diámetro se mantuvo en el rango de 2.16 a 2.45 mm y, aunque con inmersión de 20 min los valores fueron mayores, el contraste se consideró moderado.

Con 1.0 % de AlgNa, el tiempo de residencia provocó un aumento de diámetro con la transición de 10 a 20-40 min de inmersión, pero se observó una reducción de tamaño con 60 min. Con tiempos de residencia prolongados, las cápsulas alcanzaron un tamaño homogéneo independientemente de la composición, con valor medio de 2.39 (± 0.04) mm a los 60 min y, aunque el contraste con respecto a la inmersión de 10 min fue significativo ($p \leq 0.05$), la diferencia sólo varió entre 2.55 y 5.67 %.

En el caso del espesor, el encapsulado con CaCl_2 al 2.5 % provocó valores de 0.34 (± 0.03) mm, sin diferencia significativa entre diferentes tiempos, lo cual sugirió que, desde el primer contacto del AlgNa con iones calcio, las propiedades de la membrana del gel no se vieron afectadas por tiempos de residencia adicionales. Por otro lado, con CaCl_2 al 0.8 %, el espesor varió entre 0.20 y 0.24 mm con 10 min de inmersión y entre 0.35 y 0.44 mm con tiempos de 20-40 min.

El procedimiento utilizado correspondió a una gelación directa, donde el espesor de la membrana de la cápsula es proporcional al tiempo de reacción en el baño de calcio (Caporaso & Formisano, 2016), por lo que se debe detener el desarrollo de las cápsulas retirando las esferas de la solución. Aunque esto coincidió con los sistemas con 0.8 % de CaCl_2 , no se observó con una concentración de 2.5 %. Sin embargo, de manera similar al diámetro, con un tiempo de 60 min, el espesor tendió a un valor homogéneo de 0.34 (± 0.01) mm en todos los sistemas, sin diferencia significativa entre ellos (Figura 2B).

El tiempo de 60 min fue el período más largo evaluado en el trabajo. A medida que pasó el tiempo, la porosidad de la membrana capsular disminuye debido a una mayor reticulación del polímero con los iones calcio, lo

with calcium ions, which might have caused contraction and even matrix dehydration due to the expulsion of water.

The behavior with 0.8 % CaCl_2 suggested that, depending on composition, it is feasible to control the diameter and the thickness of capsules. Based on this result, mixtures with that concentration of CaCl_2 were selected to evaluate the behavior of the encapsulation systems. However, as the capsule structure is not rigid and changes with the interaction between ions, a more stable state is reached as time advances, ceasing the dependency to the system composition.

On the other hand, the amount of trapped oil is determined by the dimensions of the capsule core. The Dn lowest values were found in the 0.5/2.5 AlgNa/ CaCl_2 system, followed, in ascending order, by that of 0.5/0.8, and finally by those of 1.0/2.5 and 1.0/0.8 systems (Figure 2C). This suggested that the concentration of sodium alginate, acting as a wall component, determined the amount of encapsulated oil. The highest contents of essential oil were obtained in the 1.0/0.8-AlgNa/ CaCl_2 system, with immersion time of 10 min derived of a small thickness in a moderate diameter, and with 20 min, which was associated with large thickness in a large diameter capsule.

que podría haber provocado la contracción e incluso la deshidratación de la matriz por expulsión de agua.

El comportamiento con CaCl_2 al 0.8 % sugirió que, dependiendo de la composición, es factible controlar el diámetro y el espesor de las cápsulas. Con base en este resultado, se seleccionaron mezclas con esa concentración de CaCl_2 para evaluar el comportamiento de los sistemas de encapsulado de aceites esenciales. Sin embargo, como la estructura de la cápsula no es rígida y cambia con la interacción entre iones, se alcanza un estado más estable a medida que avanza el tiempo, dejando de depender de la composición del sistema.

Por otro lado, la cantidad de aceite atrapado está determinada por las dimensiones del núcleo de la cápsula. Los valores más bajos de Dn se encontraron en el sistema 0.5/2.5 AlgNa/ CaCl_2 , seguido en orden ascendente por los del sistema 0.5/0.8 y, finalmente, por los de los sistemas de alginato de sodio, actuando como componente de la pared, determinó la cantidad de aceite encapsulado. Los mayores contenidos de aceite esencial se obtuvieron en el sistema 1.0/0.8-AlgNa/ CaCl_2 , con un tiempo de inmersión de 10 min derivado de un espesor pequeño en un diámetro moderado, y también con 20 min, lo que se asoció con un espesor grande en un diámetro grande de la cápsula.

Table 1.
Encapsulation efficiency through ionic gelation based on sodium alginate at 0.5 and 1.0 % and CaCl_2 at 0.8 % with different residence times in the calcium solution.

Tabla 1.
Eficiencia de encapsulado por gelación iónica a base de alginato de sodio al 0.5 y 1.0 % y CaCl_2 al 0.8 % con diferentes tiempos de residencia en la solución de calcio.

System AlgNa/ CaCl_2	t (min)	η (%)	System AlgNa/ CaCl_2	t (min)	η (%)
0.5 %/0.8 %	10	92.95 ^b (2.16)	1.0 %/0.8 %	10	94.01 ^{ab} (1.89)
	20	88.23 ^d (1.64)		20	90.13 ^{cd} (2.08)
	40	90.71 ^c (1.95)		40	92.29 ^{cd} (1.56)
	60	93.67 ^{ab} (2.01)		60	95.18 ^a (1.85)
HSD		2.12			

The symbols t and η indicate the residence time in the calcium solution and the encapsulation efficiency, respectively. Equal letters indicate non-significant difference. HSD is honest significant difference (Tukey, 0.05). Values in parentheses correspond to standard deviations.

La notación t y η indica el tiempo de residencia en la solución de calcio y la eficiencia de encapsulación, respectivamente. Letras iguales indican diferencia no significativa. HSD es diferencia significativa honesta (Tukey, 0.05). Los valores entre paréntesis corresponden a desviaciones estándar.

Systems based on the 0.8 % CaCl_2 solution were evaluated in terms of encapsulation efficiency (η). The average values varied in the range of 88.2 to 95.2 %, which indicated that between 4.8 and 11.8 % of Eo remained in the superficial region of capsules and not in the core, despite this, a good encapsulation degree was accepted. The comparison of efficiencies between similar times showed that there was no significant difference ($p > 0.05$) between systems with 0.5 or 1.0 % of AlgNa. However, in both cases, the efficiency decreased with the transition from 10 to 20-40 min of residence in the calcium solution and then increased again with 60 min of immersion ($p \leq 0.05$) (Table 1). This behavior coincided with the variation of capsule dimensions, thus the hypothesis that the structure tended to a more stable state with residence time was strengthened, which favored the retention of essential oil in the nuclear zone. In this regard, Moura *et al.* (2018) pointed out that there is an inverse relationship between the efficiency and the dimensions of the capsules.

Kinetics of essential oil release

The release of the essential oil from the capsules had a logarithmic behavior and data were properly fitted to Equation (14), with determination coefficients higher than 0.99 in all cases. Thus, the increase in concentration in the headspace of containers occurred rapidly at the beginning and thereafter the rate of change gradually slowed down, so the presence of Eo tended to a constant value (Figure 3). This behavior was due to the release of Eo was

Los sistemas basados en la solución de CaCl_2 al 0.8 % se evaluaron en términos de eficiencia de encapsulado (η). Los valores medios variaron en el rango de 88.2 a 95.2 %, lo que indicó que entre 4.8 y 11.8 % de Eo permaneció en la región superficial de las cápsulas y no en el núcleo de las mismas, pero, a pesar de ello, se aceptó un buen grado de encapsulado. La comparación de eficiencias entre tiempos similares mostró que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre sistemas con 0.5 ó 1.0 % de AlgNa. Sin embargo, en ambos casos, la eficiencia disminuyó con la transición de 10 a 20-40 min de residencia en la solución de calcio y luego aumentó nuevamente con 60 min de inmersión ($p \leq 0.05$) (Tabla 1). Este comportamiento coincidió con la variación de dimensiones de la cápsula, por lo que se fortaleció la hipótesis de que la estructura tendió a un estado más estable con el tiempo de residencia, lo que favoreció la retención de aceite esencial en la zona nuclear. Al respecto, De Moura *et al.* (2018) señalaron que existe una relación inversa entre la eficiencia y las dimensiones de las cápsulas.

Cinética de liberación de aceite esencial

La liberación del aceite esencial de las cápsulas tuvo un comportamiento logarítmico y los datos se ajustaron bien a la Ecuación (14), con coeficientes de determinación superiores a 0.99 en todos los casos. Por lo tanto, el aumento de concentración en el espacio de cabeza de los contenedores se produjo rápidamente al principio y, a partir de entonces, la tasa de cambio disminuyó gradualmente, por lo que la presencia de Eo tendió a un valor constante (Figura 3). Este comportamiento se debió a que la liberación de Eo se

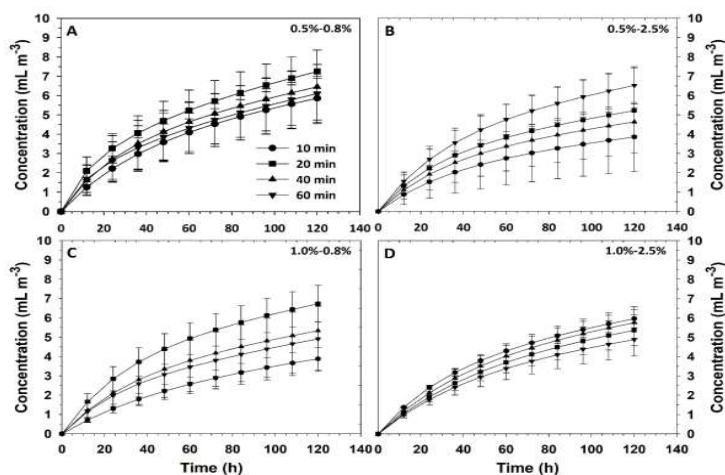


Figure 3. Thyme essential oil release kinetics affected by the composition of AlgNa- CaCl_2 systems and the immersion time in the calcium solution.

Figura 3. Cinética de liberación del aceite esencial de tomillo afectada por la composición de los sistemas AlgNa- CaCl_2 y el tiempo de inmersión en la solución de calcio.

carried out in a closed container and, over time, the concentration gradient between the interior of the capsules and the headspace was gradually reduced, thereby also reducing the release. However, if release develops in systems with higher dimensions such as a greenhouse, it shall be more important the evaluation of the concentration change as a function of the distance from the liberation point.

The constant k_4 of Equation (14) represents the maximum concentration that can be reached in the container after a long release time and was not affected by the composition of AlgNa solution, but it was affected by that of CaCl_2 , where the highest values were found with 0.8 % and the lowest with 2.5 % concentration (Table 2), although the average difference was less than 1.2 mL m^{-3} . On the other hand, as the immersion time in the calcium solution increased, the maximum concentration reached in the headspace tended to be higher. However, the contrast was significant only between 10- and 60-min of immersion times, but it was considered without practical importance due to the difference was less than 1.3 mL m^{-3} .

The constant k_5 (s^{-1}) represents an essential oil release coefficient and expresses the rate of change of concentration in the container per unit of concentration gradient between the interior of capsules and the headspace. The constant k_5 was affected by both, the composition of AlgNa and CaCl_2 solutions. The highest values were obtained with the lowest concentrations of such compounds. Likewise, k_5 had the lowest value with an immersion time of 10 min, but the highest value was found at 20 min (Table 2).

Although the constant k_4 indicates the maximum concentration to be reached in the headspace, the constant k_5 is associated with the required time to reach certain concentration. Based on Equation (14), some characteristic release times can be obtained (Equation 16), where $t_{1/2}$ is the mean essential oil release time (h), while $t_{7/8}$ and $t_{0.99}$ are required times (h) to reach 87.5 and 99 % of the maximum concentration, respectively.

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_5} \ln 2; \quad t_{7/8} = \frac{1}{k_5} \ln 8; \quad t_{0.99} = \frac{1}{k_5} \ln 100$$

llevó a cabo en un recipiente cerrado y, con el tiempo, el gradiente de concentración entre el interior de las cápsulas y el espacio de cabeza se fue reduciendo gradualmente, reduciéndose también la liberación. Sin embargo, si la liberación se desarrolla en sistemas de mayores dimensiones, como un invernadero, será más importante la evaluación del cambio de concentración en función de la distancia desde el punto de liberación.

La constante k_4 de la Ecuación (14) representa la concentración máxima que se puede alcanzar en el recipiente luego de un tiempo largo de liberación y no fue afectada por la composición de la solución de AlgNa, pero sí por la de CaCl_2 , donde se encontraron los valores más altos con 0.8 % y los menores con 2.5 % de concentración (Tabla 2), aunque la diferencia promedio fue menor a 1.2 mL m^{-3} . Por otro lado, a medida que aumentó el tiempo de inmersión en la solución de calcio, la concentración máxima alcanzada en el espacio de cabeza tendió a ser mayor, pero el contraste fue significativo sólo entre 10 y 60 min de tiempos de inmersión, en tanto que la diferencia fue menor a 1.3 mL m^{-3} y se consideró sin importancia práctica.

La constante k_5 (s^{-1}) representa un coeficiente de liberación de aceite esencial y expresa la tasa de cambio de concentración en el recipiente por unidad de gradiente de concentración entre el interior de las cápsulas y el espacio de cabeza. La constante k_5 se vio afectada tanto por la composición de la solución de AlgNa como por la de CaCl_2 . Los valores más altos se obtuvieron con las concentraciones más bajas de dichos compuestos. Asimismo, k_5 tuvo el valor más bajo con un tiempo de inmersión de 10 min, pero el valor más alto se encontró a los 20 min (Tabla 2).

Aunque la constante k_4 indica la concentración máxima a alcanzar en el espacio de cabeza, la constante k_5 está asociada con el tiempo requerido para alcanzar cierta concentración. Con base en la Ecuación (14), se pueden obtener algunos tiempos de liberación característicos (Ecuación 16), donde $t_{1/2}$ es el tiempo medio de liberación del aceite esencial (h), mientras que $t_{7/8}$ y $t_{0.99}$ son tiempos requeridos (h) para alcanzar 87.5 y 99 % de la concentración máxima, respectivamente.

Table 2.
Time and kinetics constant average values for different essential oil concentrations, in a 1 L container, generated from the release from 1 g of capsules.

Tabla 2.
Tiempos y valores promedio de constantes cinéticas para diferentes concentraciones de aceite esencial en un recipiente de 1 L generados a partir de la liberación de 1 g de cápsulas.

Variation factor	k_4 (mL m^{-3})	k_5 ($\text{s}^{-1} \times 10^{-6}$)	$t_{1/2}$ (h)	$t_{7/8}$ (h)	$t_{0.99}$ (h)
Concentration of AlgNa					
0.5 %	6.59 ^a (0.52)	5.4167 ^a (0.4444)	38.26 ^a (8.3737)	114.78 ^a (25.12)	254.19 ^a (55.63)
1.0 %	6.44 ^a (0.45)	4.8611 ^b (0.3333)	40.94 ^a (9.20)	122.82 ^a (27.61)	271.99 ^a (61.14)
HSD	0.99	0.4722	21.50	64.68	143.24
Concentration of CaCl₂					
0.8 %	7.09 ^a (0.05)	5.9167 ^a (0.5278)	34.01 ^a (12.35)	102.02 ^b (37.05)	225.93 ^b (82.06)
2.5 %	5.98 ^b (0.40)	4.6778 ^b (0.1944)	43.04 ^a (1.93)	129.12 ^a (5.78)	285.95 ^a (52.80)
HSD	0.99	0.5833	21.58	24.74	23.38
Time					
10 min	5.89 ^b (0.57)	4.8333 ^b (0.4167)	41.81 ^a (6.64)	125.44 ^a (19.94)	277.80 ^a (44.15)
20 min	6.62 ^{ab} (1.01)	5.1667 ^a (0.4444)	40.66 ^a (5.91)	112.11 ^{ab} (63.59)	248.27 ^b (48.82)
40 min	6.41 ^{ab} (0.51)	5.1111 ^a (0.7778)	38.65 ^a (6.58)	115.94 ^{ab} (19.74)	256.76 ^{ab} (43.71)
60 min	7.14 ^a (0.58)	5.0278 ^a (0.6389)	37.37 ^a (21.20)	121.97 ^b (17.74)	270.11 ^{ab} (39.28)
HSD	1.13	0.2500	23.09	22.28	27.30

$t_{1/2}$, $t_{7/8}$ and $t_{0.99}$ are required times to reach 50.0, 87.5, and 99.0 % of the maximum concentration in the container, respectively. Equal letters indicate non-significant difference. Values in parentheses are standard deviations. HSD is honest significant difference (Tukey, 0.05).

$t_{1/2}$, $t_{7/8}$ y $t_{0.99}$ son tiempos necesarios para alcanzar 50.0, 87.5 y 99.0 % de la concentración máxima en el recipiente. Letras iguales indican diferencia no significativa. Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar. HSD es diferencia significativa honesta (Tukey, 0.05).

Average $t_{1/2}$ time was 39.57 (± 2.86) and was not affected by AlgNa and CaCl₂ nor by the immersion time (Table 2). The average $t_{7/8}$ and $t_{0.99}$ were 118.70 (± 8.57) and 262.87 (± 18.97) h, respectively. Values of $t_{1/2}$, $t_{7/8}$, and $t_{0.99}$ tended to be higher with higher concentrations, congruently with the constant k_5 , although with significant contrast ($p \leq 0.05$) only in the effect of CaCl₂. In addition, the longest required values of $t_{1/2}$, $t_{7/8}$ and $t_{0.99}$ were found with immersion of 10 min and the shortest with 20 min, also congruently with k_5 , while time requirements were intermediate with 40 and 60 min.

These results indicated that, based on the concentration of AlgNa and CaCl₂ solutions, it is feasible to control the

El tiempo $t_{1/2}$ promedio fue 39.57 (± 2.86) y no fue afectado por AlgNa y CaCl₂ ni por el tiempo de inmersión (Tabla 2). Los valores medios de $t_{7/8}$ y $t_{0.99}$ fueron 118.70 (± 8.57) y 262.87 (± 18.97) h, respectivamente. Los valores de $t_{1/2}$, $t_{7/8}$ y $t_{0.99}$ tendieron a ser mayores con concentraciones más altas, de manera congruente con la constante k_5 , aunque con contraste significativo ($p \leq 0.05$) sólo en el efecto del CaCl₂. Además, los valores requeridos más largos de $t_{1/2}$, $t_{7/8}$ y $t_{0.99}$ se encontraron con inmersión de 10 min y los más cortos con 20 min, también de manera congruente con k_5 , mientras que los requerimientos de tiempo fueron intermedios con 40 y 60 min.

Estos resultados indicaron que, con base en la concentración de las soluciones de AlgNa y CaCl₂, es factible controlar la

release rate of Eo, but this can only be performed with immersion times between 10 and 20 min within the calcium solution, since different behaviors were not obtained with longer residence times. However, the higher release rate with 20 min was caused by a lower encapsulation efficiency (Table 1), where the superficial oil volatilized faster than that of the nuclear region. In this regard, since the superficial concentration of essential oil cannot be controlled, the 10-min residence time was considered a better alternative to attend the encapsulation of the essential oil.

Potencial for fungal inhibition

The formulation AlgNa/CaCl₂/t-1.0 %/0.8 %/10min was used to evaluate the potential of the capsules for fungal inhibition, due to the larger nuclear diameter and high encapsulation efficiency obtained. A searching process was carried out for the required quantity of capsules to inhibit the development of *Penicillium digitatum*, which had been inoculated on culture plates, through the release of essential oil in their headspace.

The growth of the fungus in the Control treatment, without essential oil exposure, varied from low to moderate on the first day of incubation, from moderate to high on the second, and it was high in all the cases after the third day (Table 3). In contrast, when the inoculated medium was exposed to the presence of 2.0 g of capsules, the released oil inhibited totally the fungus development. In order to find the capsules minimum inhibitory quantity (MIQ), the test was repeated with batches of 1.0 g of capsules and a low to moderate growth was observed in the first two days. A moderate growth was noted afterwards until the end of the five days evaluation period. These results indicated that the MIQ was between 1.0 and 2.0 g. In this sense, a third test with batches of 1.5 g of capsules showed that, with this quantity, a total inhibition of the fungus was also achieved. Although results indicated that the MIQ was between 1.0 and 1.5 g of capsules, the quantity used in the last test, that is, 1.5 g of capsules, was accepted as the minimum required to cause the inhibition of the fungus.

P. digitatum is an important factor that limits the shelf life of citrus fruits and it is known as green mold. Besides, other species of the genus *Penicillium* limit the consumption of fruits as apple due to the production of mycotoxins (Heinmaa et al., 2019). Talibi et al. (2014) pointed out that the use of essential oils, particularly those of cinnamon

tasa de liberación de Eo, pero esto sólo se puede realizar con tiempos de inmersión entre 10 y 20 min dentro de la solución de calcio, ya que no se observaron comportamientos diferentes con tiempos de residencia más largos. Sin embargo, la mayor tasa de liberación con 20 min fue causada por una menor eficiencia de encapsulado (Tabla 1), donde el aceite superficial se volatilizó más rápido que el de la región nuclear. En este sentido, dado que no se puede controlar la concentración superficial de aceite esencial, el tiempo de residencia de 10 min se consideró una mejor alternativa para atender el encapsulado de aceite esencial.

Potencial de inhibición fúngica

Se utilizó la formulación AlgNa/CaCl₂/t-1.0 %/0.8 %/10min para evaluar el potencial de las cápsulas para la inhibición fúngica, debido al mayor diámetro nuclear y la alta eficiencia de encapsulación obtenida. Se realizó un proceso de búsqueda de la cantidad requerida de cápsulas para inhibir el desarrollo de *Penicillium digitatum*, que había sido inoculado en placas de cultivo, mediante la liberación de aceite esencial en el espacio de cabeza.

El crecimiento del hongo en el tratamiento Control, sin exposición a aceite esencial, varió de bajo a moderado el primer día de incubación, de moderado a alto en el segundo, y fue alto en todos los casos a partir del tercer día (Tabla 3). Por el contrario, cuando el medio inoculado se expuso a la presencia de 2.0 g de cápsulas, el aceite liberado inhibió totalmente el desarrollo de hongos. Para encontrar la cantidad mínima inhibitoria (MIQ) de las cápsulas, se repitió el ensayo con lotes de 1.0 g de cápsulas y se observó un crecimiento de bajo a moderado en los dos primeros días. Posteriormente, se observó un crecimiento moderado hasta el final del período de evaluación de cinco días. Estos resultados indicaron que el MIQ se encontraba entre 1.0 y 2.0 g. En este sentido, una tercera prueba con lotes de 1.5 g de cápsulas mostró que, con esta cantidad, se logró también una inhibición total del hongo. Aunque los resultados indicaron que el MIQ estaba entre 1.0 y 1.5 g de cápsulas, la cantidad utilizada en la última prueba, es decir, 1.5 g de cápsulas, se aceptó como el mínimo requerido para provocar la inhibición del hongo.

P. digitatum es un factor importante que limita la vida útil de los cítricos y se conoce como moho verde. Además, otras especies del género *Penicillium* limitan el consumo de frutos como manzana, debido a la producción de micotoxinas (Heinmaa et al., 2019). Talibi et al. (2014) señalaron que el uso de aceites esenciales, en particular los de canela y tomillo, tiene potencial para controlar la mayoría de las pudriciones de los cítricos en postcosecha,

Table 3.
Development of the fungus *Penicillium digitatum* inoculated in culture medium exposed to the release of thyme essential oil from capsules placed in the headspace of closed containers of 1 L.

Tabla 3.
Desarrollo del hongo *Penicillium digitatum* inoculado en medios de cultivo expuestos a la liberación de aceite esencial de tomillo de cápsulas colocadas en el espacio de cabeza de envases de 1 L.

Day	Assay 1		Assay 2		Assay 3	
	Control	Treat: 2.0 g	Control	Treat: 1.0 g	Control	Treat: 1.5 g
1	Low	Null	Moderate	Low	Low	Null
2	Moderate	Null	High	Moderate	Moderate	Null
3	High	Null	High	Moderate	High	Null
4	High	Null	High	Moderate	High	Null
5	High	Null	High	Moderate	High	Null

Control: handling without the presence of capsules. Treat: handling with 1.0, 1.5, and 2.0 g.

Control: manipulación sin presencia de cápsulas. Trat: manipulación con 1.0, 1.5 y 2.0 g.

and thyme, have potential to control most rots of citrus in postharvest, including green mold, blue mold, and sour rot. The proposed mechanism of action of essential oils against microorganisms includes the affectation of the cell membrane, causing its disruption and making it more permeable, altering ion transport processes, thus modifying the concentration of electrolytes like K^+ , Ca^{2+} , and Na^+ . Also, it has been suggested the interaction with membrane proteins, which may cause the disruption of the functions of mitochondria, which conduces to an imbalance in ATP concentration and, eventually, the death of the cell (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020).

Talibi *et al.* (2014) pointed out that the use of essential oils in citrus fruits can be made difficult by possible problems of phytotoxicity or alteration of sensory attributes. In this regard, the results of the present work showed that a direct contact with the product is not required, since the essential oil is released in the headspace. This use based on the release of essential oil vapors in the headspace was consistent with the use of biopolymeric films, where Peretto *et al.* (2014) incorporated carvacrol and methyl cinnamate at 0.75 %, and these compounds were vaporized from there and achieved fungal control in strawberry fruits.

Also, Martínez-Romero *et al.* (2007) reported the high effectiveness of an essential oil through the use of carvacrol

incluidos el moho verde, el moho azul y la pudrición ácida. El mecanismo de acción propuesto de los aceites esenciales en contra de los microorganismos incluye la afectación de la membrana celular, provocando su disrupción y haciéndola más permeable, alterando los procesos de transporte de iones, modificando así la concentración de electrolitos como K^+ , Ca^{2+} y Na^+ . Asimismo, se ha sugerido la interacción con proteínas de membrana, lo que puede provocar la alteración de las funciones de las mitocondrias, la conducción a un desequilibrio en la concentración de ATP y, eventualmente, a la muerte celular (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020).

Talibi *et al.* (2014) señalaron que el uso de aceites esenciales en frutos de cítricos puede verse dificultado por posibles problemas de fitotoxicidad o alteración de atributos sensoriales. Al respecto, los resultados del presente trabajo mostraron que no se requiere un contacto directo con el producto, ya que el aceite esencial se libera en el espacio de cabeza. Este uso basado en la liberación de vapores de aceites esenciales en el espacio de cabeza fue consistente con el uso de películas biopoliméricas, donde Peretto *et al.* (2014) incorporaron carvacrol y cinamato de metilo al 0.75 %, y estos compuestos se vaporizaron a partir de ahí y lograron el control fúngico en frutos de fresa.

Asimismo, Martínez-Romero *et al.* (2007) reportaron la alta efectividad de un aceite esencial mediante el uso de vapores de carvacrol a una concentración de 1000 mL m^{-3} en el espacio de cabeza de frutos de uva. También, López-Gómez *et al.* (2021) liberaron vapores de eugenol, bergamota y aceite

vapors at a concentration of 1000 mL m⁻³ in the headspace of grapefruits. Similarly, López-Gómez *et al.* (2021) released vapors of eugenol, bergamot, and grapefruit essential oil at a concentration of 100 mL m⁻³ in a modified atmosphere system that allowed the quality of mushroom slices to be maintained for 12 d.

The use of essential oils to reduce microbial growth is normally based on direct contact through biopolymeric coatings, but the results of this work showed that the use of vapors with controlled release can be done through encapsulation. In this regard, a release analysis based on Equation (13), with the parameters of the AlgNa/CaCl₂/t-1.0/0.8/10min system showed that the concentration of Eo in the headspace that is required to cause inhibition was less than 100 mL m⁻³, which contrasted with the concentrations that must be used with biopolymeric coatings, fluctuating between 500 and 1000 mL m⁻³ (Valle-Ortiz *et al.*, 2019), indicating that the release of essential oils from encapsulation systems constitutes a better strategy to control the fungus development.

Nowadays, the evidence for using essential oils to reduce losses caused by microbial development is growing. However, it is necessary to attend several aspects to improve the potential for using such substances in the conservation of horticultural products. In this regard, Mutlu-Ingok *et al.* (2020) pointed out the following aspects that may be part of future researches for using vapors of essential oils: the quantity to be used should consider not only the minimum inhibitory concentration (MIQ) but also the maximum sensorially permitted concentration (MSC) to avoid the modification of the quality attributes of the product, for which designed mixtures of different essential oils may be applied, considering the synergistic effect between them. The determination of MIQ must also consider the control of both, the growth and mycotoxin production of fungi, the part of the plant to be protected, the geographical aspects, and the extraction method of the essential oil. Authors explained that it is also necessary to investigate the antifungal actions not only against monocultures, but also against polycultures. In addition, new strategies for improving the stability of essential oils are required. In relation to this, an encapsulation strategy as that showed in the present work can be adequate, together with the modeling of the kinetics release, which can allow determining the quantities to be used in a better form, once the MIQ and the MSC have been established.

esencial de toronja a una concentración de 100 mL m⁻³ en un sistema de atmósfera modificada que permitió mantener la calidad de las rodajas de hongos durante 12 d.

El uso de aceites esenciales para reducir el crecimiento microbiano se basa normalmente en el contacto directo a través de recubrimientos biopoliméricos, pero los resultados de este trabajo mostraron que el uso de vapores con liberación controlada se puede realizar mediante encapsulado. Al respecto, un análisis de liberación basado en la Ecuación (13), con los parámetros del sistema AlgNa/CaCl₂/t-1.0/0.8/10min mostró que la concentración de Eo en el espacio de cabeza que se requiere para causar inhibición fue menor de 100 mL m⁻³, que contrasta con las concentraciones que deben utilizarse con recubrimientos biopoliméricos, fluctuando entre 500 y 1000 mL m⁻³ (Valle-Ortiz *et al.*, 2019), indicando que la liberación de aceites esenciales de sistemas de encapsulado constituye una mejor estrategia para controlar el desarrollo de hongos.

Actualmente, la evidencia del uso de aceites esenciales para reducir las pérdidas causadas por el desarrollo microbiano es cada vez mayor. Sin embargo, es necesario atender varios aspectos para mejorar el potencial de uso de dichas sustancias en la conservación de productos hortícolas. En este sentido, Mutlu-Ingok *et al.* (2020) señalaron los siguientes aspectos que pueden formar parte de futuras investigaciones sobre el uso de vapores de aceites esenciales: la cantidad a utilizar debe considerar no sólo la concentración mínima inhibitoria (MIQ), sino también la concentración máxima permitida sensorialmente (MSC) para evitar la modificación de los atributos de calidad del producto, para lo cual se podrán aplicar mezclas diseñadas de diferentes aceites esenciales, considerando el efecto sinérgico entre ellos. La determinación de la MIQ debe tener en cuenta también el control tanto del crecimiento de los hongos como las micotoxinas producidos por ellos, la parte de la planta a proteger, los aspectos geográficos y el método de extracción del aceite esencial. Los autores explicaron que también es necesario investigar las acciones antifúngicas no sólo contra monocultivos, sino también contra policultivos. Además, se requieren nuevas estrategias para mejorar la estabilidad de los aceites esenciales. En relación a esto, una estrategia de encapsulado como la mostrada en el presente trabajo puede ser adecuada, junto con el modelado de la cinética de liberación, que puede permitir determinar de mejor forma las cantidades a ser utilizadas, una vez que se hayan determinado los valores de MIQ y MSC.

Conclusions

Thyme essential oil (Eo) was encapsulated by ionic gelation with sodium alginate (AlgNa) and calcium chloride (CaCl₂). The concentration of solutions and the residence time (t) in the calcium medium determined the dimensions of capsules. The encapsulation efficiency was higher than 88 % and values were higher than 94 % with AlgNa/CaCl₂/t-1.0/0.8/10min systems. The release rate of Eo was a function of the relationship between the amount of oil trapped in the nuclear region and the amount that remained in the superficial region. The controlled release of essential oil allowed the fungus *Penicillium digitatum* to be inhibited.

Conclusiones

El aceite esencial de tomillo (Eo) se encapsuló mediante gelación iónica con alginato de sodio (AlgNa) y cloruro de calcio (CaCl₂). La concentración de soluciones y el tiempo de residencia (t) en el medio de calcio determinaron las dimensiones de las cápsulas. La eficiencia de encapsulado fue superior al 88 % y los valores fueron superiores al 94 % con los sistemas AlgNa/CaCl₂/t-1.0/0.8/10min. La tasa de liberación de Eo fue una función de la relación entre la cantidad de aceite atrapado en la región nuclear y la cantidad que permaneció en la región superficial. La liberación controlada de aceite esencial permitió inhibir el hongo *Penicillium digitatum*.

References

- Aceval, A. N. D., Chater, P. I., Wilcox, M., Lucini, L., Rocchetti, G., Dalmina, M., Pearson, J. P., & Dias de Mello, C. A. R. (2019). Encapsulation of *Stevia rebaudiana* Bertoni aqueous crude extracts by ionic gelation – Effects of alginate blends and gelling solutions on the polyphenolic profile. *Food Chemistry*, 275: 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.086>
- Akhter, R., Masoodi, F. A., Wani, T. A., & Rather, S. A. (2019). Functional characterization of biopolymer based composite film: Incorporation of natural essential oils and antimicrobial agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137: 1245–1255. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.214>
- Antonoli, G., Fontanella, G., Echeverrigaray, S., Longaray Delamare, A. P., Fernandes Pauletti, G., & Barcellos, T. (2020). Poly(lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: In vitro and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. *Food Chemistry*, 326: 126997. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126997>
- Barroso, L., Viegas, C., Vieira, J., Ferreira-Pêgo, C., Costa, J., & Fonte, P. (2021). Lipid-based carriers for food ingredients delivery. *Journal of Food Engineering*, 295: 110451. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110451>
- Benelli, G., & Pavela, R. (2018). Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—A systematic review. *Acta Tropica*, 179: 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.025>
- Burden, R. L., & Faires, J. D. (2010). Numerical Analysis, 9th Ed.; Brooks/Cole, Cengage Learning, Boston, USA.
- Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Vojvodić Cebin, A., Karlović, S., Kovač, V., Špoljarić, I., Mršić, G., & Komes, D. (2018). Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Research International*, 111: 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.034>
- Caporaso, N., & Formisano, D. (2016). Developments, applications, and trends of molecular gastronomy among food scientists and innovative chefs. *Food Reviews International*, 32(4): 417–435. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1094818>
- Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6): 1133–1152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>
- Da Silva, G. Z., Martins, C. C., de Melo, L. F., Jeromini, T. S., & Panizzi, R. D. C. (2019). Incidence of fungi in Mombasa grass seeds during the stages of the seed conditioning process. *Engenharia Agrícola*, 39(2): 234–239. <https://doi.org/10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v39n2p234-239/2019>
- Da Silva, K. R., Baia, F. P. L., Byler, K. G., & Setzer, W. N. (2020). Essential Oils as antiviral agents , potential of essential oils to treat SARS-CoV-2 infection: an In-Silico investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10): 3426. <https://doi.org/10.3390/ijms21103426>

- Danzi, D., Ladu, G., Veltkamp, P. C., Garitas, B. A., Petretto, G. L., Fancello, F., & Venditti, T. (2020). Effectiveness of essential oil extracted from pompia leaves against *Penicillium digitatum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100 (9): 3639–3647. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10394>
- De Moura, S. C. S. R., Berling, C. L., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., & Hubinger, M. D. (2018). Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation : Pigment stability during storage of microparticles. *Food Chemistry*, 241: 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.095>
- Fellenberg, M. A., Carlos, F., Peña, I., Ibáñez, R. A., & Vargas-Bello-Pérez, E. (2020). Oxidative quality and color variation during refrigeration (4 °C) of rainbow trout fillets marinated with different natural antioxidants from oregano, quillaia and rosemary. *Agricultural and Food Science*, 29(1): 43–54. <https://doi.org/10.23986/afsci.87078>
- Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2): 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>
- Gandarilla-Pacheco, F. L., Torres-Caraballo, S., de Luna- Santillana, E. J., Quintero-Zapata, I., & Arroyo-González, N. (2020). Inhibitory effect of essential oils on the mycelial growth of *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. isolated from sweet orange. *Agrociencia*, 54(2): 209–225.
- González, R. E., Tarón, A., & Morón, L. B. (2015). Formación de microcápsulas de tamaño controlado por gelación iónica utilizando mezclas biopoliméricas binarias. *Informacion Tecnológica*, 26(6): 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000600005>
- Gorbunova, N., Bannikova, A., Evteev, A., Evdokimov, I., & Kasapis, S. (2018). Alginate-based encapsulation of extracts from *Beta vulgaris* cv. Beet greens: Stability and controlled release under simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 93: 442–449. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.075>
- Heinmaa, L., Pöldma, P., Mirmajlessi, S. M., Kaldmäe, H., Vangdal, E., Kidmose, U., Bertelsen, M., Scalzo, R. L., Fibiani, M., & Moor, U. (2019). Occurrence of mycotoxin patulin and polyphenol profile of nordic apple juices in relation to apple cultivation system and pre-processing storage temperature. *Agricultural and Food Science*, 28(3): 126–136. <https://doi.org/10.23986/afsci.77257>
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1): 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- León-Fernández, A., Martínez-Cárdenas, L., Zepeda-Vallejo, L., Arteaga-Garibay, R., Gutiérrez-Martínez, P., & Montalvo-González, E. (2019). Antibacterial, antifungal, antioxidant and toxic effect of fractioned extracts from soursop pulp. *Revista Bio Ciencias*, 6(311): 1–17. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e400>
- López-Gómez, A., Ros-Chumillas, M., Navarro-Martínez, A., Barón, M., Navarro-Segura, L., Taboada-Rodríguez, A., Marín-Iniesta, F., & Martínez-Hernández, G. B. (2021). Packaging of fresh sliced mushrooms with essential oils vapours: A new technology for maintaining quality and extending shelf life. *Foods*, 10(6) 1196: 2–16. <https://doi.org/10.3390/foods10061196>
- Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J. M., Bailén, G., Zapata, P., Serrano, M., Castillo, S., & Valero, D. (2007). Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 115(2): 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.015>
- Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F., & Capanoglu, E. (2020). Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: an updated review. *Molecules*, 25(20), 4711. <https://doi.org/10.3390/molecules25204711>
- Naeem, A., Abbas, T., Mohsin, T., & Hasnain, A. (2018). Effect of guar gum coatings containing essential oils on shelf life and nutritional quality of green-unripe mangoes during low temperature storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113: 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.224>
- Perczak, A., Gwiazdowska, D., Gwiazdowski, R., Juś, K., Marchwińska, K., & Waśkiewicz, A. (2020). The inhibitory potential of selected essential oils on fusarium spp. Growth and mycotoxins biosynthesis in maize seeds. *Pathogens*, 9(23): 1–16. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010023>
- Peretto, G., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. J., Sarreal, S. B. L., Hua, S. S. T., Sambo, P., & Mchugh, T. H. (2014). Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. *Postharvest Biology and Technology*, 89: 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.11.003>
- Rehman, R., Hanif, M. A., Mushtaq, Z., & Al-Sadi, A. M. (2016). Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review.

- Food Reviews International*, 32(2): 117–160. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1057841>
- Reyes-Jurado, F., Cervantes-Rincón, T., Bach, H., López-Malo, A., & Palou, E. (2019). Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. *Industrial Crops & Products*, 131: 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.036>
- Rivera, C. J., Crandall, P. G., Bryan, C. A. & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54: 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Rusin, C., Cavalcanti, F. R., de Lima, P. C. G., Faria, C. M. D. R., Almança, M. A. K. and Botelho, R. V. (2021). Control of the fungi *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback, in cv. Syrah grapevines. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 43: 1–9. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.44785>
- SPSS Inc. (2000). Sigma plot 2000 user's guide. SPSS Inc., Chicago, USA.
- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., & Aoumar, A. A. B. (2014). Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 117: 1–17. <https://doi.org/10.1111/jam.12495>
- Valle-Ortiz, D. J., Gómez-Cruz, A., Hernández-Fuentes, A. D., & Valle-Guadarrama, S. (2019). Microbial control in white cactus pear with biopolymeric coating of chitosan, candelilla wax and thyme essential oil. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(3): 201–207. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.3.201-207>
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In: Zuidam, N. J. & Nedović, V. A. (eds.) *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Springer Science+Business Media, LLC, 3-29. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0>