

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DERMATOCINÉTICA DE
NANOPARTÍCULAS CON ACEITES ESENCIALES PARA SU
APLICACIÓN EN PIEL**

POR

M.C. PERLA GIOVANNA SILVA FLORES

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN
CIENCIAS con Orientación en Química Biomédica**

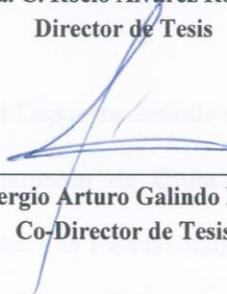
Agosto, 2019

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DERMATOCINÉTICA DE
NANOPARTÍCULAS CON ACEITES ESENCIALES PARA SU APLICACIÓN
EN PIEL**

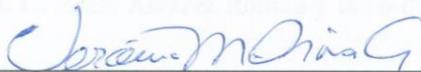
Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Rocío Álvarez Román
Director de Tesis



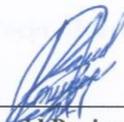
Dr. C. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Co-Director de Tesis



Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo
Comisión de Tesis



Dr. C. Luis Alejandro Pérez López
Comisión de Tesis



Dr. C. David Paniagua Vega
Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DERMATOCINÉTICA DE
NANOPARTÍCULAS CON ACEITES ESENCIALES PARA SU APLICACIÓN
EN PIEL**

Presentado por:

M.C. Perla Giovanna Silva Flores

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina y en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Rocío Álvarez Román y la co-dirección del Dr. C. Sergio Arturo Galindo Rodríguez.

Director de tesis



Dra. C. Rocío Álvarez Román

Co-Director



Dr. C. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

*Dedico esta tesis a mi querida familia, por su amor incondicional.
A mi padre quien con su ejemplo y disciplina me obliga a superarme
día a día. Porque he aprendido y heredado su fuerza y dedicación.
A mi madre quien con su amor y paciencia me obliga a ser mejor
persona. Porque sigo viendo tu esfuerzo y dedicación día a día.
A mis hermanas por su bella compañía. Por todos estos años en los
cuales hemos compartido tantas cosas lindas.
A mi hijo André, la mejor nanopartícula que pude crear. Porque
contigo se escribe una nueva vida, te amo hijo.*

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, por darme vida, salud y fuerza para seguir siempre adelante y poder realizar este sueño.

A mi hijo André, porque, aunque aún no lo comprendas, este esfuerzo es por ti y para ti. Gracias por elegirme como tu mamá, por poner mi vida de cabeza y por darme un motivo para levantarme y seguir adelante.

A mis padres, por todo lo que me dan día a día, por su apoyo incondicional cuando más los he necesitado y por nunca, nunca dejarme caer. Gracias Papá por todo lo que siempre me has dado sin esperar algo a cambio. Gracias Mamá por tu esfuerzo y por ser una madre para André. Porque con ustedes aprendí que aún sin decir algo, las acciones lo dicen todo. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermanas, Xochitl y Daniela, por sus palabras y regaños que me ayudan a ser más fuerte y crecer día con día. Gracias a mis sobrinos por darme alegrías y ser los mejores amigos de André.

A mi familia, los Silva y los Flores, por su alegría y por alentarme a seguir adelante. Gracias por ese sabio consejo que me dan siempre y por todo el amor que tienen para André y para mí.

A la Dra. Rocío Álvarez Román y el Dr. Sergio Galindo Rodríguez, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por compartir sus conocimientos conmigo y dejarme entrar en el mundo de la nanotecnología.

A mi comisión de tesis, Dra. Verónica Rivas Galindo, Dr. Alejandro Pérez López y Dr. David Paniagua Vega, no siempre se tiene la suerte de contar con tres personas tan valiosas respaldando tu trabajo, me siento muy agradecida por sus consejos y su apoyo.

A la Dra. Rosalba Ramírez Durón, con usted comencé este camino y sin su presencia no hubiera sido capaz de terminarlo. Gracias por escucharme y por su ayuda siempre que la he necesitado. Pero, sobre todo, por su hermosa amistad.

A mis tres mosqueteras Clau, Perla y Caty, cualquier cosa que les diga, sería muy poco para expresar lo que siento por ustedes. Gracias por su amistad

incondicional, su amor, su paciencia y por estar conmigo en los momentos más oscuros. Por nunca dejarme sola, aún y cuando ni yo misma quiero estar conmigo. Las quiero mucho.

***Comadre Claudia**, por darme uno de los regalos más bellos y dejarme ser la madrina de mi hermosa Vita, la palabra gracias no describe mi agradecimiento hacia ti, por eso, un millón de gracias.*

*A **Paco**, porque, aunque estas lejos, jamás es lo suficiente para soltar mi manos. Gracias por tu cariño y amistad durante estos 18 años.*

*A **mi Risk Team Mitzi, Nona, Juan, Víctor, Roberto y Luis**, por su hermosa amistad, sin ustedes mi estancia en el cubículo no hubiera sido la misma. Gracias por esas reuniones que alegraron mi vida en los momentos más difíciles, gracias por sus palabras que me hicieron seguir adelante y ser más fuerte. Los quiero amigos. A **Gualberto** por tu amistad, tu sinceridad y tus platicas siempre motivacionales durante mis largas horas de desvelo mientras escribía esta tesis.*

*Al **Nanoteam**, gracias por su amistad y por hacer de mis días de trabajo en el Nanolab más agradables y divertidos.*

*A **los del cubículo**, a todos los que integran **Química Analítica** y a todos aquellos a quienes no he nombrado, pero que de una u otra manera estuvieron presentes estos años de mi vida.*

*A **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca de manutención otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias con orientación en **Química Biomédica**, con número de becario 254012.*

Aunque estas líneas no puedan compensar todo lo que cada persona ha aportado en esta etapa de mi vida, espero que al menos sirvan para expresar mi más sincero agradecimiento, muchas gracias.

RESUMEN

M.C. Perla Giovanna Silva Flores

Fecha de graduación: Agosto del 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del estudio: **DESARROLLO Y EVALUACIÓN DERMATOCINÉTICA DE NANOPARTÍCULAS CON ACEITES ESENCIALES PARA SU APLICACIÓN EN PIEL**

Número de páginas: 177

Candidato para la obtención del grado de Doctor en
Ciencias con orientación en Química Biomédica

Área de estudio: Química Analítica, Facultad de Medicina, UANL

Propósito y Método de estudio: La piel al ser el órgano más externo del cuerpo está constantemente expuesta a daños causados por factores ambientales debido a la formación de radicales libres (RL). Los aceites esenciales (AE), representan una alternativa antioxidante para disminuir los daños provocados por los RL en la piel. Sin embargo, los AE son altamente volátiles y sensibles a la luz y al oxígeno, por lo que su nanoencapsulación representa una alternativa factible para aumentar su estabilidad física y química. Las nanocápsulas poliméricas (NC) como sistema de liberación con gran área superficial favorecerían el tiempo de residencia de los AE en la piel para asegurar su efecto dermoprotector. Este trabajo consistió en seis etapas: en la primera, los componentes de los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* fueron identificados por CG-EM/CG-FID y se estableció su abundancia. Durante la segunda etapa, se obtuvieron las NC con los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* por la técnica de nanoprecipitación y se evaluó su tamaño, homogeneidad, estabilidad, porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación. En la tercera etapa, se validaron dos métodos de CG-FID para cuantificar los componentes principales de los AE evaluando linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud. En la cuarta etapa, se evaluó la actividad antioxidante de los AE libres y en NC por el ensayo de inhibición de la lipoperoxidación del ácido linoleico por el método de FTC. Después, en la quinta etapa, se evaluaron los parámetros biofísicos, tales como *TEWL*, contenido de agua, cantidad de sebo y pH de la piel con técnicas de bioingeniería. Finalmente, se realizó una evaluación dermatocinética *ex vivo* en piel de cerdo utilizando celdas de Franz modificadas y la técnica de *tape stripping*.

Contribuciones y Conclusiones: En los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* se identificaron 16 y 22 componentes, respectivamente de los cuales más del 60% son monoterpenos oxigenados con importante actividad antioxidante. La técnica de nanoprecipitación permitió obtener NC con ambos AE con un tamaño mayor a 200 nm y un potencial zeta positivo, características que favorecieron su deposición en el EC. Los métodos cromatográficos por CG-FID validados permitieron cuantificar de forma lineal, exacta y precisa los componentes principales de los AE. Se demostró la buena actividad antioxidante de ambos aceites, con un 65% de inhibición de la lipoperoxidación, la cual se mantuvo después del proceso de nanoencapsulación (60% de inhibición). En relación a los parámetros biofísicos, se observó que los AE no encapsulados modifican temporalmente la estructura del EC a diferencia de las NC, en las cuales el AE no está totalmente disponible y el reacomodo estructural es menor. Después de la aplicación de las NC-AE, la piel conservó su pH, aumentó su contenido de agua y de sebo en comparación con las emulsiones. Además, la nanoencapsulación de los AE favoreció la deposición de los componentes principales de los AE en el EC, asegurando así su efecto dermoprotector.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dra. C. Rocío Álvarez Román

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 La Piel	1
1.2 Vías de administración tópica	4
1.3 Sistemas nanoparticulados como vehículos de activos	7
1.3.1 Complejos moleculares	9
1.3.2 Nanotransportadores lipídicos	10
1.3.3 Nanotransportadores poliméricos	11
1.4 Antioxidantes en piel	16
1.5 Antioxidantes de origen natural: aceites esenciales	18
1.5.1 Evaluación de actividad antioxidante de aceites esenciales	21
1.5.2 <i>Rosmarinus officinalis</i>	22
1.5.3 <i>Lavandula dentata</i>	23
1.6 Evaluación dermatocinética <i>in vitro</i> de los AE en piel	26
1.6.1 Pruebas de permeación en piel	27
1.6.2 Técnica de <i>tape stripping</i>	28
1.6.3 Evaluación de la integridad de la piel	29
1.7 Antecedentes	33
1.8 Justificación	35
1.9 Objetivos	36

1.9.1	Objetivo general	36
1.9.1	Objetivos específicos	36
2.	MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1	Equipos, Material y Reactivos	37
2.1.1	Equipos e instrumentos	37
2.1.2	Material biológico	38
2.1.3	Reactivos	39
2.2	Métodos	40
2.2.1	Obtención y caracterización física y química de los AE de <i>Lavandula dentata</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i> .	40
2.2.2	Obtención y caracterización fisicoquímica de NC y emulsiones con AE de <i>L. dentata</i> y <i>R. officinalis</i> .	44
2.2.3	Desarrollo y validación de métodos analíticos por CG-FID para cuantificar los AE en NC poliméricas.	48
2.2.4	Actividad antioxidante de los AE libres y nanoencapsulados.	54
2.2.5	Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con técnicas de bioingeniería.	57
2.2.6	Perfil dermatocinético de los AE libres y nanoencapsulados en piel de cerdo, con estudios <i>in vitro</i> de permeación y <i>tape stripping</i> .	58
3.	RESULTADOS	
3.1	Obtención y caracterización física y química de los AE de <i>Lavandula dentata</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i>.	61
3.2	Obtención y caracterización fisicoquímica de NC y emulsiones con AE de <i>L. dentata</i> y <i>R. officinalis</i>	70
3.3	Desarrollo y validación de métodos analíticos por CG-FID para cuantificar los AE en NC poliméricas.	78
3.4	Actividad antioxidante de los AE libres y nanoencapsulados.	86
3.5	Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con técnicas de bioingeniería	89
3.6	Perfil dermatocinético de los AE libres y nanoencapsulados en piel de cerdo, con estudios <i>in vitro</i> de permeación y <i>tape stripping</i>.	93

4.	DISCUSIÓN	
4.1	Obtención y caracterización física y química de los AE de <i>Lavandula dentata</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i> .	96
4.2	Obtención y caracterización fisicoquímica de NC y emulsiones con AE de <i>L. dentata</i> y <i>R. officinalis</i>	101
4.3	Desarrollo y validación de métodos analíticos por CG-FID para cuantificar los AE en NC poliméricas.	110
4.4	Actividad antioxidante de los AE libres y nanoencapsulados.	115
4.5	Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con técnicas de bioingeniería	121
4.6	Perfil dermatocinético de los AE libres y nanoencapsulados en piel de cerdo, con estudios <i>in vitro</i> de permeación y <i>tape stripping</i> .	129
5.	CONCLUSIONES	132
6.	PERSPECTIVAS	135
7.	ANEXOS	136
	BIBLIOGRAFÍA	154

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Ventajas de la nanoencapsulación de compuestos biológicamente activos.	8
2	Estudios de liberación <i>in vitro</i> de activos nanoencapsulados.	15
3	Aceites esenciales evaluados por su aplicación como agente antioxidante.	19
4	Ensayos <i>in vitro</i> para determinar la actividad antioxidante de AE.	21
5	Aplicaciones de los sistemas nanométricos de liberación con aceites esenciales y/o sus componentes.	25
6	Valores normales de los parámetros biofísicos de la piel humana.	32
7	Porcentajes de rendimiento de los aceites esenciales.	62
8	Caracterización física de los aceites esenciales y controles.	62
9	Componentes de los aceites esenciales, tiempo de retención (CG-FID) y porcentaje de abundancia (%A).	68
10	Evaluación de NC con diferentes polímeros y disolventes orgánicos.	70
11	Caracterización fisicoquímica de las NC-AE purificadas por diálisis.	73
12	Porcentajes de encapsulación (%E) y eficiencia de encapsulación (%EE) de los AE de <i>L. dentata</i> y <i>R. officinalis</i> en NC.	77
13	Caracterización fisicoquímica de las EM-AE.	77
14	Optimización del programa de temperatura por CG-FID (inyección directa) para la caracterización química del AE de <i>L. dentata</i> .	78

15	Optimización del programa de temperatura por CG-FID (inyección directa) para la caracterización química del AE de <i>R. officinalis</i> .	79
16	Parámetros de validación del método para el AE de <i>L. dentata</i> por CG-FID (inyección directa).	84
17	Parámetros de validación del método para el AE de <i>R. officinalis</i> por CG-FID (inyección directa).	85
18	Porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación (%I) por el método de ABAP.	86
19	Porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación (%I) por el método FTC (15, 30 y 45 µg/mL).	88
20	Parámetros biofísicos basales de la piel de cerdo.	90
21	Valores de referencia de la caracterización física de los controles.	138
22	Valores de referencia de la caracterización física de los aceites esenciales.	138
23	Absorbancias de los controles, AE libres y NC-AE en función del tiempo de incubación.	140
24	Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con la aplicación de las EM-blanco y EM-AE.	142
25	Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con la aplicación de las NP-blanco y NC-AE.	143
26	Diferencia de la <i>TEWL</i> (Δ) de las EM-AE y NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco, respectivamente.	144
27	Diferencia en el contenido de agua del EC (Δ) de las EM-AE y NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco, respectivamente.	145
28	Cantidad de β -pineno, 1,8-cineol y alcanfor en función del tiempo de contacto con la piel 1, 2 y 4 h.	146

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Esquema de las capas de la piel	2
2	Estratos de la epidermis.	3
3	Representación gráfica del modelo “ladrillo y cemento” del estrato córneo.	4
4	Vías de permeación tópica.	5
5	Sistemas nanométricos utilizados para la liberación de activos.	9
6	Tipos de nanopartículas: A) nanoesferas y B) nanocápsulas.	12
7	Representación gráfica de daños en la piel generados por la radiación UV.	16
8	Planta de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	22
9	Planta de <i>Lavandula dentata</i> .	23
10	Celda de difusión vertical de Franz.	27
11	Equipo de hidrodestilación Clevenger modificado.	40
12	Formulación de NC-AE por la técnica de nanoprecipitación y purificación por diálisis.	45
13	Cromatograma del AE de <i>L. dentata</i> por CG-MS.	64
14	Cromatograma del AE de <i>R. officinalis</i> por CG-MS.	65
15	Cromatograma del AE de <i>L. dentata</i> por CG-FID.	66
16	Cromatograma del AE de <i>R. officinalis</i> por CG-FID.	67
17	Efecto de la concentración de polímero en la fase orgánica en el tamaño de las NC.	71

18	Cromatogramas obtenidos por CG-FID de las NC-AE de <i>L. dentata</i> purificadas por A) evaporación a presión reducida y B) diálisis.	72
19	Cambio del tamaño de las NC-AE de <i>L. dentata</i> purificadas por diálisis determinado durante 10 semanas.	73
20	Cambio del tamaño de las NC-AE de <i>R. officinalis</i> purificadas por diálisis determinado durante 10 semanas.	74
21	Señales en el espectro IR-FT para A) polímero Eudragit® E PO y B) NP- blanco.	74
22	Señales en el espectro IR-FT para A) AE- <i>L. dentata</i> y B) NC- <i>L. dentata</i> .	75
23	Señales en el espectro IR-FT para A) AE- <i>R. officinalis</i> y B) NC- <i>R. officinalis</i> .	76
24	Cromatograma del AE de <i>L. dentata</i> por CG-FID.	80
25	Cromatograma del AE de <i>R. officinalis</i> por CG-FID.	81
26	Cromatograma de la mezcla de estándares seleccionados (160 µg/mL) para cuantificar el AE de <i>L. dentata</i> por CG-FID.	82
27	Cromatograma de la mezcla de estándares seleccionados (160 µg/mL) para cuantificar el AE de <i>R. officinalis</i> por CG-FID.	82
28	Absorbancias de los controles positivos (15, 30 y 45 µg/mL) en función del tiempo de incubación (0, 5, 25 y 30 horas).	87
29	Pérdida de agua transepidérmica (g/m ² h) en función de la profundidad de EC acumulada (µm).	89
30	Análisis estadístico de los resultados de pérdida de agua transepidérmica, antes y después de la aplicación de las NP/EM-blanco, EM-AE y las NC-AE.	91
31	Análisis estadístico de los resultados de pH, antes y después de la aplicación de las NP/EM-blanco, EM-AE y las NC-AE.	91
32	Análisis estadístico de los resultados de contenido de agua del EC, antes y después de la aplicación de las NP/EM-blanco, EM-AE y las NC-AE.	92
33	Análisis estadístico de los resultados de la cantidad de sebo, antes y después de la aplicación de las NP/EM-blanco, EM-AE y las NC-AE.	92
34	Cantidad de β-pineno y 1,8-cineol en EC (µg/cm ²) en función del tiempo de contacto con la piel de las EM-AE y las NC-AE NC de <i>L. dentata</i> durante 1, 2 y 4 h.	94

35	Cantidad de 1,8-cineol y alcanfor en EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo de contacto con la piel de las EM-AE y las NC-AE NC de <i>R. officinalis</i> durante 1, 2 y 4 h.	95
36	Gráfica de distribución de tamaño de las NC-AE- <i>L. dentata</i> .	139
37	Gráfica de distribución de tamaño de las NC-AE- <i>R. officinalis</i> .	139
38	Porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación en función de la concentración para el AE- <i>L. dentata</i> y controles.	141
39	Porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación en función de la concentración para el AE- <i>R. officinalis</i> y controles.	141
40	Diferencia de la <i>TEWL</i> (Δ) de las A) EM-AE y B) NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco, respectivamente.	144
41	Diferencia en el contenido de agua del EC (Δ) de las A) EM-AE y B) NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco, respectivamente.	145

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
AE	Aceite esencial
°C	Grados Celsius
CG-FID	Cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización en flama
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas
CG-MS	Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas
DE	Desviación estándar
DER	Desviación estándar relativa
EC	Estrato córneo
EC₅₀	Concentración para el 50% del efecto máximo
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FID	Detección de ionización en llama
FT-IR	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier
g	Gramos
IC₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
h	Horas
LDC	Límite de cuantificación
LDD	Límite de detección
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
NC	Nanocápsulas poliméricas

NP	Nanopartículas poliméricas
pH	Potencial de hidrógeno
r.p.m.	Revoluciones por minuto
µg	Microgramos
%A	Porcentaje de abundancia
%E	Porcentaje de encapsulación
%EE	Porcentaje de eficiencia de encapsulación
%I	Porcentaje de inhibición
%R	Porcentaje de recuperación

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 La Piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, comprende aproximadamente el 16% de la masa corporal, y realiza diversas funciones como protección bacteriana, control de la temperatura corporal, reabsorción de sustancias específicas y sudoración (1-3).

Una de las principales funciones de la piel es su acción como barrera, la cual permite proteger el cuerpo humano de diversas sustancias externas, y en base a los componentes biológicos involucrados, se clasifican en:

- a) *Barrera química-bioquímica*: está formada por lípidos intercelulares, enzimas hidrolíticas, macrófagos y péptidos antimicrobianos (4).

- b) *Barrera inmunológica adaptativa*: está integrada por componentes humorales (*i.e. Linfocitos B*) y celulares del sistema inmune (*i.e. células de Langerhans*) (5).
- c) *Barrera física*: impide el transporte de cuerpos o sustancias extrañas a capas internas de la piel (*i.e. bloque de corneocitos*) (4,5).

Desde el punto de vista histológico, la piel está constituida por tres capas con características específicas, desde el interior al exterior, se encuentran la hipodermis, la dermis y la epidermis. En la Figura 1, se esquematizan estas tres capas de la piel (1,3,5).

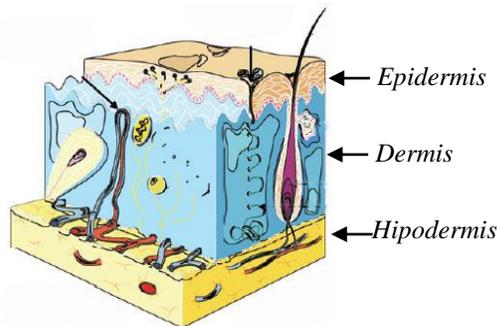


Figura 1. Esquema de las capas de la piel (2).

La *hipodermis o capa subcutánea*, es la capa más gruesa de la piel (grosor desde 1 cm en zonas sin células adiposas hasta 3 cm en área como abdomen), constituida principalmente por células denominadas adipocitos, especializados en la producción y el almacenamiento de grasas. Estos cuerpos grasos son necesarios para el buen funcionamiento de cada célula cutánea ya que, al degradarse, producen energía vital. El conjunto de los adipocitos constituye un tejido de sostén flexible, que desempeñan una función aislante y participan en la termorregulación de la piel. Está unida a la dermis por fibras de elastina y de colágeno (5).

La *dermis* es el sitio de anclaje de estructuras cutáneas tales como folículos pilosos, nervios, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. También contiene abundantes células inmunes y fibroblastos, que participan activamente en las respuestas fisiológicas de la piel. La importancia de la dermis reside en el proceso de anastomosis capilar que aporta nutrientes y oxígeno a la epidermis. Se encuentra unida a la epidermis por la capa basal, constituyendo la unión dermo-epidérmica (1,2,5).

La capa más externa de la piel, es la *epidermis*, se divide en 5 estratos con diferentes grados de maduración de las células: estrato basal, espinoso, granuloso y lúcido (conforman la epidermis viable); y el estrato córneo (2,5). En la Figura 2 se muestran los diferentes estratos de la epidermis.



Figura 2. Estratos de la epidermis (3).

El estrato córneo (EC) está compuesto por dos componentes estructurales: los corneocitos y los lípidos intercorneocitarios (*i.e. ácidos grasos, ceramidas y colesterol*) (1,2,5). La calidad y cristalinidad, así como la cantidad de lípidos en el EC, determinan la perfección de la función barrera de la piel, para evitar o limitar, la entrada de sustancias extrañas en el cuerpo (*i.e. compuestos activos*) (5).

La organización laminar única del EC es la responsable del limitado paso de sustancias a través de la piel. Su estructura puede ser representada esquemáticamente como una pared de “ladrillo y cemento”, que semejan a las células del EC de naturaleza hidrofílica rodeadas por lípidos intercorneocitarios que llenan los espacios extracelulares (Figura 3) (6,7).

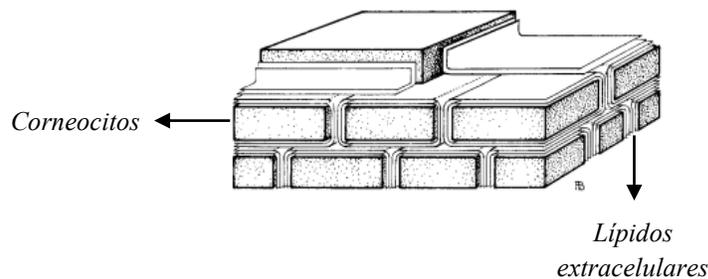


Figura 3. Representación gráfica del modelo “ladrillo y cemento” del estrato córneo (7).

1.2 Vías de administración tópica

La estructura compacta del EC es el principal obstáculo para el paso de compuestos a través de la piel (5). Sin embargo, la piel ha sido ampliamente utilizada para la administración tópica de activos, con base en las siguientes ventajas: a) presenta una mayor área superficial, b) tiene un efecto local, c) evita el metabolismo de primer paso, y d) disminuye los efectos sistémicos secundarios (5,8,9).

Las guías para la absorción dérmica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) diferencian los procesos de penetración y permeación de la piel. La penetración es la

entrada de una sustancia en una capa o estructura en particular, como la entrada de un activo al EC para tener un efecto terapéutico local; mientras que la permeación es el paso de una sustancia a través de una capa hacia una segunda capa funcional, y estructuralmente diferente a la primera, para llegar al torrente sanguíneo y tener un efecto terapéutico sistémico (10,11).

En la Figura 4 se muestran las diferentes vías de permeación tópica:

- a) *Intercelular*: la cual se lleva a cabo a través de los lípidos extracelulares de las bicapas estructuradas del EC.
- b) *Transcelular*: se da a través de los corneocitos y los lípidos extracelulares.
- c) *Transapéndice*: ocurre a través de los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas (2,5).

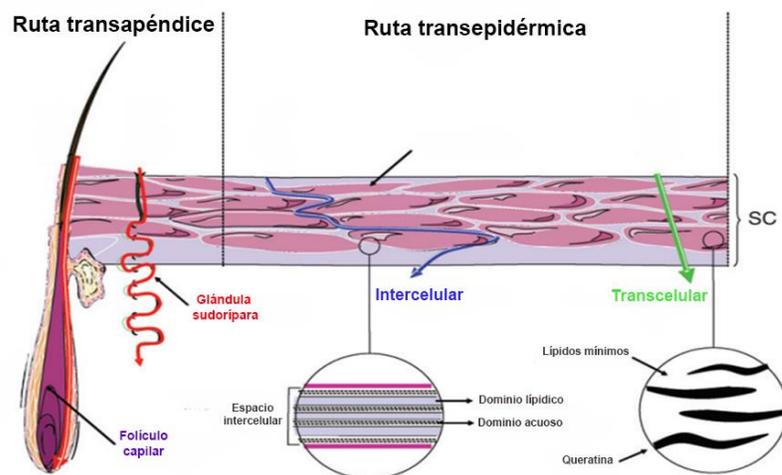


Figura 4. Vías de permeación tópica (2).

El paso de compuestos a través de la piel puede ser regulado o modificado por las propiedades fisicoquímicas de la molécula, tales como: coeficiente de partición (12), de permeabilidad (13) y la solubilidad del activo en la membrana (14). Otros factores que

también modifican la permeación/penetración de los activos es la presencia de promotores químicos de permeación (15,16), el estado físico del EC (17) y el tipo de formulación (9).

En este sentido, Chen y cols. en el 2014, evaluaron el coeficiente de partición de un péptido promotor de la penetración en la piel de cerdo, el péptido SPACE, el cual se ha utilizado para mejorar la administración tópica de una macromolécula, el ácido hialurónico (HA). En el estudio, se utilizó el método “shake-flask” modificado para evaluar el coeficiente de partición del péptido SPACE en el EC-epidermis. El método consistió en sumergir, durante 48 horas, una masa conocida de EC-epidermis en una disolución de buffer de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) con y sin péptido-SPACE marcado con fluoresceína para su posterior cuantificación por espectroscopia de fluorescencia. El coeficiente de partición del péptido entre el PBS y el EC-epidermis fue de 9.8 ± 1.5 , mientras que entre PBS y la epidermis fue de 4.3 ± 0.2 . El coeficiente de partición del péptido-SPACE fue mayor en la epidermis lo cual puede ayudar a la penetración del péptido, permitiendo así una penetración significativa del HA en la piel (12).

Estudios han evaluado el efecto del estado físico de la piel en la liberación de fármacos. Van Bocxlaer y cols., caracterizaron la fisiología e integridad de la barrera de la piel de ratón BALB/c infectada con *Leishmania major* y su afectación en el suministro de fármacos (cafeína-ibuprofeno, buparvacona y paromomicina) en la piel. Realizaron una evaluación histológica de las diferencias estructurales entre la piel no infectada e infectada usando diversas técnicas de tinción. Se evaluó el pH de la piel, la

hidratación y la pérdida transepidérmica de agua (*TEWL*), durante la progresión de la formación del nódulo de leishmaniosis cutánea. Además, se evaluó la influencia de la infección en el suministro de fármacos a través de la piel con celdas de difusión de Franz. Se observó que la piel dañada por leishmaniosis generó cambios estructurales en las capas epidérmicas, así como un aumento significativo en la *TEWL*. De igual forma, la permeación *in vitro* de los cuatro fármacos fue significativamente mayor en la piel infectada que en piel no infectada. Los autores concluyen que el estado físico de la piel infectada produce importantes cambios en la fisiología, así como en la permeabilidad de la barrera de la piel a los fármacos (18).

Como se ha mencionado, la función de la piel es protectora y actúa como principal barrera en el paso de sustancias exógenas, debido a esto es indispensable el uso de sistemas transportadores de activos que favorezcan su interacción con la piel; y así garantizar su actividad biológica.

1.3 Sistemas nanoparticulados como vehículos de activos

En la actualidad, la nanoencapsulación representa un enfoque factible y eficiente para modular la liberación de activos (19), aumentar la estabilidad física de las sustancias, evitar la degradación por interacción con el medio ambiente (i.e. *humedad, luz, oxígeno*), disminuir su volatilidad y aumentar su bioactividad (20). En la Tabla 1 se muestran algunas ventajas que han presentado los sistemas nanoparticulados.

Tabla 1. Ventajas de la nanoencapsulación de compuestos biológicamente activos.

Compuesto	Aplicación	Ventajas	Referencia
AE de <i>Melaleuca alternifolia</i>	Antiséptico	Disminución de la volatilidad de los componentes y mejora en la estabilidad	(21)
AE de <i>Lippia sidoides</i>	Larvicida	Liberación sostenida favorece la actividad larvicida	(22)
Eugenol	Antioxidante	Mejora la estabilidad térmica del compuesto	(23)
AE de <i>Mentha piperita</i>	Antimicrobiana	Favorece la actividad antimicrobiana y en la estabilidad del AE	(24)
Naproxeno	Analgésico	Reducción de la absorción sistémica y aumento de la concentración tópica	(25)
AE de <i>Nigella sativa</i>	Antiinflamatoria	Potenciar los efectos analgésicos y antiinflamatorios de la indometacina	(26)
AE de clavo (<i>Eugenia caryophyllata</i>)	Antifúngica	Liberación controlada y mejora de la actividad antifúngica del AE	(27)
AE de <i>Thymus capitatus</i>	Antimicrobiana	Favorece la actividad antimicrobiana	(28)

AE: Aceite esencial

Como se puede observar en la Tabla 1, las propiedades fisicoquímicas de los sistemas nanoparticulados permiten incorporar compuestos de diversa naturaleza (*i.e. aceites esenciales y/o compuestos activos aislados*) y polaridad (extractos) (29).

Para incorporar componentes de origen natural (*i.e. extractos, aceites esenciales*) con diferente polaridad, se han desarrollado diferentes nanotransportadores (Figura 5) (9,30,31).

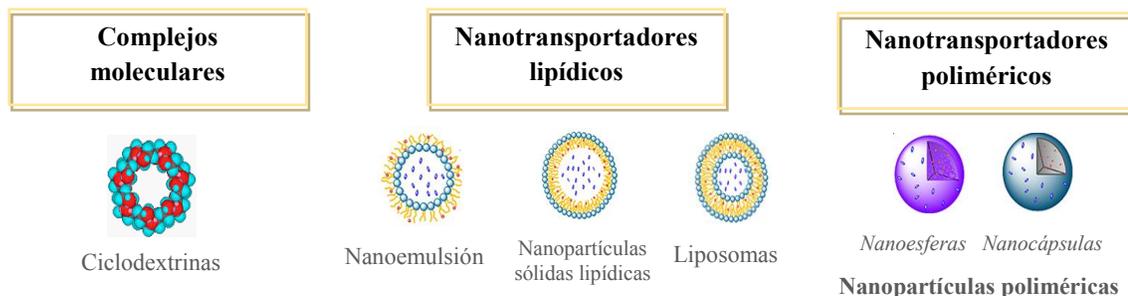


Figura 5. Sistemas nanométricos utilizados para la liberación de activos.

1.3.1 Complejos moleculares

Ciclodextrinas: La β -ciclodextrina es el tipo más común de ciclodextrina, consiste en 7 unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1,4) que forman una estructura con una cavidad central básicamente lipofílica y superficie exterior hidrofílica (32).

En el 2014, Kfoury y cols., investigaron complejos de inclusión de un componente de aceites esenciales, el trans-anetol (AN), con α -ciclodextrina (α -CD) y β -ciclodextrina (β -CD). La solubilidad en agua de AN se mejoró significativamente tras la complejación con α y β -CD. Además, la degradación de AN, inducida por irradiación con UV-C, se redujo notablemente mediante la formación de complejos de inclusión de α y β -CD. Los resultados mostraron que la encapsulación en α y β -CDs fue una forma eficaz de aumentar la solubilidad y la estabilidad de AN, parámetros de calidad indispensables para su aplicación en la industria de alimentos y/o farmacéutica (32).

1.3.2 Nanotransportadores lipídicos

- a) *Nanoemulsión*: Consisten en finas dispersiones estables con tamaño entre 20 y 200 nm, constituidos por dos o más componentes inmiscibles entre sí, y uno o más agentes tensoactivos (33). Mostafa y cols., en el 2015, formularon nanoemulsiones con el aceite esencial obtenido de *Cuminum cyminum*, observaron una liberación controlada *in vitro* del aceite esencial y un incremento en la actividad antioxidante *in vitro* y hepatoprotectora *in vivo* (33).
- b) *Nanopartículas sólidas lipídicas*: Las nanopartículas lipídicas están formadas por una matriz de lípidos biodegradables que son bien tolerados fisiológicamente y emulsificantes dispersos en un medio acuoso. Se diferencian de las nanoemulsiones en que poseen un núcleo sólido lipídico (30). Daneshmand y cols., en el 2018, prepararon nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) con aurapteno (AUR-SLN) con el objetivo de mejorar su efecto antiinflamatorio. Las AUR-SLN se compararon con cremas convencionales de AUR libre con relación a la tasa de permeación y el efecto antiinflamatorio a través de estudios *in vitro* e *in vivo*. Los estudios de permeación *in vitro* en piel de ratón mostraron que las AUR-SLN mejoraron significativamente la permanencia cutánea de AUR en comparación con el AUR libre en cremas, la acumulación de fármaco en la piel fue de 44.64 g cm^{-2} y 133.77 g cm^{-2} después de 24 h, para AUR-libre y AUR-SLN, respectivamente. Las AUR-SLN presentaron una liberación sostenida con una mínima penetración a través de la epidermis y la mayor localización en la epidermis sin causar sensibilización, lo cual permitió un efecto antiinflamatorio óptimo en la piel (34).

c) *Liposomas*: Son vesículas esféricas con diámetro entre 25 y 500 nm, conformadas por un centro ocupado por una cavidad acuosa y una envoltura constituida por un número variable de capas bimoleculares a base de fosfolípidos. Estas presentan carácter anfifílico, por lo que son capaces de transportar activos hidrofílicos y lipofílicos (35). En el 2015, Sebaaly y cols., desarrollaron formulaciones adecuadas de vesículas naturales de fosfolípidos de soja para mejorar la estabilidad del aceite esencial de clavo y su componente principal, el eugenol. Se determinó que los liposomas protegían el eugenol de la degradación inducida por la exposición a los rayos UV; además, mantenían su actividad de captura del radical DPPH. Se estableció que los liposomas constituyen un sistema adecuado para la encapsulación de componentes volátiles inestables de aceites esenciales (36).

1.3.3 Nanotransportadores poliméricos

Las nanopartículas poliméricas (NPs) se definen como sistemas sólidos coloidales con un tamaño inferior a 1 μm , en donde el activo (fármaco o producto natural) puede estar disuelto, atrapado, encapsulado o absorbido a una matriz polimérica (37).

En la Figura 6 se muestran los tipos de NPs, de acuerdo a su morfología y arquitectura:

- a) *Nanoesferas*: son sistemas matriciales en donde el activo puede ser absorbido en la superficie o atrapado dentro de la partícula.
- b) *Nanocápsulas*: son sistemas vesiculares en las que el activo se limita a una cavidad que consiste en un núcleo líquido interior rodeado por una membrana polimérica (38,39).

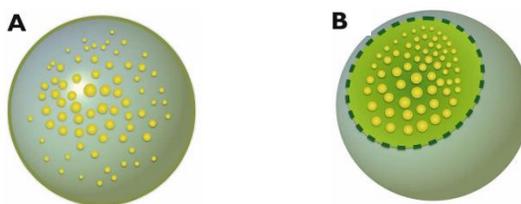


Figura 6. Tipos de nanopartículas: A) nanoesferas y B) nanocápsulas (39).

En particular, las NPs son muy estables debido a la rigidez de su matriz polimérica y a la capacidad de mantener su estructura por largos periodos de tiempo cuando son aplicadas tópicamente (10). Por ejemplo, en el 2004, Lboutounne y cols., investigaron el transporte de NP de poli-(ϵ -caprolactona) cargadas con clorhexidina a través de la piel de rata en celdas de difusión estática. El transporte de nanocápsulas dentro de los conductos cutáneos se observó por microscopía confocal de barrido laser (CSLM, por sus siglas en inglés) y se concluyó que la rigidez de los nanotransportadores permitía una liberación controlada de la clorhexidina en la piel (40).

En particular, las nanocápsulas poliméricas (NC), son de especial interés para la aplicación en piel, ya que gracias a su tamaño, es posible aumentar la residencia y el contacto directo de las NC con la superficie de la piel, lo cual favorecería la liberación del activo en el EC y los apéndices de la piel, y por lo tanto, su actividad biológica (41). En el 2004, Álvarez-Román y cols., prepararon NC cargadas con metoxicinamato de octilo (OMC) por deposición interfacial, así como emulsiones. La penetración del OMC en el EC a partir de las NC fue 3.4 veces mayor que la de la emulsión. Los autores sugirieron que la actividad termodinámica de las moléculas de OMC nanoencapsuladas, en comparación con las formulaciones en disolución, podría ser más alta facilitando así

su partición en la membrana. Además, la gran área superficial de los sistemas nanoparticulados también puede desempeñar un papel importante en la penetración dérmica y facilitar el contacto de las moléculas encapsuladas con el estrato córneo (42).

De igual forma, las NP también han sido utilizadas como vehículo para mejorar la penetración en piel de diferentes productos naturales como los son extractos, aceites esenciales y/o sus componentes activos. En este sentido, Tachaprutinun y cols., en el 2014, desarrollaron formulaciones de diferente polaridad (base acuosa y emulsión) del extracto de *Garcinia mangostana* Linn (GML) libre como el extracto de GML encapsulado en NP de etilcelulosa o metilcelulosa. Las NP cargadas con extracto mostraron un tamaño medio de 625 ± 20 nm y un potencial zeta de 3.6 ± 0.2 mV. La profundidad de penetración folicular se determinó mediante CSLM y por microscopia de contraste de interferencia diferencial, además, se utilizó la técnica de *tape stripping* para comparar las propiedades de distribución de GML en la piel de cerdo. Se determinó que el extracto de GML encapsulado y libre en emulsión se localizaba a mayor profundidad en los folículos capilares que cuando se aplicaba en la base acuosa. Además, se observó que el GML incorporado en las NP presentaba una distribución más homogénea en el EC en comparación con el GML libre. Los resultados mostraron que el GML en NP, presentaba un nivel de penetración más efectivo en la piel de oreja de cerdo (43).

Por otro lado, en el 2019, Barbosa y cols., desarrollaron nanopartículas de fucoidan/quitosano en diferente relación en peso para la liberación tópica de metotrexato (MTX) para el tratamiento de enfermedades inflamatorias relacionadas con la piel. Los estudios de permeación *in vitro* en piel de oreja de cerdo mostraron que el MTX

encapsulado permeó la barrera cutánea alcanzando después de 6 h, en una relación de 2.7 a 3.3 veces mayor en relación con el MTX libre. La NP de fucoidan/quitosano, presentaron una inhibición significativa de las citosinas pro-inflamatorias y aumentaron la permeación en la piel. Por lo que las NP se consideran potenciales nanotransportadores para la administración tópica de MTX para el tratamiento de enfermedades inflamatorias relacionadas con la piel (44).

Cabe mencionar que la nanoencapsulación de activos también modifica su liberación en función del tiempo. En la Tabla 2 se presentan algunos de los estudios de la cinética de liberación de activos encapsulados, así como sus ventajas.

Tabla 2. Estudios de liberación *in vitro* de activos nanoencapsulados.

Activo	Encapsulación	Ventajas	Referencia
Carvacrol	Nanocápsulas	La cinética de liberación se caracterizó por un efecto de liberación rápido (60% del carvacrol se liberó después de 3 h), y una posterior liberación prolongada (95% después de 24 h), con lo que asegura su efecto antimicrobiano.	(45)
AE de <i>Origanum vulgare</i>	Nanopartículas	El perfil de liberación <i>in vitro</i> se describió como un proceso bifásico de dos etapas, con una liberación inicial ráfaga, seguida de una liberación posterior más lenta, prologando el tiempo de liberación del AE.	(46)
AE de <i>Schinus molle</i>	Nanopartículas	El perfil de liberación <i>in vitro</i> del AE se describió como un proceso bifásico de dos etapas, que prolongo la liberación del AE.	(47)
Dexametasona	Nanopartículas	La liberación del fármaco fue pH-dependiente, alcanzado una liberación del 100% a las 25 h en un pH cercano al pH de disolución de las NP.	(48)
Anfotericina B	Nanopartículas	La liberación controlada del fármaco en SLN permitió una mayor retención del activo en piel (36.5% en 24 h) comparada con una nanoemulsión (23% en 24 h).	(49)
AE de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Nanopartículas	La liberación <i>in vitro</i> del AE encapsulado en un sistema binario de NP de quitosan/ciclodextrina β mostró una liberación sostenida y controlada durante más de 120 h, el cual permitiría mejorar la eficiencia de encapsulación y controlar la liberación del AE	(50)

AE: Aceite esencial

1.4 Antioxidantes en piel

La piel se encuentra constantemente expuesta al daño ocasionado por factores ambientales como la radiación ultravioleta (UV), el humo del tabaco y los contaminantes (5,51). Estos elementos agresivos generan especies reactivas de oxígeno (*EROS*) que a su vez son capaces de generar lo que se conoce como radicales libres, dando inicio a una perniciosa cadena de acontecimientos que ponen en peligro componentes celulares vitales, como el ADN de las células, afectando la apariencia y la salud de la piel a largo plazo (52–54). En la Figura 7 se muestran los daños en la piel generados por la radiación UV.

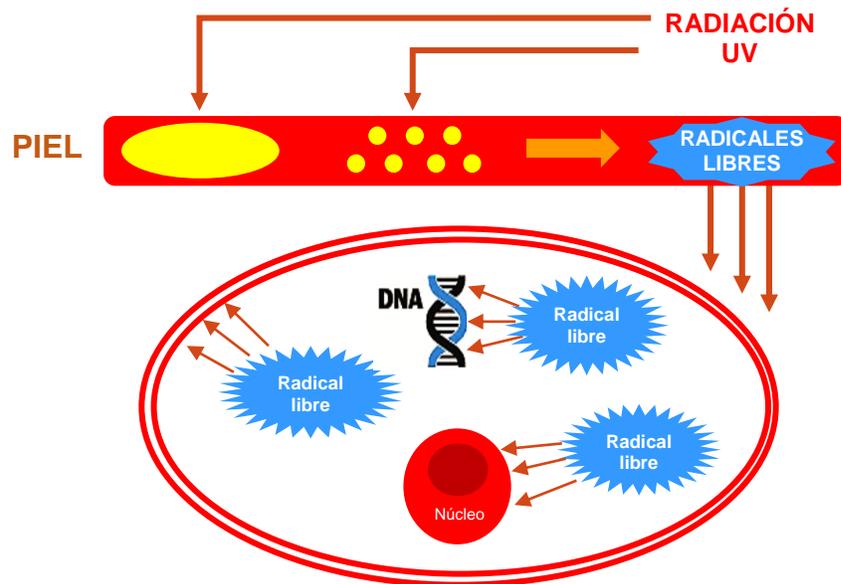


Figura 7. Representación gráfica de daños en la piel generados por la radiación UV.

De forma natural, la piel cuenta con sistemas antioxidantes que actúan contra la generación de estas especies. Estos sistemas pueden ser enzimáticos y no enzimáticos,

dentro de los antioxidantes enzimáticos están la catalasa (CAT), el glutatión peroxidasa (GPx) y el glutatión reductasa (GRd) que presenta una actividad más alta en la epidermis que en la dermis. Mientras que, los antioxidantes no enzimáticos, pueden ser de carácter lipofílico, como α -tocoferol, ubiquinol y la ubiquinona, o de carácter hidrofílico como el ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico y el glutatión reducido (53).

Sin embargo, en ocasiones estos mecanismos no son completamente eficaces y esta limitación se hace gradualmente más pronunciada con la edad, lo que desencadena procesos oxidativos en la piel (53–56).

Con la finalidad de prevenir y/o minimizar los daños ocasionados en la piel, se ha propuesto el uso de agentes antioxidantes externos de origen sintético o natural. Estudios toxicológicos han demostrado que el uso de antioxidantes sintéticos podría tener efectos tóxicos y ser promotores de algunos tipos de cáncer, entre otros efectos fisiológicos. Por esa razón, recientes investigaciones se han centrado en el estudio de productos naturales con la finalidad de extraer agentes antioxidantes naturales, como los aceites esenciales (53,54).

1.5 Antioxidantes de origen natural: aceites esenciales

La búsqueda de antioxidantes naturales ha dado lugar a un gran número de estudios sobre el potencial antioxidante de los aceites esenciales (AE) (Tabla 3) (57–59).

Los AE son mezclas líquidas, volátiles y raramente coloreadas, solubles en lípidos y disolventes orgánicos con una densidad generalmente inferior a la del agua, obtenidos a partir de plantas aromáticas como metabolitos secundarios (59,60). Son compuestos naturales complejos que pueden ser obtenidos usualmente por hidrodestilación o destilación a vapor (60).

El perfil químico de los AE difiere en el número y el tipo de componentes, según el método de extracción seleccionado. El producto de extracción puede fluctuar en calidad, cantidad y composición según el clima, la composición del suelo, el órgano de la planta, la edad y la etapa del ciclo vegetativo (61). En este contexto, Salazar y cols., en el 2015, reportaron diferencias en la proporción de los componentes mayoritarios del AE de *Thymus vulgaris* recolectado en Santiago, N.L. (timol 39.8% y o-cimeno 30.5%), comparado con la proporción del AE de *T. vulgaris* obtenido en Murcia, España (timol 57.7% y o-cimeno 26%) por Rota y cols. Los autores indican que las diferencias pueden ser debidas a diferentes tiempos de colecta y/o condiciones de clima en el sitio de colecta (62).

Los AE pueden contener entre 20 y 60 componentes (monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos, entre otros) en un intervalo de concentraciones muy diferentes. Se caracterizan por tener dos o tres componentes mayoritarios que constituyen entre el 20 y el 70% de la proporción total de los componentes, mientras que el resto de componentes pueden estar presentes en cantidades traza (57,60).

Dado el creciente interés por el uso de antioxidantes naturales que puedan sustituir los antioxidantes sintéticos, los AE resultan una prometedora alternativa de origen natural. En la Tabla 3 se muestran diversos AE evaluados por su potencial aplicación como agentes antioxidantes en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria.

Tabla 3. Aceites esenciales evaluados por su aplicación como agente antioxidante.

Aceite esencial	Resultados	Referencia
<i>Salvia officinalis</i>	El AE presentó valores altos para el ensayo de quelación de iones ferrosos, con un porcentaje de quelación del hierro III de $72.29 \pm 0.65\%$.	(63)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	En esta investigación, el AE presentó valores altos para el ensayo de quelación de iones ferrosos, con un porcentaje de quelación del hierro III de $76.06 \pm 0.54\%$.	(63)
	El AE presentó una neutralización del radical DPPH (IC ₅₀) con una concentración del $3.82 \mu\text{g/mL}$.	(64)
	Para el ensayo de DPPH, el AE mostró un porcentaje inhibición del DPPH de $61.00 \pm 2.30\%$ at $300 \mu\text{g/ml}$, el cual fue ligeramente menor que el del butilhidroxitolueno (BHT), empleado como control positivo.	(65)
<i>Origanum vulgare</i>	El AE demostró una reducción del 50% del radical DPPH (IC ₅₀) con una concentración del $0.17 \mu\text{g/mL}$.	(66)
	El AE mostró una fuerte actividad antioxidante (IC ₅₀ = $2.5 \mu\text{g/mL}$), comparado con estándares de antioxidantes de Vitamina E y hidroxibutilanisol (BHA) ($p < 0.05$).	(67)

<i>Thymus vulgaris</i>	El AE mostró un alto porcentaje de inhibición de TBARS del $89.84 \pm 0.20\%$ a una concentración de 50 g/l. Mientras que el porcentaje de inhibición del radical DPPH fue de $93.94 \pm 0.02\%$ a la misma concentración.	(63)
	El AE demostró una reducción del radical DPPH (IC_{50}) con una concentración del $0.19 \mu\text{g/mL}$.	(66)
<i>Lavandula angustifolia</i>	El AE presentó la mejor actividad de captura del radical DPPH con un porcentaje de $93.4 \pm 1.55\%$, similar al ácido ascórbico, empleado como referencia, el cual presentó un porcentaje de actividad de $96.5 \pm 2.31\%$. El AE fue significativamente más efectivo para inhibir la peroxidación del ácido linoleico después de 10 días de prueba, con un porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación de 58.2%	(68)
<i>Mentha piperita</i>	El AE demostró una considerable actividad de captura del radical ABTS con un porcentaje de $87.7 \pm 2.63\%$ en comparación con el control estándar de Trolox® (0.14 mM) el cual presentó un porcentaje de captura del radical de $94.7 \pm 0.06\%$.	
<i>Montanoa speciosa</i>	El AE de hojas de <i>Montanoa speciosa</i> exhibe una alta capacidad de captura del radical DPPH ($72.85 \pm 0.28 \text{ mmol TE/g}$ aceite esencial), mientras que el AE de las hojas mostró menor actividad ($68.43 \pm 0.10 \text{ mmol TE/g}$ aceite esencial).	(69)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	El AE fue capaz de reducir el radical DPPH con una EC_{50} de $48.35 \mu\text{g/mL}$, mostró una inhibición de la lipoperoxidación con una IC_{50} de $135.9 \mu\text{g/mL}$, y eliminó los radicales hidroxilos con un EC_{50} de $43.71 \mu\text{g/mL}$.	(70)
<i>Citrus lumia</i>	La OE mostró fuertes propiedades antioxidantes y de eliminación de radicales libres, mediante los ensayos de β caroteno y ORAC, con un IC_{50} de $22 \mu\text{g/mL}$ y $46 \mu\text{g/mL}$, respectivamente	(71)

AE: Aceite esencial

Es importante mencionar que, debido a la complejidad química de los AE, los ensayos de actividad antioxidante pueden mostrar resultados diferentes dependiendo del método empleado, por lo que la evaluación de la actividad debe realizarse con al menos dos ensayos antioxidantes complementarios.

1.5.1 Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales

De forma general, la actividad antioxidante es definida como la capacidad de una sustancia para inhibir o retardar la degradación oxidativa (59,72).

Existen diferentes ensayos *in vitro* para evaluar la actividad antioxidante de aceites esenciales. Dentro de los ensayos con actividad antioxidante, las técnicas fundamentadas en el uso de radicales como el DPPH· y ABTS^{•+} son los métodos espectrofotométricos más empleados, debido a que los procedimientos requeridos en estas metodologías son simples, rápidos, sensibles y reproducibles. En la Tabla 4 se muestra un resumen de los ensayos *in vitro* comúnmente utilizados.

Tabla 4. Ensayos *in vitro* para determinar la actividad antioxidante de AE.

Ensayo	Fundamento	Referencia
Método del radical catiónico ABTS^{•+}	Se basa en la capacidad de captación de los antioxidantes por el catión radical ABTS ^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). Se emplea un espectrofotómetro a $\lambda = 600-750$ nm. Se determina la disminución de la absorbancia debida a la decoloración del radical. Se utiliza Trolox [®] como sustancia patrón.	(59,73–75)
Método del radical DPPH·	Se basa en la reducción del radical DPPH· (α -difenil- β -picrilhidrazilo) por los compuestos antioxidantes en la muestra. Se emplea un espectrofotómetro a $\lambda_{\text{máx}} = 517$ nm. Se monitorea la coloración del radical (púrpura a amarillo). Se emplea Trolox [®] como sustancia patrón.	(63,64,74,76)
Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP, por sus siglas en inglés)	Se basa en la evaluación de la capacidad de un antioxidante para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}). Se mide un incremento en la absorbancia a una $\lambda_{\text{máx}} =$	(63,74,75,77)

	593 nm, que se desarrolla cuando el complejo TPTZ-Fe ⁺³ se reduce. Como sustancia patrón puede emplearse Trolox®, ácido ascórbico, ácido gálico y/o disolución de Fe ⁺² (FeSO ₄ ·7H ₂ O).	
Método fosfomolibdeno	El ensayo se basa en la reducción del Mo (VI) a Mo (V) por los analitos presentes en la muestra, y la posterior formación de un complejo verde de fosfato/Mo (V) en pH ácido a $\lambda_{\text{máx}}= 695$ nm.	(78)
Método de TBARS (Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico)	Se basa en la determinación del contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés). Se utiliza un espectrofotómetro a $\lambda_{\text{máx}}= 532$ nm, para monitorear la formación de un producto color rosa resultado de la adición de ácido 2-tiobarbitúrico con malonaldehído.	(63,79,80)
Inhibición de la lipoperoxidación del ácido linoleico	La inhibición de la peroxidación del ácido linoleico por el método de tiocianato férrico se basa en la formación de peróxidos que permiten la oxidación de Fe ⁺² a Fe ⁺³ . Estos iones forman un complejo con el tiocianato, el cual presenta absorbancia a $\lambda_{\text{máx}}= 500$ nm. Valores altos de absorbancia indican la peroxidación de la emulsión de ácido linoleico.	(81–83)

1.5.2 *Rosmarinus officinalis*

El romero (*R. officinalis*, L.) es una planta mediterránea cuyo término se deriva del griego “*rhops* y *myrinos*” que significa “arbusto marino”. Pertenece a la familia Lamiaceae (Labiadas), es una planta arbustiva con tallos prismáticos, las hojas son estrechas, agudas y pequeñas, tienen forma de espigas de color verde brillante con márgenes revolutos y tallos leñosos y ramificados (Figura 8).



Figura 8. Planta de *Rosmarinus officinalis*.

Se han reportado diversos componentes principales del AE de *R. officinalis*, dentro de los cuales se encuentran el α -pineno, 1,8-cineol, alcanfor y borneol (84,85).

En el 2014, Rašković y cols., evaluaron la composición del AE de *Rosmarinus officinalis*, mediante cromatografía de gases (CG) acoplada a un detector de ionización de llama (CG-FID) y espectrometría de masas (CG/MS), así como la actividad antioxidante mediante la prueba de DPPH. Los principales compuestos identificados y cuantificados por CG-FID y CG-MS fueron el 1,8-cineol (43.77%), alcanfor (12.53%), α -pineno (11.51%), β -pineno (8.16%), canfeno. (4,55%) y β -cariofileno (3.93%). Se evaluó la actividad antioxidante del AE y se estableció un IC₅₀ de 77.6 μ L/mL, y para el control utilizado, α -tocoferol, se obtuvo un IC₅₀ de 25.3 μ g/mL. Se estableció una actividad antioxidante relativamente alta para el AE de *R. officinalis* (86).

1.5.3 *Lavandula dentata*

La lavanda (*L. dentata*, L.) es una planta perenne de la familia Lamiaceae (Figura 9), son arbustos de hojas opuestas, flores hermafroditas y fruto compuesto de cuatro núculas o aquenios (tetraquenio) (87).



Figura 9. Planta de *Lavandula dentata*.

En el 2018, Justus y cols., analizaron la composición química del AE de *L. dentata*, así como la actividad antioxidante y antimicrobiana. La caracterización del AE mediante CG-FID y CG/MS determinó como componente mayoritario el 1,8-cineol (63.25%). El AE demostró potencial antioxidante por el método del fosfomolibdeno, en comparación con los estándares de rutina ($28.11 \pm 1.95\%$), mientras que se detectó una baja capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS. De igual manera, se demostró un alto potencial antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y *Candida albicans* (88).

Sin embargo, los AE son altamente sensibles a la degradación, se descomponen fácilmente debido a la exposición directa al calor, humedad, luz y oxígeno, por lo que deben ser protegidos para mantener su actividad biológica. Además, dada la naturaleza volátil de los AE, la nanoencapsulación es una estrategia tecnológica para facilitar su aplicación en membranas biológicas, y probablemente reducir la toxicidad y los efectos secundarios de algunos componentes (42,89).

En la Tabla 5 se enlistan algunos aceites esenciales y/o componentes formulados en diferentes sistemas nanométricos para su aplicación biológica.

Tabla 5. Aplicaciones de los sistemas nanométricos de liberación con aceite esenciales y/o sus componentes.

Naturaleza del nanotransportador	Tipo	Aplicación	Referencia
Complejos moleculares	<i>β-Ciclodextrinas</i>	Los AE de albaca y estragón, los cuales contienen 4-alilanol, fueron encapsulados en diversos tipos de ciclodextrinas (α , β y metilada al azar). Se demostró que este tipo de sistemas proporcionan una liberación controlada del 4-alilanol, así como un incremento en la actividad de captación del radical DPPH y la fotoestabilidad del compuesto.	(32)
Lipídicos	<i>Nanoemulsiones</i>	El AE obtenido de <i>Cuminum cyminum</i> se incorporó en nanoemulsiones, las cuales proporcionaban una liberación controlada del activo e incrementaban la actividad antioxidante y hepatoprotectora del mismo.	(33)
	<i>Nanopartículas sólidas lipídicas</i>	El AE de <i>Yuxingcao</i> se encapsuló en SLN, las cuales presentaron una liberación sostenida <i>in vitro</i> por hasta 48, demostrando que pueden mantener la administración por inhalación del AE y mejorar su biodisponibilidad local.	(90)
		El AE de <i>Artemisia arborescens</i> se encapsuló en SLN, las cuales mostraron una liberación lenta del aceite esencial en comparación con una emulsión de referencia.	(30)
Poliméricos	<i>Nanocápsulas</i>	El AE de <i>Rosmarinus officinalis</i> fue incorporado en nanocápsulas de policaprolactona para reducir su volatilización, la sensibilidad a la luz y mejorar su solubilidad en agua.	(91)
	<i>Nanoesferas</i>	El timol fue encapsulado en nanoesferas de etil/metilcelulosa. El uso de timol encapsulado en lociones cosméticas proporcionó una supresión total del crecimiento viable de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> durante un período de prueba de 3 meses, mayor al mostrado por el timol sin encapsular.	(92)

1.6 Evaluación dermatocinética *in vitro* de los AE en piel

En 1998, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) publicó una guía que propone el estudio de la *dermatofarmacocinética* (DPK, por sus siglas en inglés) para evaluar la biodisponibilidad y/o bioequivalencia *in vivo* de los productos dermatológicos tópicos. La dermatofarmacocinética permite establecer la cantidad del activo que se encuentran en cada capa del EC (capa más superficial de la piel), en función del tiempo posterior a la aplicación y la eliminación de la formulación aplicada tópicamente. Se obtiene el perfil de concentración en función del tiempo a partir del cual se puede obtener la cantidad máxima en el EC ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo en el que se observa $C_{m\acute{a}x}$ (es decir, $T_{m\acute{a}x}$) y el área bajo la curva (AUC) (93–95).

Cuando se aplican formulaciones por vía tópica, se debe evaluar la permeación y/o penetración de compuestos en la piel. En el 2001, Kalia y cols., presentaron modelos matemáticos para describir la liberación transdérmica de activos a partir de diferentes escenarios de formulación. Por ejemplo, analizaron un escenario de liberación cuando el EC representa la barrera que limita la velocidad de la liberación del activo. En este sistema, la membrana se encuentra inicialmente desprovista de activo, y después de cierto tiempo posterior a su aplicación, se puede calcular la cantidad de activo que pasa a través de la cara interior del EC hacia epidermis viables (EV) durante un tiempo determinado. Los autores resumen que los modelos de transporte se basaron en la segunda ley de difusión de Fick, que permite predecir la forma en que la difusión causa que la concentración de un activo cambie con el tiempo. Su aplicación en estudios de

liberación en piel, permite establecer la cinética de liberación de un activo a través de una membrana homogénea en las condiciones de entorno apropiadas (14).

1.6.1 Pruebas de permeación en piel

La permeación y/o penetración del compuesto a través de piel en condiciones “*ex vivo*” se utiliza para predecir la absorción percutánea en humanos. Las celdas de difusión de Franz (Figura 10) son los sistemas comúnmente utilizados para evaluar la permeación y/o penetración del compuesto a través de piel (10).

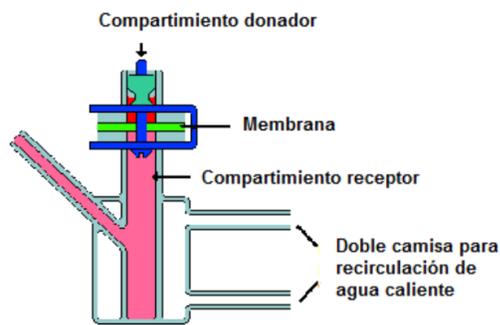


Figura 10. Celda de difusión vertical de Franz.

Se han utilizado membranas de origen animal, como la piel de cerdo (*i.e. oreja*) cuyas propiedades bioquímicas e histológicas (*i.e. composición lipídica y espesor epidérmico*) son similares a la piel humana (10,96). Estudios cualitativos y cuantitativos han demostrado que la epidermis viable de la piel de oreja de cerdo presenta un espesor promedio de 72 μm comparado con el espesor humano promedio de 70 μm (hombro) y 82 μm (glúteo) (97). Dado que comparte propiedades morfológicas esenciales con la piel humana, la piel de cerdo es aceptada y validada por el Comité Científico de Productos

Cosméticos y Productos no Alimentarios (SCCNFP, por sus siglas en inglés) de la Unión Europea, como uno de los mejores modelos animales para la medición *in vitro* de absorción percutánea (98).

En el 2002, Sekkat y cols., realizaron un estudio biofísico *in vitro* de la piel de oreja de cerdo y su comparación con la piel humana, evaluaron la función barrera del EC durante su remoción progresiva por la técnica de *tape stripping* usando las técnicas de pérdida de agua transepidérmica (*TEWL*) y espectroscopia de impedancia. Los valores de la *TEWL* incrementaron conforme se aumentó la eliminación del EC. En contraste, la impedancia de la piel disminuyó exponencialmente en función de la eliminación progresiva del EC. Los autores establecen que la comparación de los resultados con los reportados (espesor de piel de cerdo $11.8 \pm 4.0 \mu\text{m}$ y de humano $10.9 \pm 3.5 \mu\text{m}$) para piel humana *in vivo* apoyaron la validez de la membrana porcina como un modelo *in vitro* (96).

1.6.2 Técnica de *tape stripping*

Es una técnica simple, eficiente y mínimamente invasiva que permite la remoción sucesiva de las diferentes capas del EC. Después de la aplicación tópica y la permeación de las formulaciones, las capas celulares del EC se remueven sucesivamente de la piel usando cintas adhesivas. Las cintas adhesivas contienen la cantidad de corneocitos removidos y la cantidad correspondiente del activo, que puede ser determinado por métodos de análisis químico (99).

En el 2004, Álvarez y cols., investigaron la penetración de un compuesto altamente lipofílico (OMC) en piel de oreja de cerdo, mediante la técnica de *tape stripping*. El OMC fue encapsulado en NP biodegradables de poli (ϵ -caprolactona). Realizaron experimentos de permeación y por *tape stripping* se evaluó la distribución de OMC encapsulado, en y a través de la piel porcina removida, mediante CSLM se visualizó la permeación de NP biodegradables de poli (ϵ -caprolactona) marcadas con rojo de Nilo. La encapsulación causó un aumento de 3.4 veces el nivel de OMC en el EC, lo cual aumento la “disponibilidad” del OMC en piel (42).

En el 2017, Zou y cols., evaluaron la penetración *in vitro* de NP de poliestireno marcadas con rojo fluorescente en piel humana dañada mediante la técnica de *tape stripping*. El análisis del grado de penetración de NP en piel se realizó por CSLM, se determinó que las NP se localizaron en el EC y los folículos capilares sin penetrar en la epidermis viable/dermis, concluyendo que la alteración de la barrera con *tape stripping* no indujeron una penetración más profunda (100).

1.6.3 Evaluación de la integridad de la piel

La administración tópica de activos requiere formulaciones seguras y no tóxicas para permanecer en la piel sin causar irritación, debido a esto es indispensable evaluar la integridad física de la misma y establecer que sus características biológicas no han sido alteradas.

Los parámetros fisiológicos de la piel han sido de relevante importancia en la evaluación de la inocuidad de las formulaciones con aplicación tópica. La determinación de diferentes parámetros de bioingeniería permite la evaluación del efecto de las formulaciones en la piel, dentro de los parámetros fisiológicos de la piel que pueden ser evaluados se encuentran:

- a) Pérdida de agua transepidérmica (*TEWL*, por sus siglas en inglés): es un método bien establecido en dermatología para evaluar la integridad de la barrera cutánea *in vivo* de la piel humana, basado en el principio físico de la Ley de difusión de Fick. Cuanto más perfecta sea la capa protectora de la piel, mayor será el contenido de agua y menor será la pérdida de agua transepidérmica. Cuando la piel está dañada, su función de barrera se ve afectada, resultando en una pérdida de agua más alta (8,18,65,101).
- b) pH: mide el pH de la superficie de la piel, el cual puede variar cuando se alteran las condiciones normales de la piel. El principio de medición es la evaluación potenciométrica, determinando la concentración de iones de hidrogeno (H^+) y iones hidroxilo (OH^-) (99,102).
- c) Hidratación del estrato corneo (EC): el principio para evaluar el contenido de humedad se basa en la medición de la variación de la constante dieléctrica del agua debido a la hidratación de la superficie de la piel que cambia la capacitancia de un condensador de precisión (102,103).
- d) Cantidad de sebo: el principio de medición es por un método fotométrico del punto de grasa. La cinta se pone en contacto con la piel, y ésta se vuelve transparente en

relación con la cantidad de sebo en la superficie del área de medición. La transmisión de luz se mide a través de una fotocélula antes de la aplicación (valor cero), se utiliza una película plástica en forma de cinta que se vuelve translúcida según la cantidad de SSL recolectada (valor medición) después de la aplicación de 30s en la piel bajo presión constante (102–104).

En el 2016, Pereira y cols., desarrollaron nanoemulsiones con aditivos de lanolina etoxilada (NE-EL) y acetilada (NE-AL), y evaluaron el efecto de estos aditivos en la hidratación (Corneometer[®] CM 820), cantidad de sebo (Sebumeter[®]) y pH (pHmeter Skin[®] PH 900) de la piel. Las nanoemulsiones a base de lanolina aumentaron la hidratación y la cantidad de sebo en la piel y no modificaron los valores del pH cutáneo. Los autores establecen que las formulaciones no fueron tóxicas debido a que no causaron irritación en la superficie de la piel después de la aplicación de nanoemulsión, mostrando potencial como portadores para aplicaciones farmacéuticas y cosméticas (103).

En la Tabla 6 se presentan los valores normales de los parámetros biofísicos de la piel humana determinados por técnicas de bioingeniería.

Tabla 6. Valores normales de los parámetros biofísicos de la piel humana (105).

Parámetro biofísico de la piel	Valor	Interpretación
Pérdida de agua transepidermica <i>TEWL</i> (g/m ² h)	0-10	Piel muy sana
	15-25	Piel en condición normal
	> 30	Piel en condición crítica
Contenido de agua del EC (unidades arbitradas)	< 50	Piel muy seca
	50 – 60	Piel seca
	> 60	Piel humectada
Cantidad de sebo (μg sebo/cm ²)	< 100	Piel seca (poco sebo)
	100 – 220	Piel normal
	> 220	Piel grasa
pH (unidades arbitradas)	5- 5.5	Piel normal

1.7 Antecedentes

Con base en las ventajas y beneficios que las NPs ofrecen en el área de dermatología, su aplicación sobre la superficie de la piel ha adquirido una gran relevancia. En particular, Álvarez y cols., en el 2004, realizaron estudios *in vitro* con piel de cerdo, en el cual se demostró que las NPs con diámetro mayor a 200 nm son capaces de acumularse principalmente en los folículos pilosos y en los pliegues de la piel, lo cual favorecería la liberación del activo en estos sitios diana (42).

En nuestro grupo de investigación, se evaluó el grado de penetración del clotrimazol (agente antimicótico) en la superficie de la piel de cerdo posterior a la aplicación de NPs cargadas con clotrimazol. Se estableció que la encapsulación de clotrimazol en las NPs favoreció la acumulación en la piel de cerdo comparada con el clotrimazol libre, lo cual aseguraría su actividad antimicótica durante más tiempo (106). De igual manera, se evaluaron las NPs biodegradables como reservorio del AE de *Magnolia grandiflora*, *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* a fin de aumentar su retención y penetración como una posible alternativa para mejorar el tratamiento de las micosis superficiales. Se estableció que la encapsulación de AE en NP, favorece la actividad antidermatofítica y disminuye su efecto citotóxico, probablemente debido a la liberación gradual delos AE sobre la superficie d la piel (107).

Otro estudio, también realizado en el grupo de trabajo, se enfocó en la obtención de NC con carvacrol, agente antioxidante volátil (presión de vapor de 2.5 hPa a 25°C y LogP(o/w) 3.81) con características idóneas para su futura aplicación en piel. Se desarrollaron NC cargadas con carvacrol con un tamaño promedio de 180 nm y se demostró que su nanoencapsulación favorece la estabilidad física y química del carvacrol por al menos 16 semanas. Además, en base a los ensayos de permeación *in vitro* en piel de cerdo y de *tape stripping* se propuso a las formulaciones de NC como sistemas acarreadores de agentes antioxidantes con presiones de vapor elevadas para su aplicación en piel (108).

1.8 Justificación

Debido al creciente problema de daños en la piel ocasionados por factores ambientales como la radiación ultravioleta (UV), es necesario el desarrollo de productos que permitan disminuir sus efectos negativos.

Los aceites esenciales, representan una alternativa antioxidante de origen natural que permitiría disminuir los daños provocados por los radicales libres en la piel, sin embargo, éstos deben ser protegidos ya que son volátiles y sensibles a la oxidación.

Las nanocápsulas poliméricas como sistema de liberación de aceites esenciales, serían capaces de favorecer el tiempo de residencia de los aceites esenciales en la piel, para que puedan llevar a cabo su efecto antioxidante.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Desarrollar formulaciones de nanocápsulas (NC) poliméricas cargadas con aceite esencial, establecer su actividad antioxidante, el perfil dermatocinético y la evaluación biofísica de la piel con técnicas de bioingeniería para determinar su potencial como dermoprotector preventivo.

1.9.2 Objetivos específicos

1. Determinar las características físicas y químicas de los aceites esenciales de *Lavandula dentata* y *Rosmarinus officinalis* obtenidos por hidrodestilación.
2. Formular nanocápsulas poliméricas con aceites esenciales de *Lavandula dentata* y *Rosmarinus officinalis* por la técnica de nanoprecipitación, y realizar su caracterización física y química.
3. Desarrollar y validar métodos analíticos por CG-FID para cuantificar los aceites esenciales en nanocápsulas poliméricas.
4. Evaluar la actividad antioxidante de los aceites esenciales libres y nanoencapsulados.
5. Evaluar el perfil dermatocinético de los aceites esenciales libres y nanoencapsulados con estudios *in vitro* de permeación y *tape stripping* en piel de cerdo.
6. Evaluar las propiedades biofísicas de la piel con técnicas de bioingeniería.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Equipos, Material y Reactivos

2.1.1 Equipos e instrumentos

- Balanza analítica (Scientech[®], modelo SM50)
- Baño recirculador de agua (LabTech[®], modelo LCB-6D)
- Celdas de Franz modificadas de 15 mL
- Cinta adhesiva para *tape stripping* (3M[®])
- Columna capilar de cromatografía de gases (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) (PerkinElmer[®], modelo Elite-5)
- Cromatógrafo de gases con inyector split/splitless acoplado a detector de ionización en llama (FID) (PerkinElmer[®], modelo Clarus480)
- Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (PerkinElmer[®], modelo Autosystem 6890N)

- Densímetro (AntonPaar[®], modelo DMA35)
- Espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific[®], modelo Genesys 10s)
- Espectrofotómetro IR-FT (Perkin Elmer[®], modelo Frontier Óptica)
- Hidrodestilador Clevenger modificado
- Membrana de celulosa regenerada
- Microcentrífuga (Labnet[®])
- Multisonda (Courage Khazaka[®], modelo MPA5)
- Placa de agitación multiplaza (IKA[®])
- Polarímetro (Perkin Elmer[®], modelo 341)
- Potenciómetro (Conductronic, modelo PC18)
- Purificador de agua (ELGA[®], modelo Purelab UHQ)
- Refractómetro (AntonPaar[®], modelo Abbermat 300)
- Rotavapor (Heidolph[®], modelo Laborota 400)
- Ultracentrífuga (Beckman Coulter[®], modelo 64R Allegra)
- Viscosímetro (Brookfield[®], modelo DVZTLV)
- Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments[®], modelo Zetasizer Nano-Zs90)

2.1.2 Material biológico

Aceite esencial extraído de las plantas de *Lavandula dentata* (Lavanda) y *Rosmarinus officinalis* (Romero) obtenidas en el Mercado Juárez, en Monterrey (recolectadas en sierra de Arteaga, Coahuila). Orejas de cerdo obtenidas del rastro municipal, el día del sacrificio del animal y conservadas en congelación (-4°C).

2.1.3 Reactivos

- 1,8-cineol >98% grado CG, marca Fluka[®]
- α -tocoferol $\geq 95.5\%$, marca Sigma-Aldrich[®]
- Acetona, grado HPLC, marca Baker[®]
- Ácido linoleico >99%, marca Sigma[®]
- Agua bidestilada, marca Laboratorio de Monterrey
- Alcanfor >95% grado CG, marca Aldrich[®]
- β -pineno 98.5% grado CG, marca Aldrich[®]
- Cloruro de metileno, grado HPLC, marca TEDIA[®]
- Cloruro ferroso tetrahidratado grado RA, marca Jalmek[®]
- 4-alilanisol >95% grado CG, marca Sigma-Aldrich[®]
- Eudragit E PO, marca Evonik Industries[®]
- Fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4), marca Fluka Chemika[®]
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), marca Acros Organics[®]
- Linalool >95% grado CG, marca Aldrich[®]
- Metanol grado HPLC, marca Fermont[®]
- Monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween-20), marca Sigma[®]
- Solución estándar de n-alcanos C8-C20, marca Sigma-Aldrich[®]
- Tiocianato de amonio, marca CTR[®]

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención y caracterización física y química de los AE de *Lavandula dentata* y *Rosmarinus officinalis*

a) Autenticación de plantas

Las plantas utilizadas para la obtención de los AE se adquirieron en el mercado Juárez en Monterrey, Nuevo León, y fueron autenticadas por el Herbario del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, de Universidad Autónoma de Nuevo León.

b) Obtención de los AE por hidrodestilación

Las hojas y tallos de las plantas frescas de *Lavandula dentata* (Lavanda) y *Rosmarinus officinalis* (Romero) fueron cortados y pesados. En un matraz bola se colocaron 100 g del material vegetal fresco y se conectó al equipo Clevenger modificado (Figura 11), para iniciar el proceso de hidrodestilación durante 4 h a partir de la ebullición del agua. El AE fue colectado, pesado y almacenado en un vial de vidrio ámbar a -4°C .

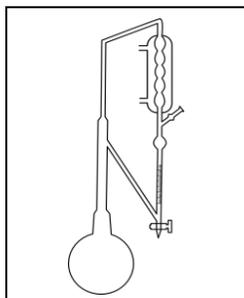


Figura 11. Equipo de hidrodestilación Clevenger modificado.

Posteriormente, se calculó el porcentaje de rendimiento de la extracción de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{\text{Peso del aceite esencial}}{\text{Peso de la planta}} \right) * 100$$

Fórmula 1

c) Caracterización física de los AE

- Índice de refracción

Se determinó el índice de refracción acuerdo al método general de análisis (MGA) 0741 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) (109). Se utilizó un refractómetro marca AntonPaar® modelo Abbermat 300, el cual se calibró con agua destilada a 25°C. Posteriormente, se depositó una gota de cada AE en el área de muestra y se obtuvo el resultado, se realizó por triplicado de manera independiente. Como controles se utilizaron los estándares (grado CG) de anetol, eugenol y R-limoneno.

- Rotación óptica

Se utilizó un polarímetro marca PerkinElmer, modelo 341 y se realizó en base al método MGA 0771 de la FEUM (109). Previo a la determinación, el equipo fue calibrado con una solución de sacarosa de 260 mg/mL a 25°C. Posteriormente, se llenó la celda de 1 mL de cada AE y se obtuvo el resultado por quintuplicado de manera independiente. Como controles se utilizaron los estándares (grado CG) de anetol, eugenol y R-limoneno.

- Densidad relativa

Se determinó en base al método MGA 0251 de la FEUM (109). Se empleó un densímetro marca AntonPaar® modelo DMA35, se llenó con 1 mL de cada AE y se determinó la densidad relativa del mismo a 25°C, por triplicado de manera independiente. Como controles se utilizaron los estándares (grado CG) de anetol, eugenol y R-limoneno.

d) Caracterización química de los AE

Se realizó el análisis cualitativo de cada AE mediante el uso de un cromatógrafo de gases (CG-MS) marca Agilent Technologies® modelo 6890N acoplado a un espectrómetro de masas selectiva 5973 INERT. Se utilizó una columna HP-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Las condiciones cromatográficas se establecieron en base a la elución de los alcanos (C-8 al C-20). La temperatura de la fuente de ionización fue de 230°C, la temperatura del cuádruplo de 150°C y la temperatura del inyector de 220°C en modo splitless. El programa de temperatura inició a 35°C, se mantuvo 9 min, después se elevó a una temperatura de 150°C (a 3°C/min) y se mantuvo por 10 min, posteriormente se elevó a 250°C (a 10°C/min) y finalmente se calentó hasta 270°C (a 3°C/min) durante 10 min. Se usó el helio con pureza del 99.99% como gas acarreador, con un flujo de 0.5 mL/min y una energía de ionización de 70eV. Los espectros de MS fueron adquiridos en modo scan (110). Esta rampa de temperaturas se utilizó para el análisis de los dos AE. Se inyectaron 2 µL de los AE de *L. dentata* y *R. officinalis*, de manera independiente, a una concentración de 2 mg/mL en diclorometano.

La identidad de los componentes se asignó por comparación de sus índices aritméticos (IA) e índice de Kovats (IK) con los n-alcanos de C-8 a C-20. Además, los espectros de masas de cada componente, se compararon con los espectros de masas de la biblioteca NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) de los EUA y con datos de referencia (111).

Para establecer el área de los componentes de los AE se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización en flama (CG-FID) Clarus 480, Perkin Elmer[®], se utilizó una columna Elite-5 (30 m × 0.25 mm x 0.25 μm). El método cromatográfico empleado fue el mismo que se empleó para el análisis por CG-MS. Se calculó el porcentaje de abundancia (%A) de los componentes de los AE relativo al área de la señal obtenida. Posteriormente, se seleccionaron los dos componentes “huella” con mayor %A en cada AE, para su cuantificación en las formulaciones de NC y en los estudios de permeación transdérmica. Se calculó la proporción de cada componente huella seleccionado en base a la normalización de áreas.

2.2.2 Obtención y caracterización fisicoquímica de NC y emulsiones con AE de *L. dentata* y *R. officinalis*

a) Obtención de nanocápsulas (NC) poliméricas

Las nanocápsulas con AE (NC-AE) fueron obtenidas por la técnica de nanoprecipitación desarrollada por Fessi y cols. (112), la cual consistió en inyectar una fase orgánica compuesta por un disolvente orgánico que contiene el polímero, y el AE de *L. dentata* o *R. officinalis*, en una fase acuosa con agitación constante (350 rpm) a temperatura ambiente.

Para la optimización de un sistema de NP-blanco (sin AE), se modificaron dos variables experimentales: i) tipo de polímero y disolvente orgánico y ii) cantidad de polímero. Los parámetros evaluados para elegir la mejor formulación de NP-blanco fueron el tamaño de partícula, el índice de polidispersión (IPD) y el potencial zeta. Una vez obtenidas las NP-blanco con las características fisicoquímicas deseadas, se modificó la cantidad de cada AE (*L. dentata* o *R. officinalis*) en la fase orgánica. Se evaluó el tamaño, el IPD, el potencial zeta, y la estabilidad.

b) Técnica de purificación de las NC-AE

Para eliminar los disolventes orgánicos (113) utilizados en la formación de las NC-AE, se evaluaron dos técnicas de purificación: la evaporación a presión reducida y la diálisis.

En la purificación por evaporación a presión reducida, las NC-AE se colocaron en un matraz bola en un rotavapor (Heidolph®, modelo Laborota) a 75 rpm a 37°C. Para el proceso de diálisis, las NC-AE se colocaron en una membrana de celulosa regenerada, en agitación constante a 350 rpm durante dos horas a 25 °C, bajo las condiciones establecidas por Lugo-Estrada, 2012 (113) (Figura 12).

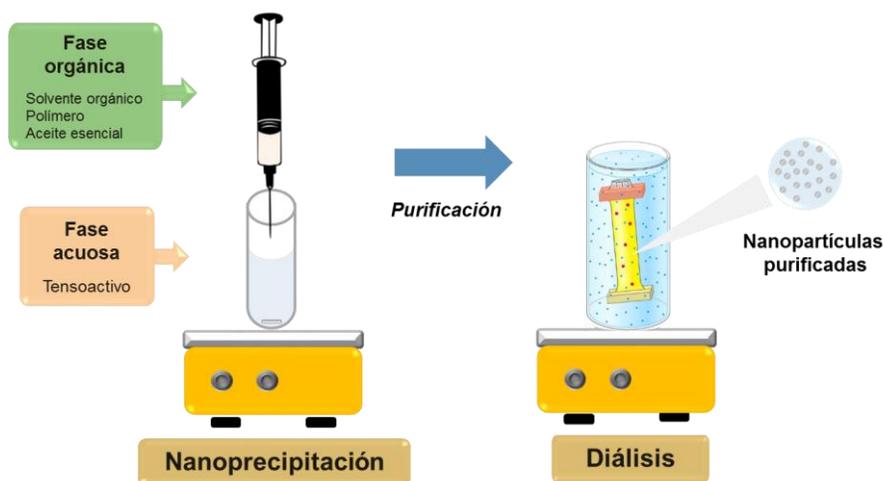


Figura 12. Formulación de NC-AE por la técnica de nanoprecipitación y purificación por diálisis (112).

c) Caracterización de las NC poliméricas

- Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta

Se determinó el tamaño e IPD de las NC-AE en una suspensión acuosa por espectroscopía de correlación fotónica, así como el potencial zeta (ζ) por microelectroforesis con láser Doppler con un equipo Nano-ZS90 Zetasizer marca Malvern Instruments® del Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas.

- Estabilidad

Para evaluar la estabilidad, las NC-AE fueron colocadas en viales ámbar, protegidos de la luz y almacenados durante 10 semanas a 25°C. Durante este período de tiempo, se determinó el tamaño de partícula y el IPD cada 15 días. Además, se evaluó visualmente la apariencia física de las NC-AE verificando la ausencia de agregados y sedimentos.

- Viscosidad y pH

Para determinar la viscosidad, se utilizó un viscosímetro DV-II, marca Brookfield® con una aguja No. 63. En un microadaptador de muestras, se colocaron 6 mL de las NC-AE y EM-AE, y se sometieron a una agitación de 200 rpm durante 3 minutos a 25 °C. La determinación se realizó por triplicado y de manera independiente.

Para determinar el pH, se empleó un potenciómetro PC 18 marca Conductronic® el cual fue sumergido en 3 mL de las NP-blanco, NC-AE y EM-AE a 25°C y se registró el valor obtenido. La determinación se realizó por triplicado y de manera independiente.

- Análisis por IR-FT

Se realizó el análisis del polímero, NP-blanco, AE libres y las NC-AE de *L. dentata* y *R. officinalis* por IR-FT. El polímero y los AE se analizaron directamente, mientras que para las NC-AE se obtuvieron películas (114), y se realizaron 30 barridos en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} con un espectrofotómetro IR-FT Frontier Óptica, marca PerkinElmer® del laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas.

- Contenido de AE en NC

Las NC-AE se colocaron en una centrifuga Allegra 64R, marca Beckman Coulter® para obtener una pastilla y un sobrenadante. Las pastillas fueron sometidas a extracciones sucesivas con metanol y se realizaron las diluciones necesarias (107). Se analizaron los sobrenadantes y las extracciones por métodos de CG-FID previamente validados. Posteriormente, se calcularon los porcentajes de encapsulación (%E) y eficiencia de encapsulación (%EE) con las siguientes fórmulas:

$$\%E = \frac{(\text{mg componente del AE encapsulado})}{(\text{mg polímero} + \text{mg componente del AE total})} * 100$$

Fórmula 2

$$\%EE = \frac{(\text{mg componente del AE encapsulado})}{(\text{mg componente del AE total})} * 100$$

Fórmula 3

d) Formulación de emulsiones con AE (EM-AE)

Para la evaluación biológica de los AE libres en la piel, se prepararon emulsiones (EM) aceite en agua. Brevemente, se adicionó cada AE a 5 mL de una solución acuosa de Tween 80 al 0.3% p/v, se agitó a 20,500 rpm con un homogeneizador (VWR®, modelo VDI12) a temperatura ambiente (108). La emulsión se caracterizó en función de su tamaño, potencial zeta, viscosidad y pH, mientras que la estabilidad se evaluó de acuerdo con su aspecto físico, observando si existía separación de fases.

2.2.3 Desarrollo y validación de métodos analíticos por CG-FID para cuantificar los AE en NC poliméricas

Los métodos analíticos por CG-FID (inyección directa) para cuantificar los componentes “huella” de los AE de *L. dentata* y *R. officinalis*, se desarrollaron a partir de condiciones cromatográficas previamente establecidas por Danh y cols (115) y Derwich y cols (116). Para ambos AE, se empleó un cromatógrafo de gases (CG-FID) Clarus 480, marca Perkin Elmer® con una columna capilar de cromatografía de gases (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) (PerkinElmer®, modelo Elite-5). Se usó el helio con pureza del 99.99% como gas acarreador, con un flujo de 1.0 mL/min.

En específico, para el AE de *L. dentata*, el programa de horno se inició a 55°C durante 1 min, se elevó a 8°C/min hasta 200°C, posteriormente se elevó a 15°C/min hasta 230°C durante 1 min. La temperatura del inyector fue de 260°C y del detector de 260°C. Por otro lado, para el AE de *R. officinalis*, el programa de calentamiento se inició a 50°C durante 1 min, se elevó a 10°C/min hasta 200°C, posteriormente se elevó a 15°C/min hasta 230°C durante 1 min. La temperatura del inyector fue de 260°C y del detector de 260°C. Posteriormente, se continuó con la optimización de las condiciones cromatográficas para obtener las señales cromatográficas resueltas para cada AE. Para seleccionar el estándar interno, se inyectaron soluciones de estándares de α-felandreno, limoneno, linalool y 4-alilanol en diclorometano.

Los métodos analíticos desarrollados y optimizados se validaron bajo los criterios establecidos en la Guía para la Validación de Métodos Físicoquímicos de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de la Cobertura de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058, 2011) (117).

Para la validación del sistema se determinaron los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión. Para la validación del método, se determinaron los parámetros de exactitud y precisión.

a) Validación del sistema

Para la validación del sistema se utilizaron estándares (grado CG) de dos componentes mayoritarios presentes en cada AE en la proporción previamente establecida en base a la normalización de áreas (caracterización química) de los AE.

- *Linealidad*

Se analizaron cinco niveles de concentración total de la mezcla de dos estándares de los componentes “huella” seleccionados para cada AE (10, 20, 40, 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$), por triplicado y de manera independiente. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Se realizó un análisis de regresión lineal de las áreas obtenidas en función de la concentración. El criterio de evaluación para el parámetro de linealidad fue un coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.99 (117).

- *Límite de detección*

La pendiente y la ordenada al origen obtenidos del análisis de regresión de la linealidad fueron utilizadas para calcular el límite de detección con la fórmula 4:

$$LDD = \frac{3.3 * sb_0}{m}$$

Fórmula 4

Donde:

sb₀ = desviación estándar de la ordenada al origen

m = pendiente de la curva de calibración

- *Límite de cuantificación*

La pendiente y la ordenada al origen obtenidas a partir del análisis de regresión de la linealidad fueron utilizadas para calcular el límite de cuantificación con la fórmula 5:

$$LDC = \frac{10 * sb_0}{m}$$

Fórmula 5

Donde:

sb₀ = desviación estándar de la ordenada al origen

m = pendiente de la curva de calibración

- *Precisión*

Se evaluó la precisión del sistema llevando a cabo la determinación de la repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad

Se analizaron tres niveles de concentración total de la mezcla de dos estándares (10, 40 y 160 µg/mL), por sextuplicado y de manera independiente, el mismo día y por la misma persona. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 20 µg/mL. Se calcularon los porcentajes de recuperación (%R) con la ecuación de la recta obtenida para linealidad. Posteriormente, se calculó la media (\bar{x}) con la fórmula 6, la desviación estándar (s) con la fórmula 7, y la desviación estándar relativa (DER) con la fórmula 8:

Media (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Fórmula 6

Donde:

\bar{x} = media

i = valor de cada medición

n = número de mediciones

Desviación estándar (s)

$$s = \sqrt{\sum_i \frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Fórmula 7

Donde:

s = desviación estándar

\bar{x} = media

i = valor de cada medición

n = número de mediciones

Desviación estándar relativa (DER)

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Fórmula 8

Donde:

s= desviación estándar

\bar{x} = media

Precisión intermedia

Se analizaron tres niveles de concentración total de la mezcla de dos estándares (10, 40 y 160 $\mu\text{g/mL}$), por sextuplicado y de manera independiente, por la misma persona en 3 días no consecutivos. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$. Se calcularon los porcentajes de recuperación con la ecuación de la recta obtenida para linealidad. Posteriormente, se calculó la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa como se indicó para la repetibilidad.

b) Validación del método

Para la validación del método se utilizaron NC-AE adicionadas con los dos estándares de los componentes huella de cada AE. Se utilizaron diferentes niveles de concentración de acuerdo con cada parámetro evaluado.

- **Exactitud**

Se analizaron cinco niveles de concentración total de la mezcla de dos estándares de los componentes “huella” seleccionados para cada AE (10, 20, 40, 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$), y

se adicionaron a las NC-AE, por triplicado y de manera independiente. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 20 µg/mL. Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de recuperación (%R):

$$\%R = \frac{(Ca - CU)}{CA} \times 100$$

Fórmula 9

Donde:

Ca = concentración medida en la muestra adicionada

CU = concentración medida en la muestra sin adicionar

CA = concentración añadida

- Precisión

Se evaluó la precisión del método llevando a cabo la determinación de la repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad

Se analizaron tres niveles de concentración total de la mezcla de dos estándares (10, 40 y 160 µg/mL), y se adicionaron a la muestra de NC-AE, por sextuplicado y de manera independiente, el mismo día y por la misma persona. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 20 µg/mL. Se calcularon los porcentajes de recuperación (%R) con la ecuación de la recta obtenida para linealidad. Posteriormente, se calculó la media (x) con la fórmula 6, la desviación estándar (s) con la fórmula 7, y la desviación estándar relativa (DER) con la fórmula 8.

Precisión intermedia

Se analizaron tres niveles de concentración total de la mezcla de dos estándares (10, 40 y 160 $\mu\text{g/mL}$), y se adicionaron a la muestra de NC-AE, por sextuplicado de manera independiente, por la misma persona en 3 días no consecutivos. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$. Se calcularon los %R con la ecuación de la recta obtenida para la linealidad del sistema. Posteriormente, se calculó: la media (\bar{x}) con la fórmula 6, la desviación estándar (s) con la fórmula 7, y la desviación estándar relativa (DER) con la fórmula 8.

2.2.4 Actividad antioxidante de los AE libres y nanoencapsulados.

La capacidad antioxidante de los AE libres y nanoencapsulados para inhibir la peroxidación del ácido linoleico fue evaluada por dos métodos.

a) Inhibición de la lipoperoxidación en una emulsión de ácido linoleico por el método de ABAP (118).

Se preparó la suspensión micelar de ácido linoleico, con dodecil sulfato de sodio (50 mM, SDS) en Na_2PO_4 acuoso (5 mM) y se ajustó a pH 7.4. Previo al inicio de cada experimento, se añadió el ácido linoleico a la disolución del SDS para obtener una concentración de 1.3 mM. Además, se preparó una disolución acuosa de ABAP (35 mM) como iniciador de radicales de la lipoperoxidación. Las disoluciones metanólicas de los AE libres, NC-AE y controles positivos (estándares de 1,8-cineol, alcanfor,

carvacrol y timol) se prepararon a una concentración de 50 µg/mL. Una alícuota (2 mL) de la suspensión micelar de ácido linoleico se mantuvo en agitación a 125 rpm a 50°C durante 20 min. Se agregaron 25 µL de la disolución de ABAP y 20 µL de la disolución de AE, NC-AE o controles y después de 15 minutos se evaluó el cambio en la absorbancia una longitud de onda de 232 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10s, marca Thermo Scientific®. Como control negativo de la peroxidación se utilizó la solución micelar de ácido. El porcentaje de inhibición de la peroxidación (%I) se calculó utilizando la fórmula 10:

$$\%I = \left(1 - \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

Fórmula 10

Donde:

A_{muestra} : absorbancia de los AE libres, NC-AE o controles positivos

A_{control} : absorbancia de la muestra sin AE

b) Determinación de la actividad antioxidante en emulsión de ácido linoleico por el método de tiocianato férrico (FTC) (119).

La actividad antioxidante de los AE libres y nanoencapsulados se determinó de acuerdo al método del tiocianato férrico (FTC) descrito por Gülçin y cols., (119) con modificaciones. Las disoluciones etanólicas de los AE, NC-AE o controles positivos (estándares de α -tocoferol, 1,8-cineol y alcanfor) se prepararon a una concentración de 1 mg/mL. La emulsión de ácido linoleico (15.5 µL) se preparó en una disolución acuosa

de buffer de fosfatos (40 mM, pH 7.0) con Tween-20[®] (17.5 mg). A partir de las disoluciones etanólicas de los AE, NC-AE o controles, se prepararon tres niveles de concentración (15, 30 y 45 µg/mL) y se agregaron a la emulsión de ácido linoleico en buffer de fosfatos. Las disoluciones se incubaron a 37°C durante 3 minutos y se adicionó: 100 µL de la disolución acuosa de tiocianato de amonio 30% (v/v), y precisamente 3 minutos después, 50 µL de la disolución acuosa acidificada 3.5% (v/v) de cloruro ferroso (20 mM) (120). Se evaluó el cambio en la absorbancia una longitud de onda de 232 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10s, marca Thermo Scientific[®]. Cada 5 h se repitió la adición de las soluciones de tiocianato de amonio y cloruro ferroso como se indicó anteriormente, y se monitoreó la absorbancia. El control negativo de la inhibición de la lipoperoxidación fue la emulsión de ácido linoleico. Los valores de porcentaje de inhibición se calcularon al tiempo de 30 horas de incubación (121). El porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación en la emulsión de ácido linoleico se calculó mediante la fórmula 11:

$$\%I = 100 - \left(\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \right)$$

Fórmula 11

Donde:

A_{muestra} : absorbancia de la muestra con AE

A_{control} : absorbancia de la muestra sin AE

2.2.5 Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con técnicas de bioingeniería

Se realizó la evaluación de cuatro parámetros biofísicos a la piel antes y después de la aplicación de las NC o EM con una multisonda (Courage & Khazaka[®], modelo MPA5):

a) Pérdida de agua transepidérmica

La sonda TEWL TM300 marca Courage & Khazaka[®] fue colocada sobre la superficie de la piel, cada evaluación representa 15 mediciones de la pérdida de agua transepidérmica. La evaluación se realizó por quintuplicado y el promedio de las mediciones realizadas se expresó en g/m²h. La sonda fue previamente calibrada antes de cada evaluación.

La pérdida de agua transepidérmica fue determinada en función de la profundidad de EC removido por la técnica de *tape stripping*, con el objetivo de establecer el espesor total del EC de la piel de oreja de cerdo.

b) pH superficial

El electrodo de vidrio de la sonda de pH PH905 marca Courage & Khazaka[®] fue colocado sobre la superficie de la piel para la medición. La evaluación se realizó por quintuplicado y el promedio de los resultados obtenidos se expresó en unidades arbitrarias del pHmetro. La sonda fue previamente calibrada con las soluciones calibradoras de pH 4 y 7 antes de cada evaluación.

c) Contenido de agua del EC

La sonda de capacitancia CM825 marca Courage & Khazaka[®] fue colocada en la superficie de la piel, la evaluación se realizó por quintuplicado. El promedio de las

mediciones se expresó en unidades arbitradas del corneómetro. Las mediciones obtenidas representan el contenido de agua a una profundidad de 10-20 μm de EC.

d) Cantidad de sebo

La tira de medición del sebómetro SM815 marca Courage & Khazaka se colocó sobre la superficie de la piel, y se ejerció una ligera presión durante 20 segundos. Posteriormente la cinta opaca fue insertada en la abertura del dispositivo para medir la diferencia en la transparencia inicial de la cinta. La evaluación se realizó por quintuplicado y el promedio de las mediciones se expresó en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Con los resultados obtenidos se llevó a cabo el análisis estadístico utilizando la prueba ANOVA de factor único (software GraphPad Prism versión 7.0). La prueba de Tukey se utilizó para determinar si existe diferencia significativa entre los grupos con una $p < 0.05$ como nivel de significancia.

2.2.6 Perfil dermatocinético de los AE libres y nanoencapsulados en piel de cerdo, con estudios *in vitro* de permeación y *tape stripping*.

a) Estudios *in vitro* de permeación

Para evaluar el perfil dermatocinético, la piel de cerdo previamente acondicionada fue colocada entre los dos compartimentos de las celdas de difusión de Franz. En el compartimento donador se depositó 1 mL de las NC o EM y se cubrió para prevenir la evaporación. Las NC o EM se dejaron en contacto con la piel (área = 2.54 cm^2) durante 1, 2 y 4 horas. Al finalizar el tiempo del experimento, el exceso de NC o EM fue

removido de la superficie y se secó suavemente con un algodón. La piel de cerdo fue retirada de la celda y se realizó la técnica de *tape stripping*, previamente optimizada. Los estudios *in vitro* se realizaron por quintuplicado.

b) Técnica de *tape stripping*

La técnica de *tape stripping* consistió en colocar una cinta adhesiva (2.1 x 2.1 cm), previamente acondicionada y pesada, en la superficie de la piel de cerdo, aplicar una ligera presión para asegurar un buen contacto de la cinta con la piel y realizar el arranque de la cinta adhesiva en un solo movimiento. Las cintas fueron nuevamente pesadas y por diferencia de peso, se calculó la cantidad de EC removido en cada cinta adhesiva. Posteriormente, se empleó la densidad de la piel (96) para calcular la profundidad del EC removido con la fórmula 12. Este procedimiento se repitió sucesivamente con 5 cintas adhesivas y por quintuplicado en orejas diferentes.

$$v = \frac{m}{\rho}$$

Formula 12

Donde:

m= cantidad en gramos de EC removido

ρ = densidad de la piel (1 g/mL)

Es importante mencionar que la técnica de *tape stripping* fue previamente optimizada, como se indica en el numeral 2.2.5 en la sonda TEWL.

El AE presente en cada cinta adhesiva fue extraído con 1 mL de metanol en agitación constante durante 30 min (107). La cuantificación de los componentes huella de cada AE se realizó con el método de CG-FID desarrollados y validados en el numeral 2.2.3. Finalmente se calculó la cantidad acumulada de los componentes “huella” de cada AE en la piel.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Obtención y caracterización física y química de los AE de *Lavanda dentata* y *Rosmarinus officinalis*

Las plantas fueron autenticadas por el Herbario del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, como *Lavandula dentata* y *Rosmarinus officinalis* (Anexo I).

Una vez identificadas las plantas, se procedió con la obtención de los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* por el método de hidrodestilación en un equipo Clevenger modificado. En la Tabla 7 se muestran los resultados de los porcentajes de rendimiento de los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* obtenidos con la fórmula 1.

Tabla 7. Porcentajes de rendimiento de los aceites esenciales (Media \pm DE, n=7).

Aceite esencial	Porcentaje de rendimiento (%)
<i>L. dentata</i>	0.59 \pm 0.22%
<i>R. officinalis</i>	0.73 \pm 0.18%

La caracterización física de los AE obtenidos se realizó de acuerdo a los Métodos Generales de Análisis descritos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) (109). Se determinó el índice de refracción, la densidad relativa y la rotación óptica de los AE y se estableció como controles el anetol, eugenol y (R)-limoneno. En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización física de los AE de *L. dentata*, y *R. officinalis*, así como de los controles utilizados. Los valores de referencia para los controles y AE se muestran en el Anexo II.

Tabla 8. Caracterización física de los aceites esenciales y controles (Media \pm DE, *n=3, **n=5).

Control/AE	Índice de refracción*¹	Densidad relativa (g/mL)*²	Rotación óptica (°)**³
Anetol	1.559 \pm 0.000	0.986 \pm 0.002	0.05° \pm 0.00
Eugenol	1.541 \pm 0.001	1.060 \pm 0.003	-0.04° \pm 0.00
(R)-Limoneno	1.473 \pm 0.001	0.840 \pm 0.001	96.74° \pm 0.11
AE-<i>L. dentata</i>	1.470 \pm 0.000	0.900 \pm 0.002	-1.67° \pm 0.01
AE-<i>R. officinalis</i>	1.469 \pm 0.000	0.894 \pm 0.002	11.80° \pm 0.01

¹Refractómetro AntonPaar® modelo Abbermat 300

²Densímetro AntonPaar® modelo DMA35

³Polarímetro PerkinElmer® modelo 341

La caracterización química de los AE fue realizada por CG-MS y CG-FID. Los cromatogramas obtenidos por CG-MS de los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* se muestran en las Figuras 13 y 14, respectivamente. Mientras que los cromatogramas obtenidos por CG-FID de los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* se muestran en las Figuras 15 y 16, respectivamente.

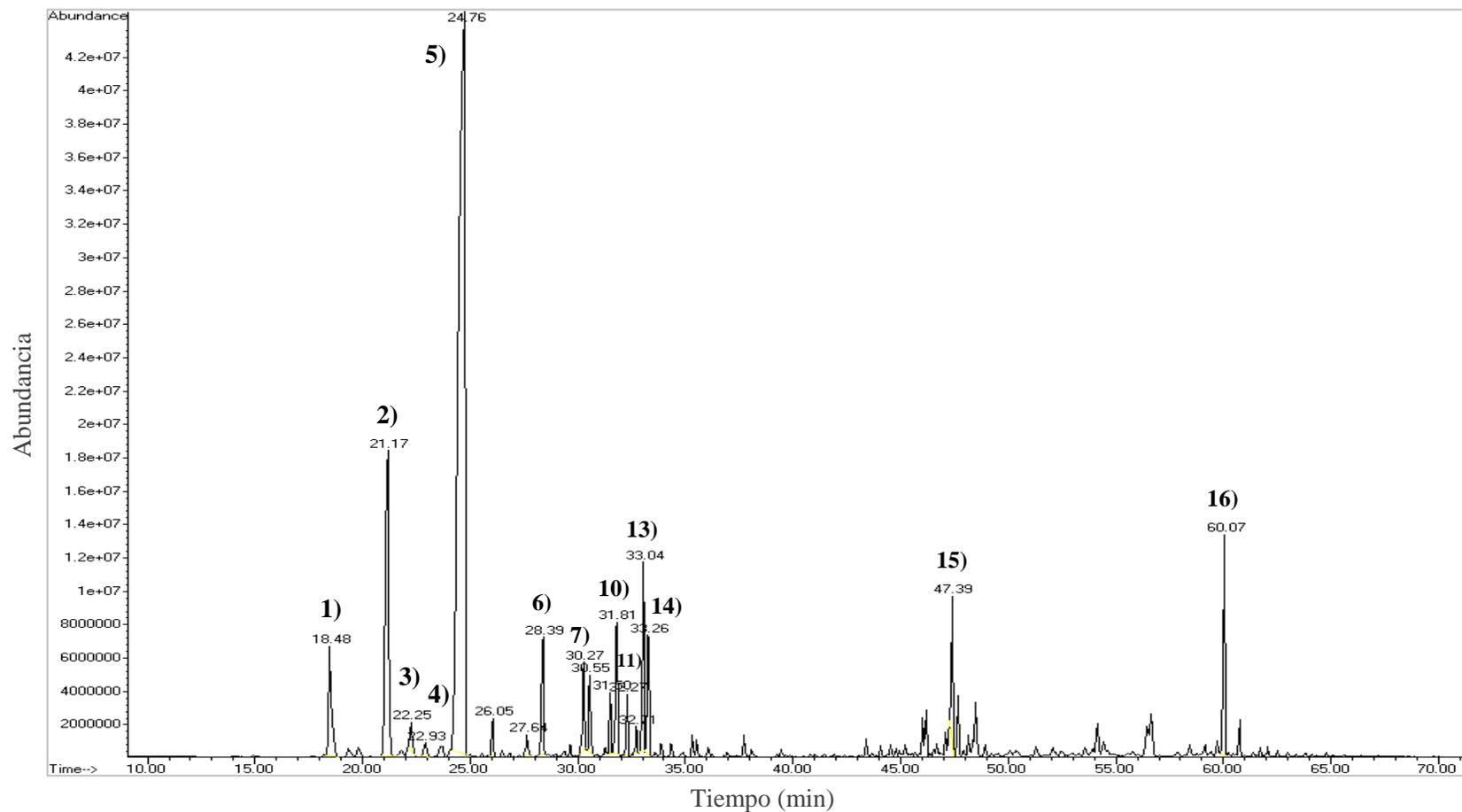


Figura 13. Cromatogramas del AE de *L. dentata* (2 mg/mL) por CG-MS. Los componentes son: 1) α -Pineno, 2) β -Pineno, 3) Mirceno, 4) α -Terpineno, 5) 1,8-cineol, 6) β -Linalool, 7) trans-pinocarveol, 8) Alcanfor, 9) No identificado, 10) Pinocarvona, 11) δ -Terpineol, 12) Terpinen-4-ol, 13) Criptona, 14) α -Terpineol, 15) Mirtenol, 16) No identificado.

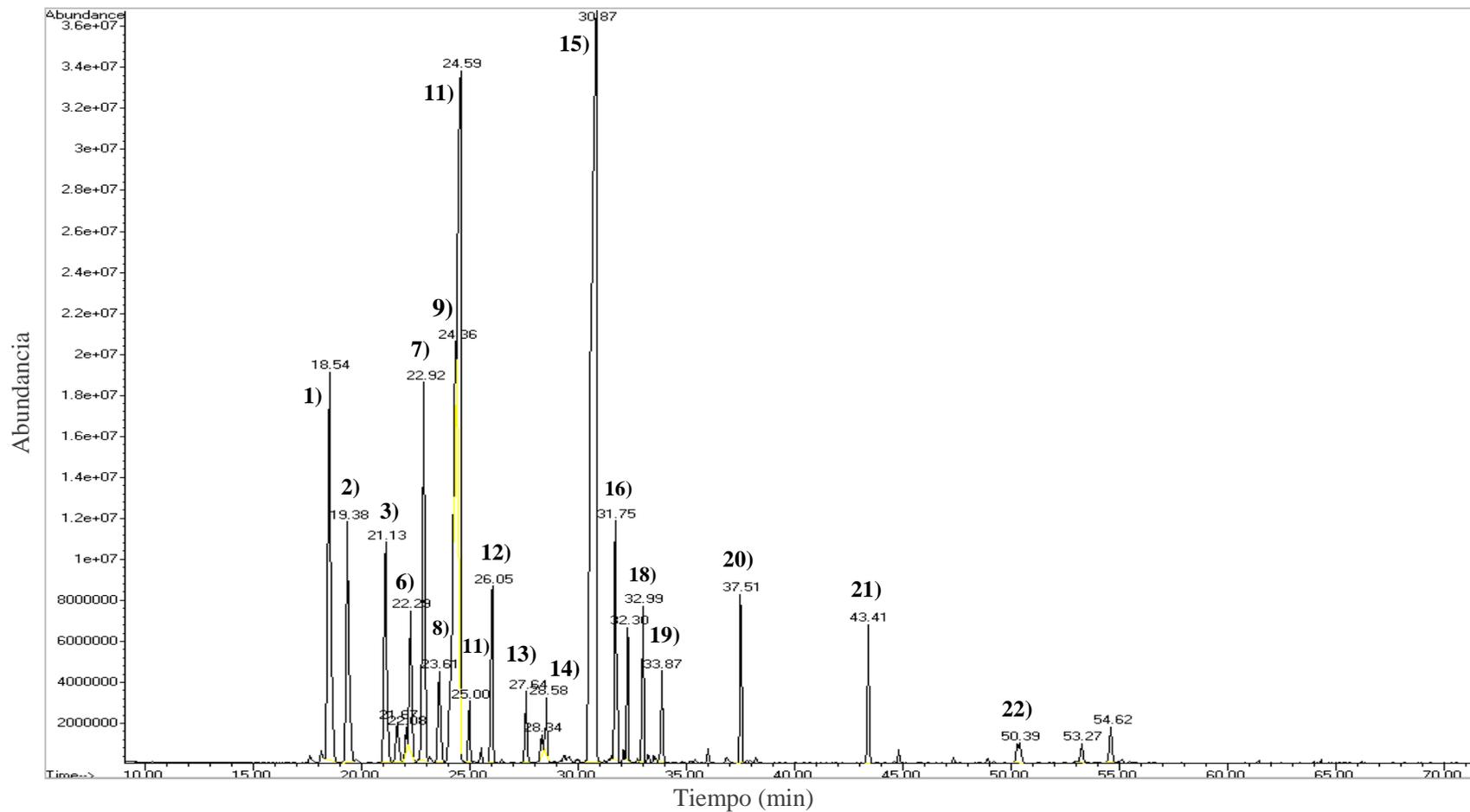


Figura 14. Cromatogramas del AE de *R. officinalis* (2 mg/mL) por CG-MS. Los componentes son: 1) α -Pino, 2) Canfeno, 3) β -Pino, 4) Octen-3-ol, 5) 3-Octanona, 6) Mirceno, 7) α -Felandreno, 8) α -Terpineno, 9) β -Felandreno, 10) 1,8-cineol, 11) β -ocimeno, 12) γ -Terpineno, 13) Terpinoleno, 14) trans-sabineno hidrato, 15) Alcanfor, 16) Borneol, 17) Terpinen-4-ol, 18) α -Terpineol, 19) Verbenona, 20) Acetato de Bornilo, 21) β -Cariofileno, 22) Óxido de cariofileno.

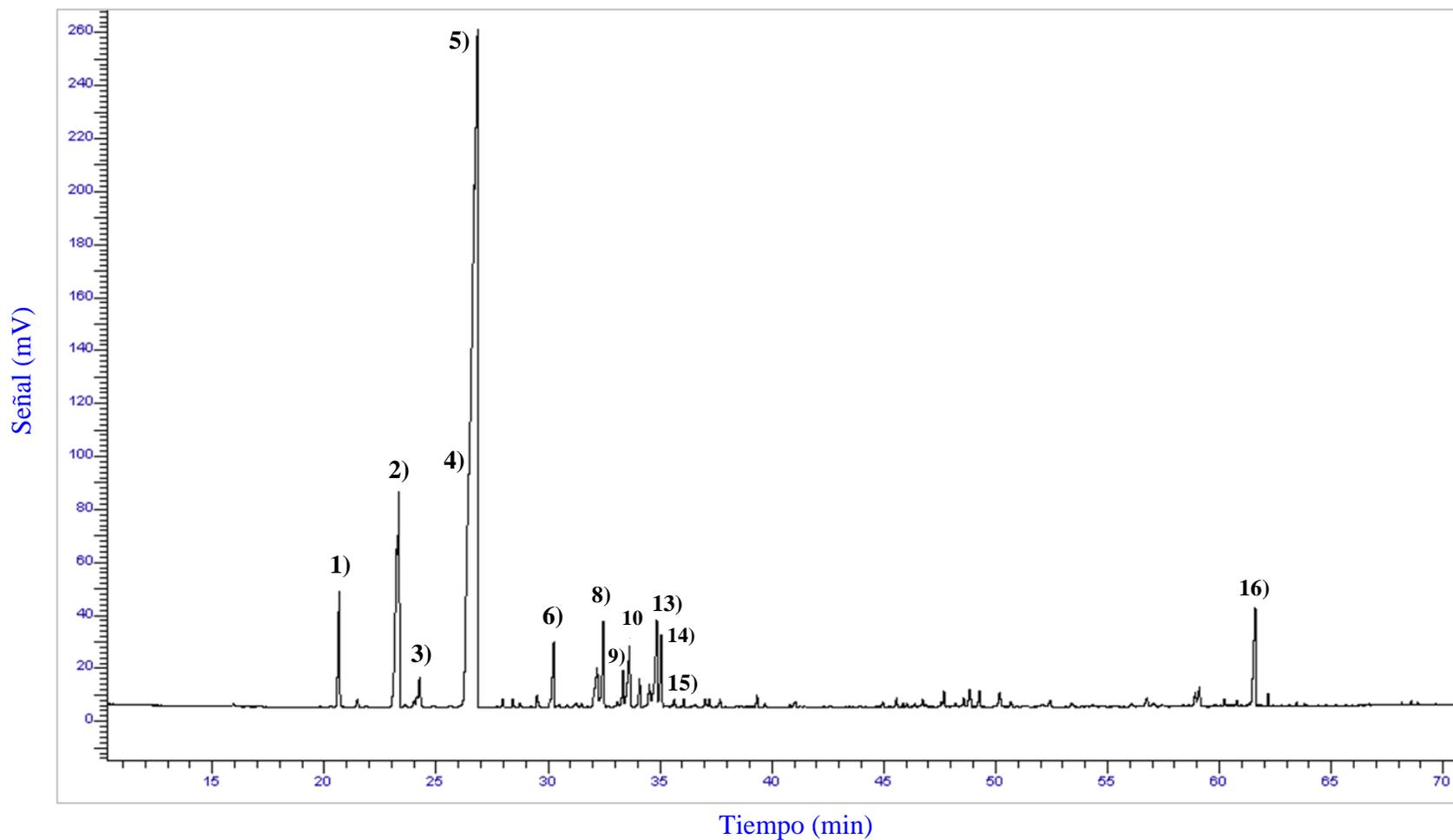


Figura 15. Cromatograma del AE de *L. dentata* (2 mg/mL) por CG-FID. Los componentes son: 1) α -Pinoeno, 2) β -Pinoeno, 3) Mirreno, 4) α -Terpinoeno, 5) 1,8-cineol, 6) β -Linalool, 7) trans-pinocarveol, 8) Alcanfor, 9) No identificado, 10) Pinocarvona, 11) δ -Terpineol, 12) Terpinen-4-ol, 13) Criptona, 14) α -Terpineol, 15) Mirtenol, 16) No identificado.

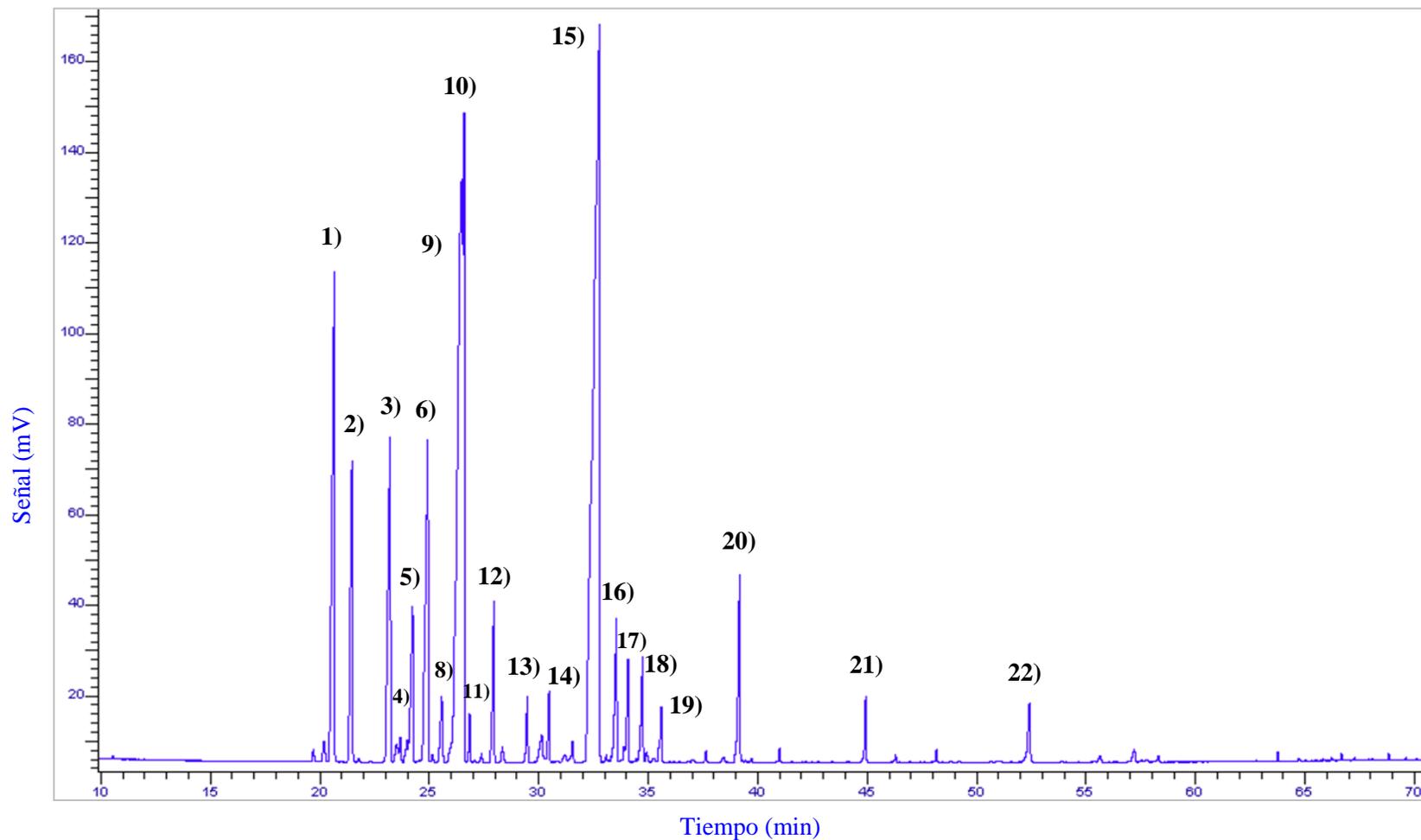


Figura 16. Cromatograma del AE de *R. officinalis* (2 mg/mL) por CG-FID. Los componentes son: 1) α -Pino, 2) Canfeno, 3) β -Pino, 4) Octen-3-ol, 5) 3-Octanona, 6) Mirceno, 7) α -Felandreno, 8) α -Terpineno, 9) β -Felandreno, 10) 1,8-cineol, 11) β -ocimeno, 12) γ -Terpineno, 13) Terpinoleno, 14) trans-sabineno hidrato, 15) Alcanfor, 16) Borneol, 17) Terpinen-4-ol, 18) α -Terpineol, 19) Verbenona, 20) Acetato de Bornilo, 21) β -Cariofileno, 22) Óxido de cariofileno.

Primero, se realizó la identificación de los componentes de cada AE a partir de los cromatogramas obtenidos por CG-MS. Después, se determinó el área de los picos cromatográficos de los componentes de cada AE con los cromatogramas obtenidos por CG-FID. Posteriormente, se estableció el porcentaje de abundancia (%A) de cada uno de los componentes de los AE relativo al área de las señales obtenidas por CG-FID. En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización química de los AE.

Tabla 9. Componentes de los aceites esenciales, tiempo de retención (CG-FID) y porcentaje de abundancia (%A).

Composición	IR ^a	IR ^b	<i>L. dentata</i>		<i>R. officinalis</i>	
			tR (min)	%A	tR (min)	%A
<i>Monoterpenos hidrocarbonados</i>						
α -Pinoeno	934	939	18.48	2.87	18.54	9.43
Canfeno	949	954	~	~	19.38	4.97
β -Pinoeno	977	979	21.17	11.53	21.13	4.75
Mirceno	993	990	22.26	0.55	22.29	3.24
α -Felandreno	1003	1002	~	~	22.92	6.37
α -Terpinoeno	1017	1017	22.93	1.24	23.61	1.11
β -Felandreno	1031	1029	~	~	24.36	2.3
(Z)- β -ocimeno	1043	1050	~	~	25	0.52
γ -Terpinoeno	1061	1059	~	~	26.05	1.86
Terpinoleno	1088	1088	~	~	27.64	0.6
<i>Total</i>				16.19		35.14
<i>Monoterpenos oxigenados</i>						
1,8-cineol	1035	1031	24.76	68.59	24.59	14.63
β -Linalool	1100	1096	28.39	1.63	~	~
Hidrato de <i>trans</i> -Sabineno	1100	1098	~	~	28.58	0.56
<i>trans</i> -Pinocarveol	1139	1139	30.27	1.15	~	~
Alcanfor	1145	1146	30.55	1.03	30.87	39.46

Pinocarvona	1163	1164	31.50	0.85	~	~
Borneol	1168	1169	~	~	31.75	2.79
δ -Terpineol	1169	1166	31.81	1.83	~	~
Terpinen-4-ol	1178	1177	32.27	0.57	32.3	1.18
Criptona	1186	1185	32.71	2.94	~	~
α -Terpineol	1191	1188	33.04	1.11	32.99	1.56
Mirtenol	1196	1195	33.26	1.01	~	~
Verbenona	1209	1205	~	~	33.87	0.98
Acetato de bornilo	1287	1285	~	~	37.51	1.18
Total				80.71		62.34
Sesquiterpenos hidrocarbonados						
E-cariofileno	1421	1419	~	~	43.41	1.07
Total				~		1.07
Sesquiterpenos oxigenados						
Cariofileno óxido	1581	1582	~	~	50.28	0.61
Total				~		0.61
Otros						
Octen-3-ol	984	979	~	~	21.67	0.49
3-Octanona	990	983	~	~	22.08	0.35
No identificado	~	~	31.27	0.47	~	~
No identificado	~	~	60.75	2.64	~	~
Total				3.11		0.84

IR^a: índice de retención calculado, IR^b: índice de retención de referencia, tR: tiempo de retención (min), %A: Porcentaje de abundancia relativo al área del pico.

En base al porcentaje de abundancia, se seleccionaron los dos componentes mayoritarios, los cuales serán los componentes huella en cada AE. Para el AE de *L. dentata* se seleccionaron el β -pineno y 1,8-cineol, los cuales están en una proporción de 14:86, respectivamente. Mientras que para el AE de *R. officinalis* se seleccionó el 1,8-cineol y alcanfor, los cuales están en una proporción de 41:59, respectivamente.

3.2 Obtención y caracterización fisicoquímica de NC y emulsiones con AE de *L.*

dentata y *R. officinalis*

a) Formulación de NC poliméricas con AE

Con el objetivo de optimizar las formulaciones de NC por la técnica de nanoprecipitación (112), se evaluaron dos variables experimentales como i) tipo de polímero y disolvente orgánico, y ii) concentración de polímero. Los parámetros evaluados para seleccionar la mejor formulación fueron el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (IPD) y la estabilidad.

i) Tipo de polímero y disolvente orgánico

Se inició con una concentración de 20 mg/mL de polímero y 15 mL de disolvente como fase orgánica. Se evaluaron tres diferentes polímeros Eudragit® así como el tipo y volumen de disolvente. Los resultados obtenidos de las pruebas de disolventes se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Evaluación de NC con diferentes polímeros y disolventes orgánicos (Media \pm DE; n=3)

Polímero	Disolvente	Tamaño (nm)	IPD	Observación
Eudragit® L-100	Etanol	101.22 \pm 10.13	0.297 \pm 0.034	Tamaño menor a 200 nm
	Acetona	257.37 \pm 21.60	0.194 \pm 0.019	Presencia de agregados

	Acetona:Isopropanol (50:50)	200.39 ± 9.16	0.183 ± 0.089	Presencia de agregados
Eudragit® E-100	Acetona	199.53 ± 1.46	0.158 ± 0.020	Presencia de agregados
	Acetona:Isopropanol (50:50)	238.50 ± 1.56	0.202 ± 0.009	Presencia de agregados
Eudragit® E PO	Acetona	203.33 ± 0.96	0.194 ± 0.005	Presencia de agregados
	Acetona:Isopropanol (50:50)	220.97 ± 1.53	0.156 ± 0.005	Ausencia de agregados

ii) Concentración de polímero

Se evaluaron tres concentraciones de polímero (Eudragit® E PO) en la fase orgánica. Los resultados se observan en la Figura 17.

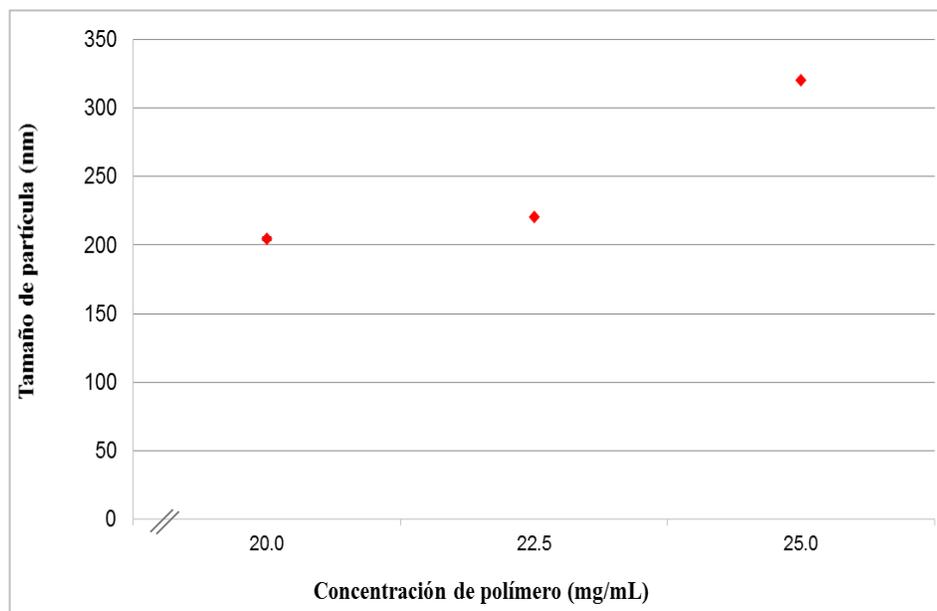


Figura 17. Efecto de la concentración de polímero en la fase orgánica en el tamaño de las NC (Fase orgánica: 15 mL de acetona:isopropanol (50:50), X mg de Eudragit® E PO; Fase acuosa: 20 mL de agua) (Media ± DE; n=3).

b) *Técnica de purificación de las NC poliméricas con AE*

En la Figura 18 se muestran los cromatogramas obtenidos por CG-FID de las NC-AE de *L. dentata* purificadas por A) evaporación a presión reducida y B) diálisis.

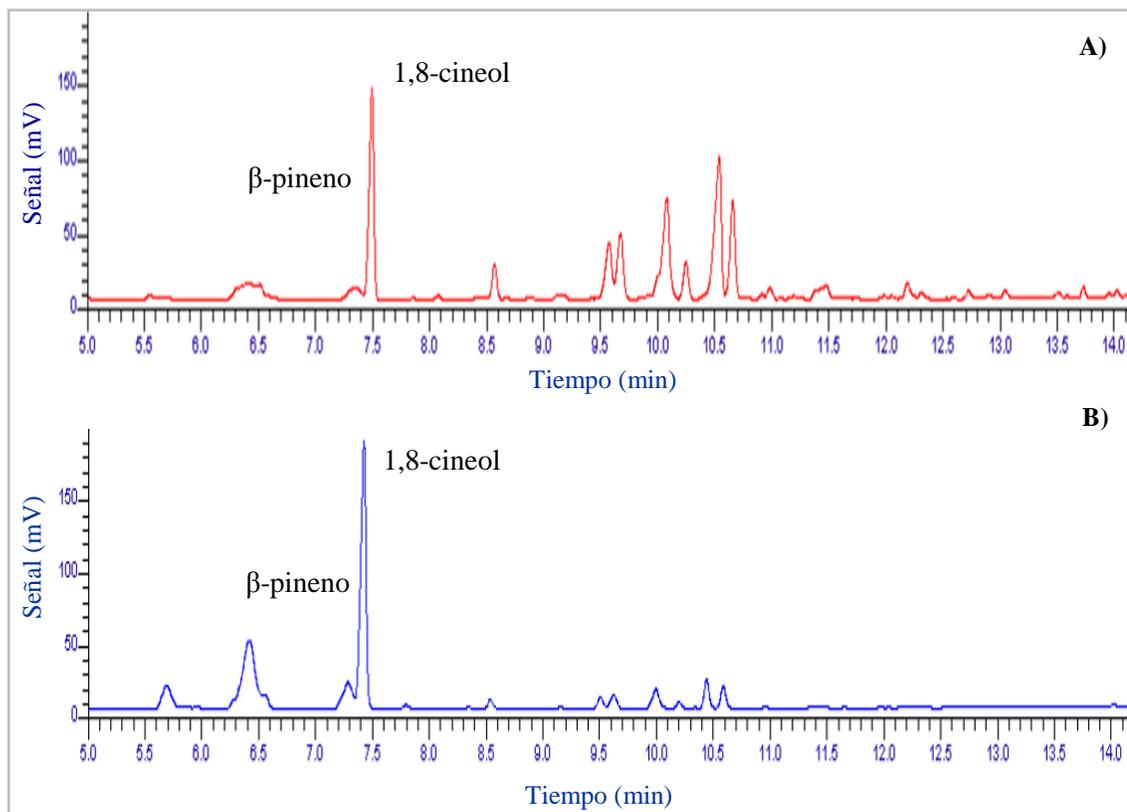


Figura 18. Cromatogramas obtenidos por CG-FID de las NC-AE de *L. dentata* purificadas por A) evaporación a presión reducida y B) diálisis.

c) *Caracterización de las NC poliméricas con AE*

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica de las NC-AE purificadas por diálisis.

Tabla 11. Caracterización fisicoquímica de las NC-AE purificadas por diálisis (Media \pm DE; n=3).

Parámetros	NC-AE- <i>L. dentata</i>	NC-AE- <i>R. officinalis</i>
Tamaño (nm)	230.99 \pm 8.85	227.73 \pm 2.96
Índice de polidispersidad	0.22 \pm 0.03	0.20 \pm 0.03
Potencial zeta (mV)	50.40 \pm 0.75	54.47 \pm 0.45
Viscosidad (cP)	2.22 \pm 0.13	2.26 \pm 0.12
pH	6.66 \pm 0.02	6.28 \pm 0.06

En el Anexo III se presentan los gráficos de distribución de tamaño de las NC-AE de *L. dentata* y *R. officinalis* (Figuras 36 y 37, respectivamente).

En las Figuras 19 y 20 se muestra el cambio del tamaño de las NC-AE de *L. dentata* y *R. officinalis* respectivamente, determinado en función del tiempo.

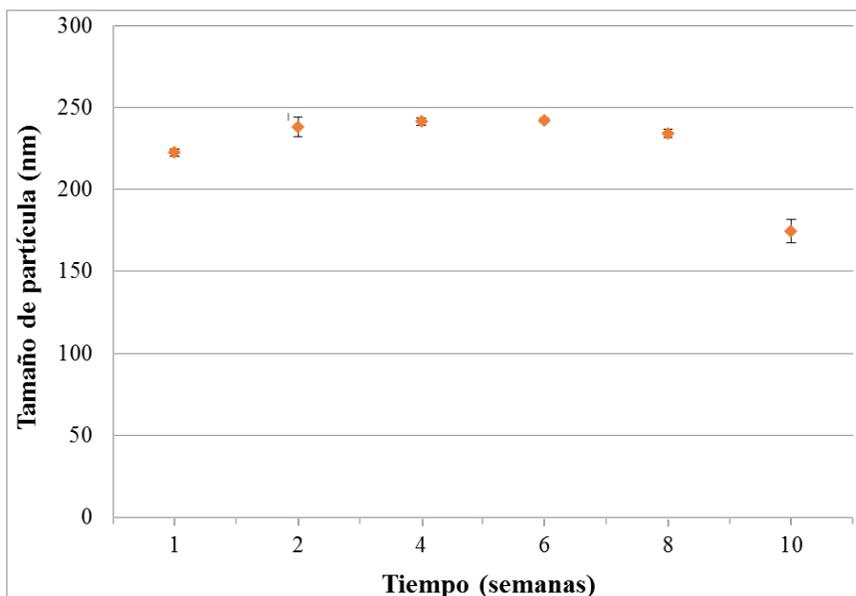


Figura 19. Cambio del tamaño de las NC-AE de *L. dentata* purificadas por diálisis determinado durante 10 semanas (Media \pm DE; n=3).

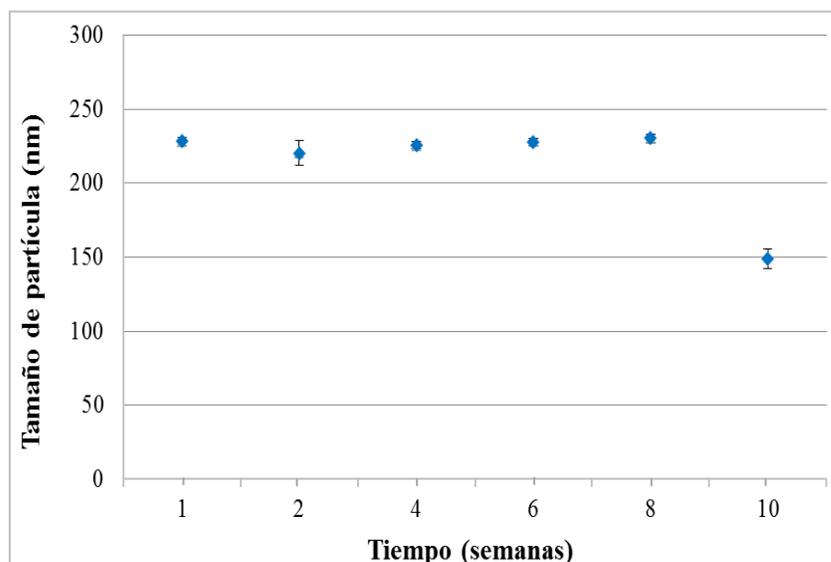
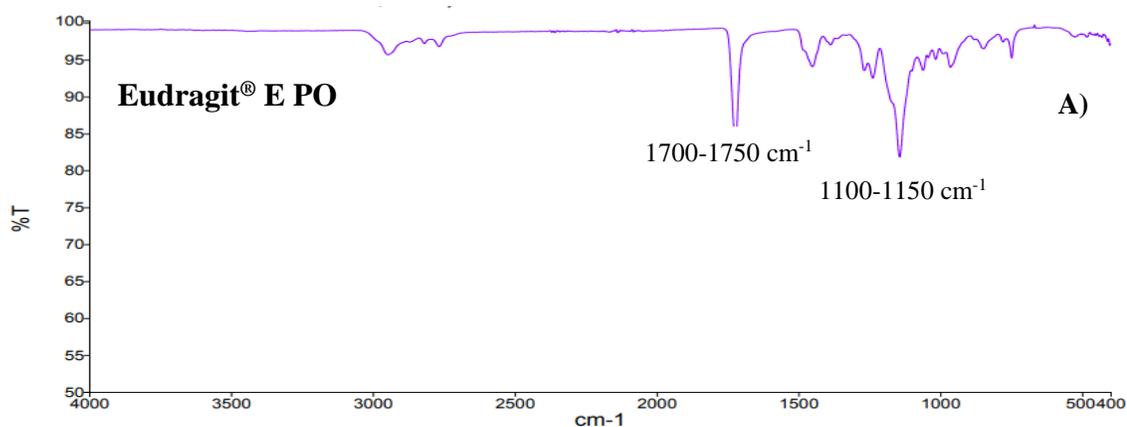


Figura 20. Cambio del tamaño de las NC-AE de *R. officinalis* purificadas por diálisis determinado durante 10 semanas (Media \pm DE; n=3).

Con la finalidad de establecer las interacciones entre los componentes de las NC, se realizó el análisis por espectroscopia de infrarrojo (IR-FT) del polímero, las NP-blanco, los AE libres, y las NC-AE de *L. dentata* y *R. officinalis*. En la Figura 21 se muestran los espectros obtenidos para A) polímero Eudragit® E PO y B) NP-blanco.



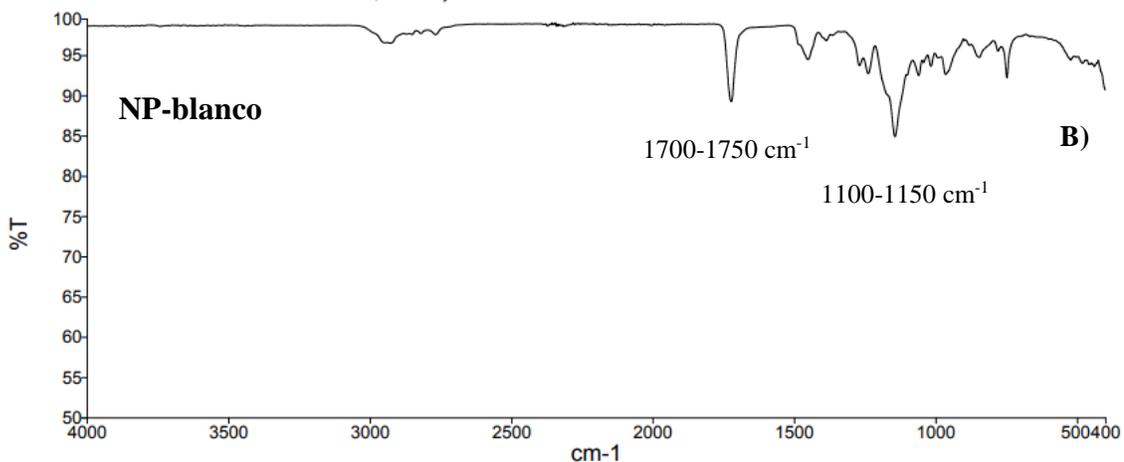


Figura 21. Señales en el espectro IR-FT para A) polímero Eudragit® E PO y B) NP-blanco.

En la Figura 22 se presentan los espectros obtenidos para A) AE-*L. dentata* libre y B) NC-AE de *L. dentata*.

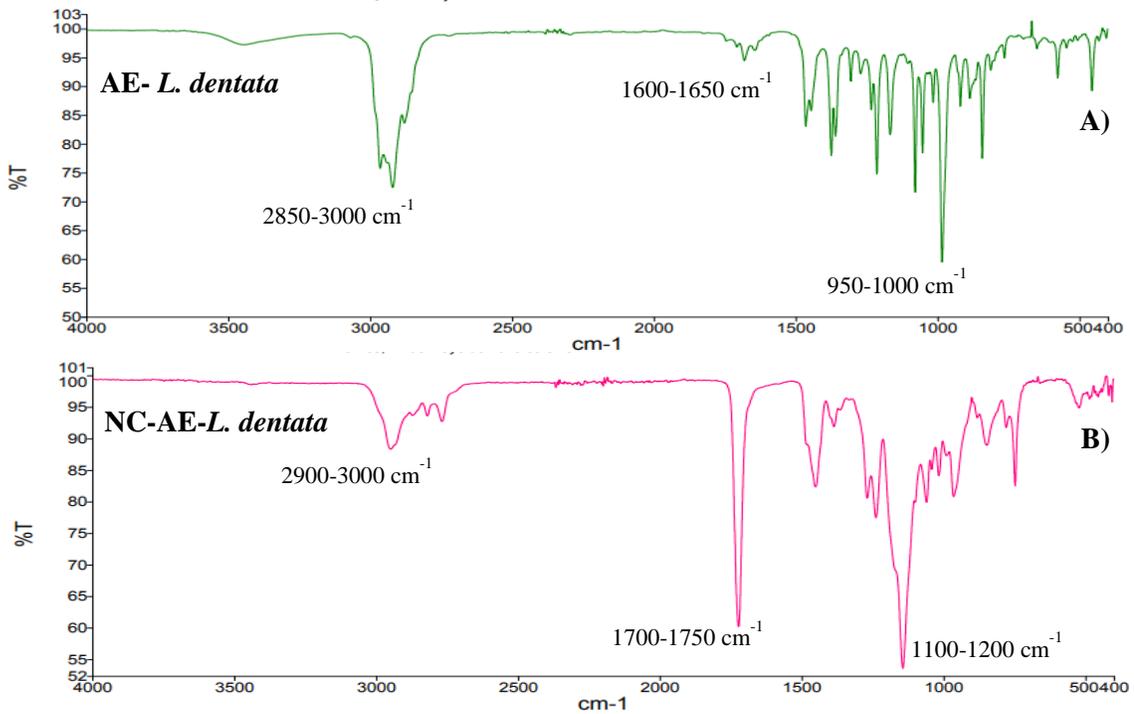


Figura 22. Señales en el espectro IR-FT para A) AE de *L. dentata* y B) NC-*L. dentata*.

En la Figura 23 se presentan los espectros obtenidos para A) AE de *R. officinalis* y b) NC-AE de *R. officinalis*.

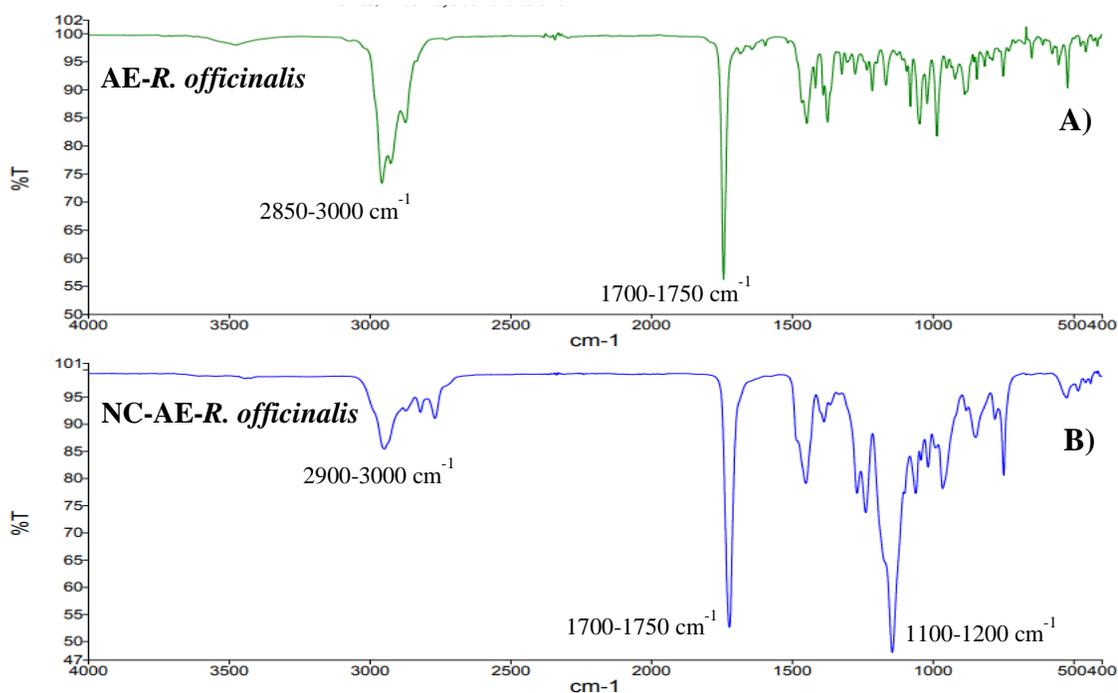


Figura 23. Señales en el espectro IR-FT para A) AE-*R. officinalis* y B) NC-*R. officinalis*.

Por otra parte, se determinó el contenido de AE en las NC mediante los métodos de CG-FID previamente validados (Capítulo 3.3) y se calcularon los porcentajes de encapsulación (%E) y eficiencia de encapsulación (%EE) con las fórmulas 2 y 3, respectivamente. En la Tabla 12 se muestran los %E y %EE de las NC-AE de *L. dentata* y *R. officinalis*.

Tabla 12. Porcentajes de encapsulación (%E) y eficiencia de encapsulación (%EE) de los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* en NC (Media \pm DE, n=3).

Porcentajes (%)	NC-AE- <i>L. dentata</i>		NC-AE- <i>R. officinalis</i>	
	β -pineno	1,8-cineol	1,8-cineol	Alcanfor
Encapsulación (%E)	1.56 \pm 0.13	2.89 \pm 0.12	2.95 \pm 0.14	2.41 \pm 0.13
Eficiencia de encapsulación (%EE)	28.97 \pm 2.44	11.31 \pm 0.49	43.29 \pm 2.07	14.61 \pm 0.77

d) Obtención y caracterización de emulsiones con AE (EM-AE)

Para el análisis de los AE libres en las pruebas biológicas en piel se prepararon EM con los AE, en la Tabla 13 se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica de las EM obtenidas.

Tabla 13. Caracterización fisicoquímica de las EM-AE (Media \pm DE; n=3).

Parámetros	EM-AE de <i>L. dentata</i>	EM-AE de <i>R. officinalis</i>
Tamaño (nm)	143.41 \pm 18.50	121.11 \pm 12.33
Índice de polidispersidad	0.40 \pm 0.11	0.32 \pm 0.13
Potencial zeta (mV)	-23.50 \pm 0.23	-11.2 \pm 0.31
Viscosidad (cP)	1.48 \pm 0.01	1.47 \pm 0.01
pH	4.18 \pm 0.03	4.59 \pm 0.04

3.3 Desarrollo y validación de métodos analíticos por CG-FID para cuantificar los AE en NC poliméricas

Se inició con un método previamente establecido por Danh y cols. (115) y Derwich y cols. (116), y se continuó con la optimización de cada método por CG-FID (inyección directa). En las Tablas 14 y 15 se muestran los diferentes programas de temperatura desarrollados para el AE de *L. dentata* y *R. officinalis*.

Tabla 14. Optimización del programa de temperatura por CG-FID (inyección directa) para la caracterización química del AE de *L. dentata*.

Programa de temperatura	Condiciones
1	Inició a 55°C se mantuvo 1 min, se elevó a 8°C/min hasta 200°C, posteriormente se calentó hasta 230°C (a 15°C/min) se mantuvo 1 min. Tiempo total= 22.13 min Inyector: 260°C / Detector: 260° C
2	Inició a 60°C se mantuvo 1 min, se elevó a 8°C/min hasta 160°C, posteriormente se calentó hasta 220°C (a 20°C/min) se mantuvo 1 min. Tiempo total= 17.5 min Inyector: 260°C / Detector: 260°C
3	Inició a 60°C se mantuvo 1 min, se elevó a 10° C/min hasta 160° C, posteriormente se elevó a 15° C/min hasta 200° C y finalmente se calentó hasta 230°C (a 15° C/min). Tiempo total= 21.66 min Inyector: 260°C / Detector: 260° C
4	Inició a 70°C se mantuvo 1 min, se elevó a 8°C/min hasta 130°C, después se elevó a 15°C/min hasta 180°C y finalmente se calentó hasta 230°C (a 25° C/min) se mantuvo 1 min. Tiempo total= 15.83 min Inyector: 260°C / Detector: 260°C
5	Inició a 70°C, se mantuvo 1 min, se elevó a 130°C (a 8°C/min) se mantuvo 1 min, se elevó a 170°C (a 17°C/min) y finalmente se calentó hasta 230°C (a 25°C/min). Tiempo total= 14.25 min Inyector: 220°C / Detector: 260°C

Tabla 15. Optimización del programa de temperatura por CG-FID (inyección directa) para la caracterización química del AE de *R. officinalis*.

Programa de temperatura	Condiciones
1	Inició a 50°C se mantuvo 1 min, se elevó a 10°C/min hasta 200°C, posteriormente se elevó a 15°C/min hasta 230°C se mantuvo 1 min. Tiempo total= 18 min. Inyector: 260°C / Detector: 260°C
2	Inició a 55°C se mantuvo 1 min, se elevó a 8°C/min hasta 200°C, posteriormente se elevó a 15°C/min hasta 230°C se mantuvo 1 min. Tiempo total= 22.13 min Inyector: 260°C / Detector: 260°C
3	Inició a 60°C, se elevó a 10°C/min hasta 100°C y posteriormente se elevó a 5°C/min hasta 150°C durante 1 min y finalmente se calentó hasta 230°C (a 20°C). Tiempo total= 19 min Inyector: 260°C / Detector: 260°C
4	Inició a 60°C se mantuvo 1 min, se elevó a 10°C/min hasta 100°C, posteriormente se elevó a 5°C/min hasta 150°C durante 1 min y finalmente se calentó hasta 230°C (a 25°C). Tiempo total= 19.2 min Inyector: 260°C / Detector: 260°C
5	Inició a 60°C se mantuvo 1 min, se elevó a 10°C/min hasta 160°C, posteriormente se elevó a 20°C/min hasta 200°C y finalmente se elevó a 15°C/min hasta 230°C durante 1 min. Tiempo total= 16 min Inyector: 260°C / Detector: 260°C

Se seleccionaron las condiciones de los programas de temperatura 5 tanto para el AE de *L. dentata* como el de *R. officinalis*. Los cromatogramas obtenidos para ambos AE con el correspondiente programa 5 se muestran en las Figuras 24 y 25.

Como estándar interno se seleccionó el 4-alilanol y el linalol, para el AE de *L. dentata*, y *R. officinalis*, respectivamente (Figuras 26 y 27, respectivamente).

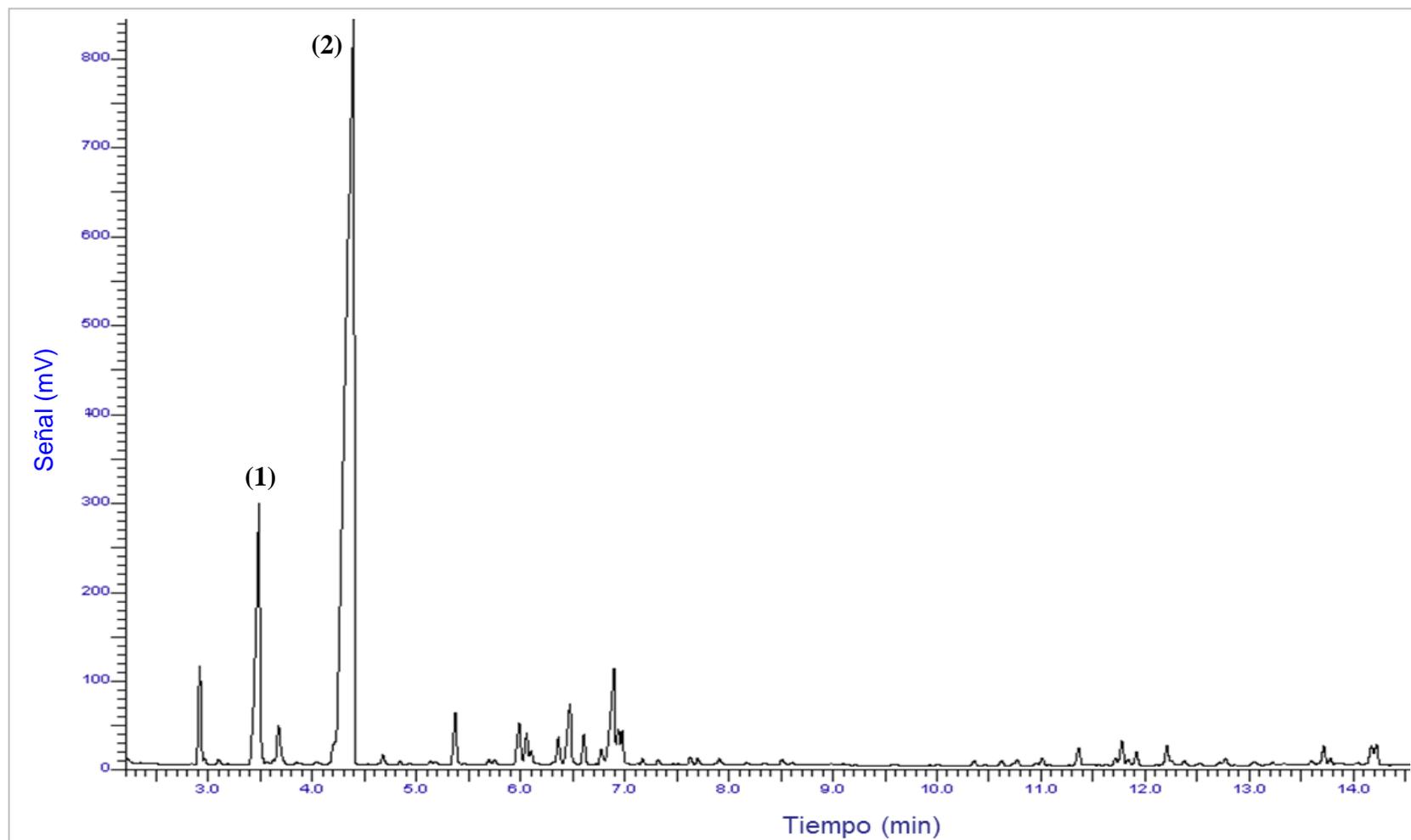


Figura 24. Cromatograma del AE de *L. dentata* (2 mg/mL) por CG-FID. Se señalizan los componentes mayoritarios: 1) β -pineno y 2) 1,8-cineol.

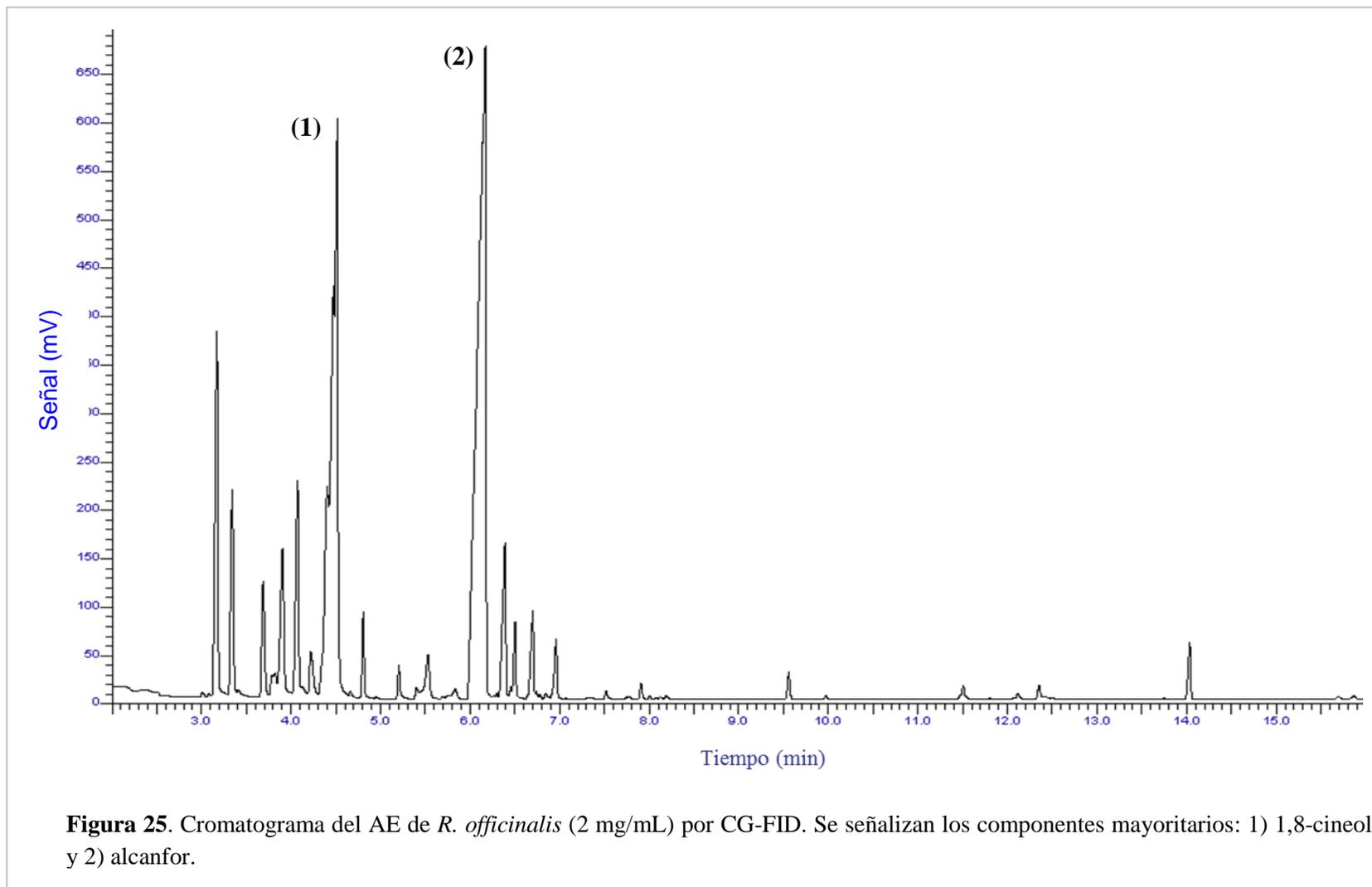


Figura 25. Cromatograma del AE de *R. officinalis* (2 mg/mL) por CG-FID. Se señalizan los componentes mayoritarios: 1) 1,8-cineol y 2) alcanfor.

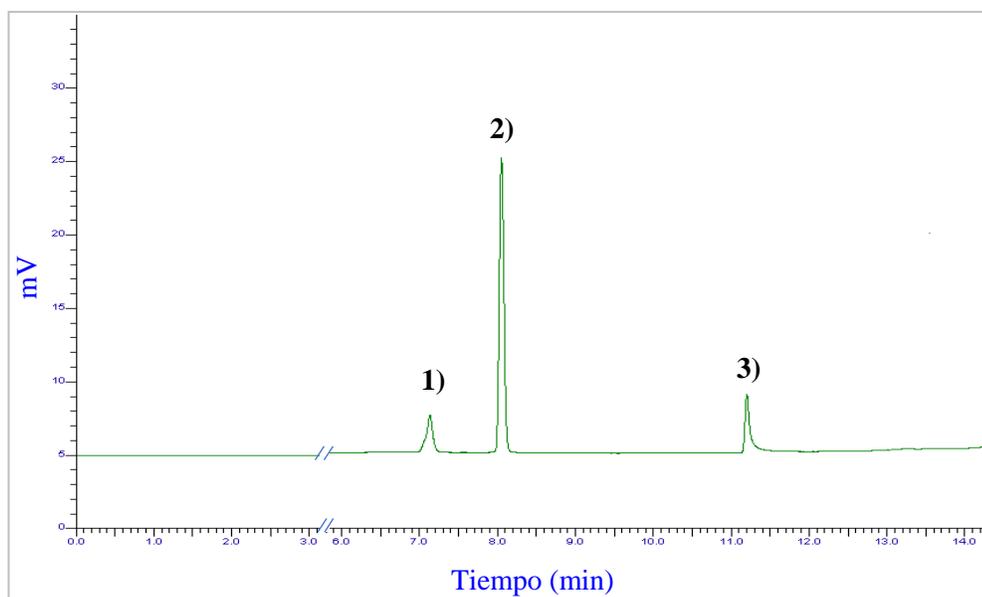


Figura 26. Cromatograma de la mezcla de estándares seleccionados (160 $\mu\text{g/mL}$) para el AE de *L. dentata* por CG-FID. 1) β -pineno y 2) 1,8-cineol, y 3) 4-alilanisol (estándar interno a 20 $\mu\text{g/mL}$).

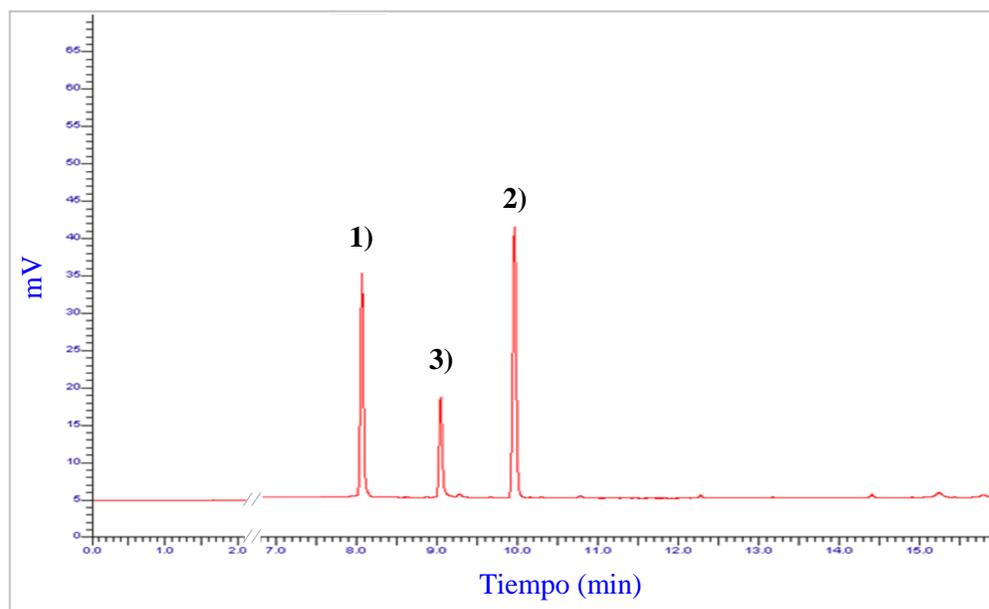


Figura 27. Cromatograma de la mezcla de estándares seleccionados (160 $\mu\text{g/mL}$) para el AE de *R. officinalis* por CG-FID. 1) 1,8-cineol y 2) alcanfor, y 3) linalol (estándar interno a 20 $\mu\text{g/mL}$).

Una vez seleccionados los métodos cromatográficos y el estándar interno para cada AE, se validó el método analítico para cuantificar los componentes mayoritarios de cada AE, de acuerdo a los criterios de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058) (117).

Para la validación del sistema se evaluó la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión (repetibilidad y precisión intermedia), mientras que para la validación del método se evaluó la exactitud y precisión (repetibilidad y precisión intermedia). En la Tabla 16 se muestran los parámetros de validación evaluados para el AE de *L. dentata*.

Tabla 16. Parámetros de validación del método para el AE de *L. dentata* por CG-FID (inyección directa).

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALITICO PARA EL AE DE <i>L. dentata</i>		
Validación del sistema		
Parámetro	β-pineno	1,8-cineol
Linealidad (r^2)	0.999	0.999
Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)	0.147	1.279
Límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)	0.446	3.876
Precisión		
* Repetibilidad (% DER)	2.53	2.59
* Precisión Intermedia (% DER)	2.70	2.95
Validación del método		
Parámetro	β-pineno	1,8-cineol
Exactitud (% Recuperación)	97.17	100.98
Precisión		
* Repetibilidad (% DER)	4.86	4.98
* Precisión Intermedia (% DER)	8.91	6.42

De la misma manera se realizó la validación del método para el AE de *R. officinalis*. En la Tabla 17 se muestran los parámetros de validación evaluados para el AE de *R. officinalis*.

Tabla 17. Parámetros de validación del método para el AE de *R. officinalis* por CG-FID (inyección directa).

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL AE DE <i>R. officinalis</i>		
Validación del sistema		
Parámetro	1,8-cineol	Alcanfor
Linealidad (r^2)	0.999	0.999
Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)	0.478	0.624
Límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)	1.449	1.890
Precisión		
* Repetibilidad (% DER)	3.64	3.38
* Precisión Intermedia (% DER)	3.93	4.38
Validación del método		
Parámetro	1,8-cineol	Alcanfor
Exactitud (% Recuperación)	100.53	99.98
Precisión		
* Repetibilidad (% DER)	4.53	4.00
* Precisión Intermedia (% DER)	4.93	4.82

3.4 Actividad antioxidante de los AE libres y nanoencapsulados.

Para evaluar la capacidad antioxidante de los AE libres y NC-AE se modificaron dos técnicas de inhibición de la lipoperoxidación. En ambos métodos, se empleó el modelo de ácido linoleico como sustrato de reacción, los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición (%I) de la lipoperoxidación.

a) Inhibición de la lipoperoxidación en una emulsión de ácido linoleico por el método de ABAP (118).

Se calcularon los %I de la lipoperoxidación de los controles positivos, AE libres y NC-AE con la fórmula 10. En la Tabla 18 se muestran los %I obtenidos para los controles positivos, AE libres y NC-AE a una concentración de 50 µg/mL.

Tabla 18. Porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación (%I) por el método de ABAP (Media ± DE, n=3)

Porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación (%I)	
Controles/AE	50 µg/mL
1,8-cineol	27.67 ± 0.98**
Alcanfor	28.64 ± 0.20 ^{ns}
Carvacrol	30.11 ± 0.93
Timol	30.95 ± 1.06
AE- <i>L. dentata</i>	24.69 ± 0.57**
AE- <i>R. officinalis</i>	24.26 ± 1.10***
NC-AE- <i>L. dentata</i>	20.31 ± 0.70****
NC-AE- <i>R. officinalis</i>	20.14 ± 0.61****
NP-blanco	11.44 ± 0.88

Indica diferencias significativas de

** $p < 0.01$ AE de *L. dentata* comparado con 1,8-cineol.

** $p < 0.01$ 1,8-cineol comparado con carvacrol.

**** $p < 0.001$ AE de *R. officinalis* comparado con alcanfor.

**** $p < 0.0001$ NC-AE de *R. officinalis* comparado con AE de *R. officinalis*.

**** $p < 0.0001$ NC-AE de *L. dentata* comparado con AE de *L. dentata*.

ns (no diferencia significativa) alcanfor comparado con timol

b) Determinación de la actividad antioxidante en emulsión de ácido linoleico por el método de tiocianato férrico (FTC) (122).

La actividad antioxidante total se determinó en una emulsión de ácido linoleico por el método del tiocianato férrico (FTC). En la Figura 28 se muestran las absorbancias de los controles positivos a tres niveles de concentración (15, 30 y 45 $\mu\text{g/mL}$) en diferentes tiempos de incubación (0, 5, 25 y 30 horas).

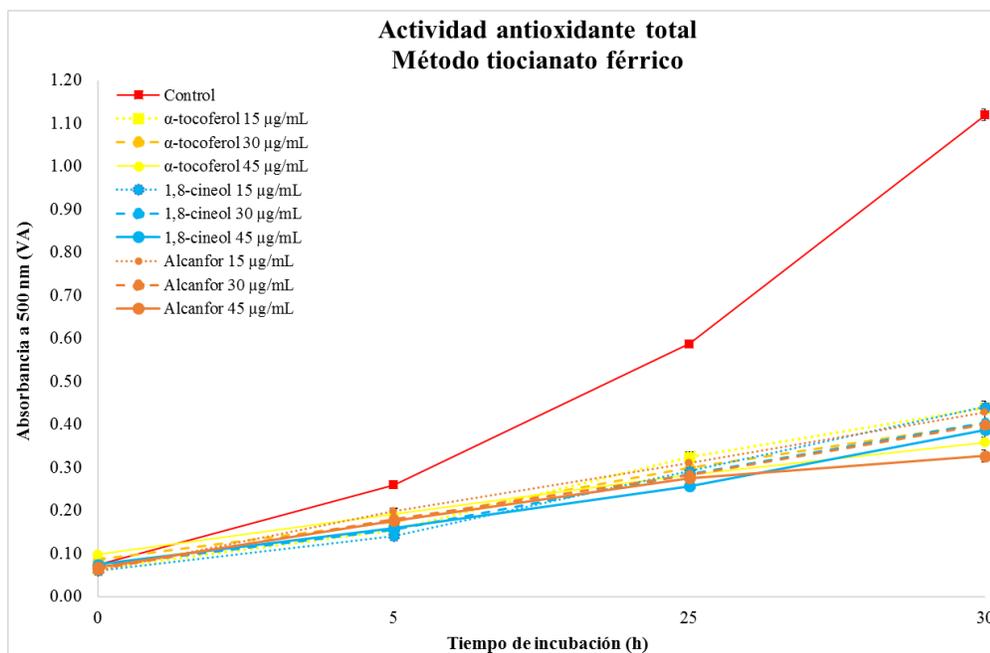


Figura 28. Absorbancias de los controles positivos (15, 30 y 45 $\mu\text{g/mL}$) en función del tiempo de incubación (0, 5, 25 y 30 horas) (Media \pm DE, n=3).

En el Anexo IV se presentan los valores de absorbancia obtenidos para los controles positivos, AE libres y NC-AE, en sus respectivas concentraciones en función del tiempo de incubación (Tabla 23). Así mismo, se muestran las gráficas de %I de la peroxidación de lípidos del AE de *L. dentata* y *R. officinalis* a las tres concentraciones evaluadas después de 30 horas de incubación (Figura 38 y 39, respectivamente).

En la Tabla 19 se muestran los %I de la lipoperoxidación obtenidos para los controles positivos, AE libres y NC-AE al tiempo de 30 horas de incubación (Media \pm DE, n=3).

Tabla 19. Porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación (%I) por el método FTC (15, 30 y 45 μ g/mL) (Media \pm DE, n=3)

Porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación (%I)			
Controles/AE	15 μg/mL	30 μg/mL	45 μg/mL
α-tocoferol	60.83 \pm 0.86	64.05 \pm 0.67	68.01 \pm 0.59
1,8-cineol	60.60 \pm 0.81	63.99 \pm 0.57	65.36 \pm 1.05**
Alcanfor	61.79 \pm 0.86	64.32 \pm 0.95	70.83 \pm 0.90**
AE-<i>L. dentata</i>	60.21 \pm 0.52	63.33 \pm 0.95	66.79 \pm 0.67 ^{ns}
AE-<i>R. officinalis</i>	59.85 \pm 1.18	63.21 \pm 1.01	65.21 \pm 0.66 ^{ns,****}
NC-AE-<i>L. dentata</i>	57.59 \pm 0.82	60.57 \pm 0.63	61.93 \pm 0.87****
NC-AE-<i>R. officinalis</i>	56.28 \pm 0.72	59.97 \pm 0.58	61.70 \pm 0.67***

Indica diferencias significativas de

** $p < 0.01$ controles positivos comparados con α -tocoferol.

*** $p < 0.001$ NC-AE de *R. officinalis* comparado con AE de *R. officinalis*.

*** $p < 0.001$ 1,8-cineol comparado con alcanfor.

**** $p < 0.0001$ AE de *R. officinalis* comparado con alcanfor.

**** $p < 0.0001$ NC-AE de *L. dentata* comparado con AE de *L. dentata*.

^{ns} (no diferencia significativa) AE de *L. dentata* comparado con AE de *R. officinalis*.

^{ns} (no diferencia significativa) AE de *L. dentata* / *R. officinalis* comparados con 1,8-cineol.

3.5 Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con técnicas de bioingeniería

Con el objetivo de conocer la profundidad total del EC de la oreja de cerdo, se evaluó la pérdida de agua transepidermica ($\text{g}/\text{m}^2\text{h}$) después del arranque de las 17 cintas aplicadas en base a la técnica de *tape stripping* previamente optimizada.

En la Figura 29 se muestran los resultados de pérdida de agua ($\text{g}/\text{m}^2\text{h}$) en función de la profundidad de EC acumulado (μm) por la técnica de *tape stripping*.

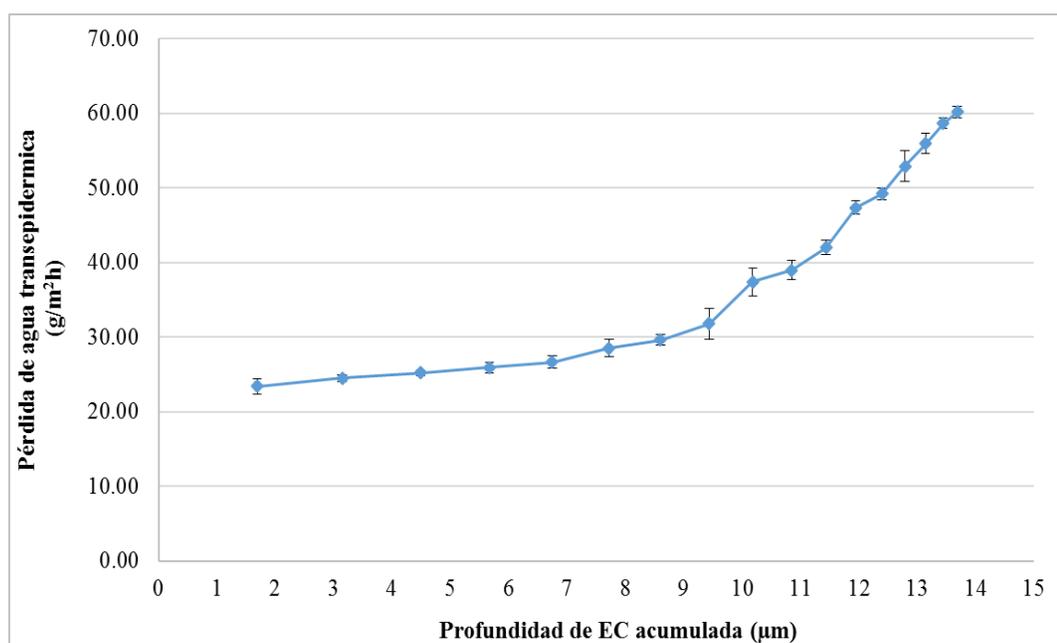


Figura 29. Pérdida de agua transepidermica ($\text{g}/\text{m}^2\text{h}$) en función de la profundidad de EC acumulada (μm).

Para la evaluación de los parámetros biofísicos de la piel, se determinaron los valores basales de la pérdida de agua transepidermica, pH, contenido de agua del EC y cantidad

de sebo, en la piel de oreja de cerdo antes de la aplicación de los AE. Los resultados de cada parámetro se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Parámetros biofísicos basales de la piel de cerdo (Media \pm DE, n=54)

Parámetros biofísicos basales de la piel de cerdo				
	Pérdida de agua transepidérmica (g/m²h)	pH	Contenido de agua del EC (UA)	Cantidad de sebo (μg/cm²)
Piel de oreja de cerdo	30.07 \pm 2.20	5.70 \pm 0.11	36.82 \pm 2.73	0.91 \pm 0.83

UA: Unidades arbitradas

Una vez establecidos los valores basales de la piel de oreja de cerdo, se realizaron estudios de permeación *in vitro* empleando celdas de Franz con la aplicación de las EM/NP-blanco, EM-AE, y NC-AE de *L. dentata* o *R. officinalis* durante 1, 2 y 4 horas de contacto con la piel.

Después de la aplicación de las formulaciones en la superficie de la piel, se midieron los valores de pérdida de agua transepidérmica, pH, contenido de agua del EC y cantidad de sebo. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$, con el programa GraphPad Prism 7.03. En las Figuras 30, 31, 32 y 33 se muestran los resultados del análisis estadístico de los valores para la pérdida de agua transepidérmica, pH, contenido de agua del EC y cantidad de sebo, respectivamente (Media \pm DE, n=5).

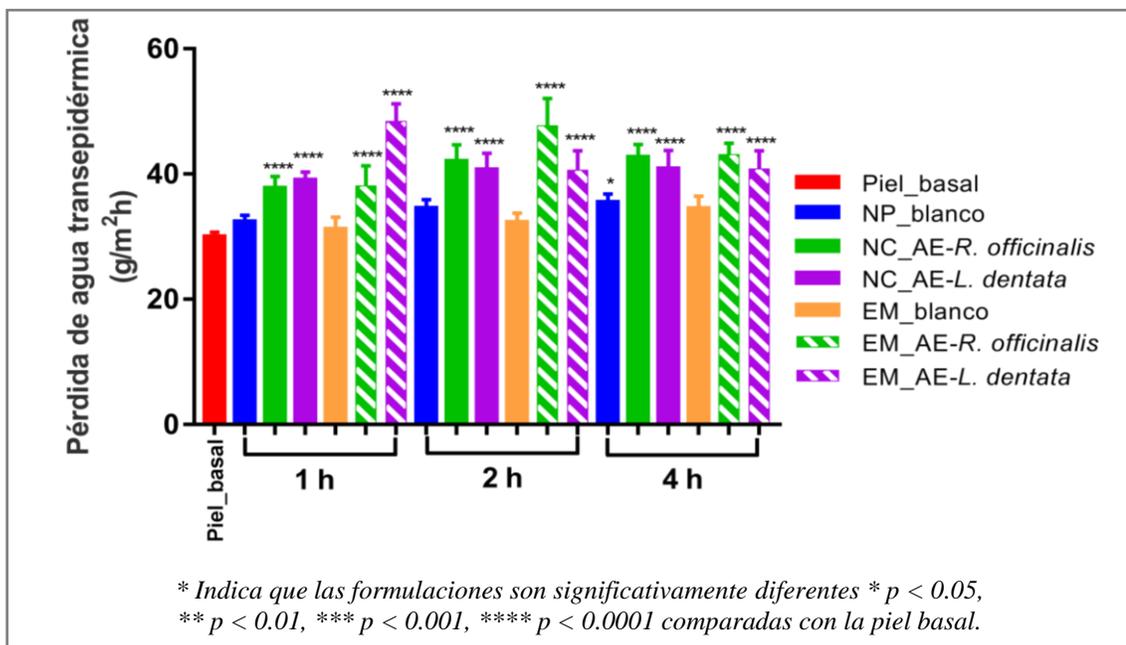


Figura 30. Análisis estadístico de los resultados de pérdida de agua transepidermica, antes y después de la aplicación de las NP/EM-blanco, EM-AE y las NC-AE.

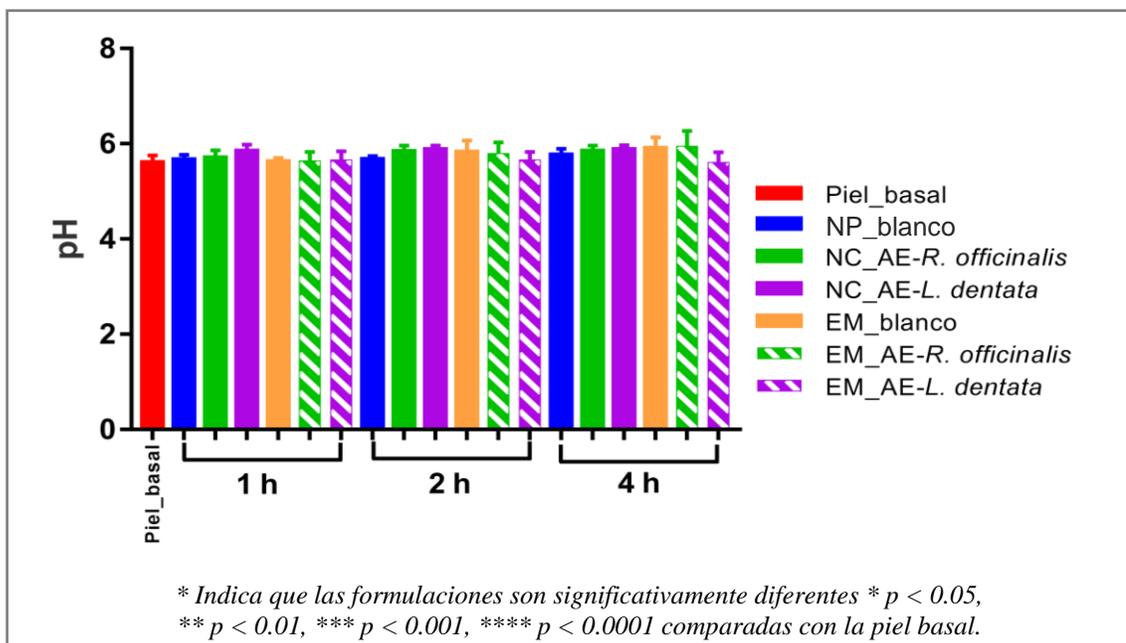


Figura 31. Análisis estadístico de los resultados de pH, antes y después de la aplicación de las NP/EM-blanco, EM-AE y las NC-AE.

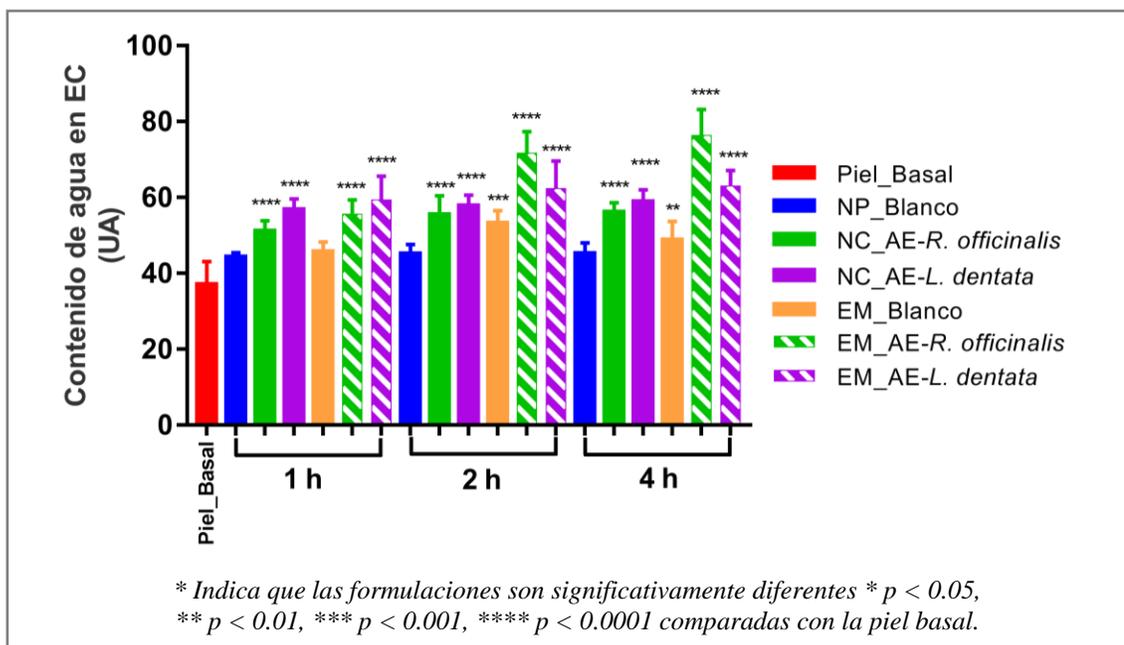


Figura 32. Análisis estadístico de los resultados de contenido de agua del EC, antes y después de la aplicación de las NP/EM-blanco, EM-AE y las NC-AE.

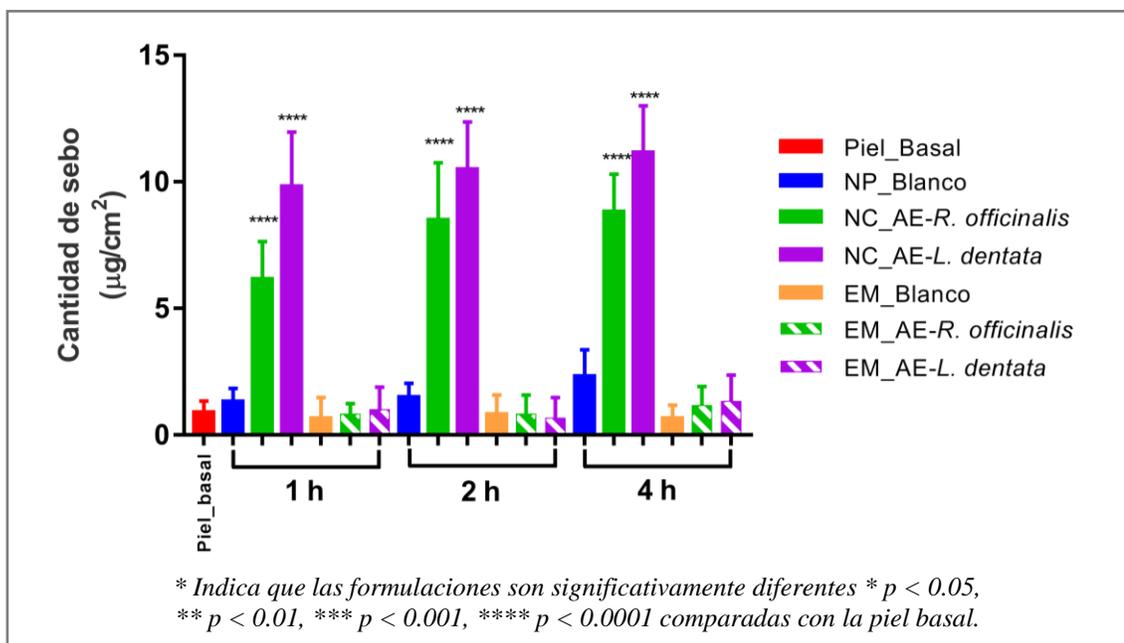


Figura 33. Análisis estadístico de los resultados de la cantidad de sebo, antes y después de la aplicación de las NP/EM-blanco, EM-AE y las NC-AE.

En el Anexo V se muestran los resultados de las evaluaciones biofísicas de la piel de cerdo posterior a la aplicación de las EM-AE y NC-AE (Tabla 24 y 25, respectivamente).

3.6 Perfil dermatocinético de los AE libres y nanoencapsulados en piel de cerdo, con estudios *in vitro* de permeación y *tape stripping*.

Los experimentos de permeación *in vitro* fueron desarrollados aplicando las EM-AE y las NC-AE en la piel durante 1, 2 y 4 horas de tiempo de contacto. Posteriormente se cuantificaron los dos componentes huella de cada AE presentes en el EC removido por la técnica de *tape stripping*.

En la Figura 34 se presenta la cantidad de β -pineno (color rosa) y 1,8-cineol (color morado) en el EC en función del tiempo de contacto con la piel de las EM-AE y las NC-AE de *L. dentata* durante 1, 2 y 4 h.

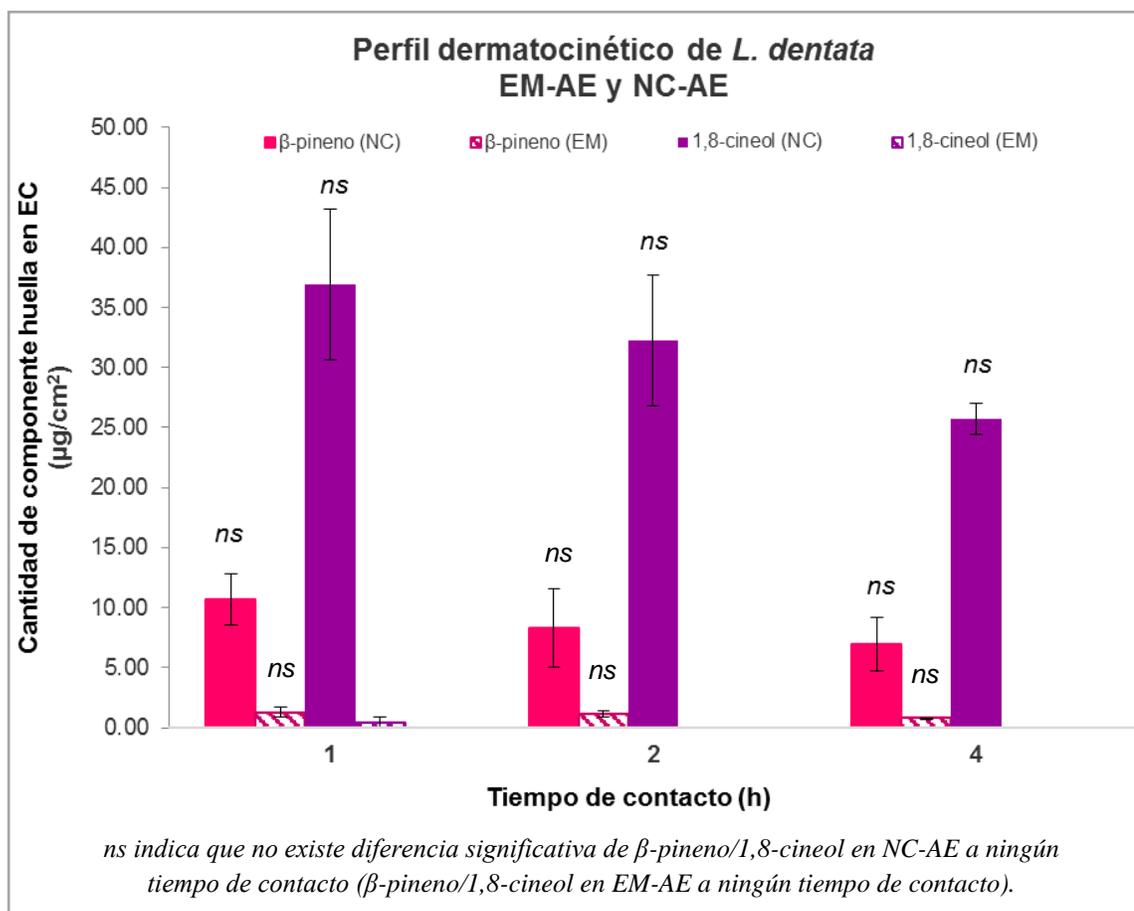


Figura 34. Cantidad de β -pineno y 1,8-cineol en EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo de contacto con la piel de las EM-AE y las NC-AE NC de *L. dentata* durante 1, 2 y 4 h. (Media \pm DE; n=5).

En la Figura 35 se presenta la cantidad de 1,8-cineol (color verde) y alcanfor (color azul) en el EC en función del tiempo de contacto con la piel de las EM-AE y las NC-AE de *R. officinalis* durante 1, 2 y 4 h.

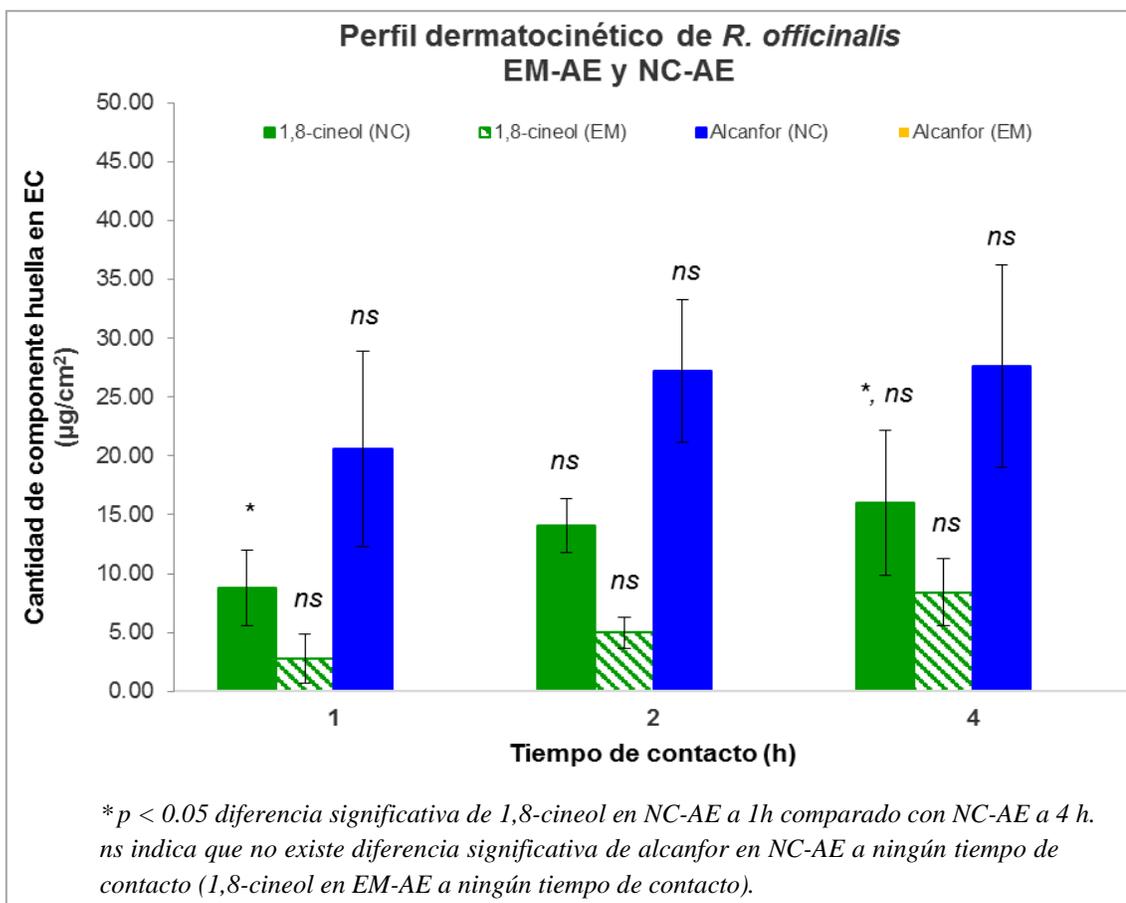


Figura 35. Cantidad de 1,8-cineol y alcanfor en EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo de contacto con la piel de las EM-AE y las NC-AE NC de *R. officinalis* durante 1, 2 y 4 h. (Media \pm DE; n=5).

En el Anexo VI se presenta la cantidad de los componentes huella en el EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo de contacto con la piel de la EM-AE y las NC-AE NC de *L. dentata* y *R. officinalis* durante 1, 2 y 4 h (Tabla 28).

CAPÍTULO 4

DISCUSION

4.1 Obtención y caracterización física y química de los AE de *Lavandula dentata* y *Rosmarinus officinalis*

Las plantas fueron autenticadas en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se identificaron como *Lavandula dentata* y *Rosmarinus officinalis* (Anexo I). Una vez autenticadas las plantas los AE fueron obtenidos por la técnica de hidrodestilación durante la temporada de colecta de primavera-verano. Esta técnica ha sido comúnmente utilizada para la extracción de AE ya que evita la degradación del material vegetal. El AE es extraído a partir de la planta junto con el vapor de agua y es separado después de la condensación (123). El rendimiento de extracción de los AE por hidrodestilación es variable y depende de parámetros, tales como: temporada de colecta, tipo de suelo, lugar de cosecha y variedad de la planta (124).

Los rendimientos de extracción de los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* obtenidos por hidrodestilación se muestran en la Tabla 7. Específicamente, para el AE de *L. dentata*, el rendimiento fue de $0.59 \pm 0.22\%$ (p/p). En el 2010, Imelouane y cols., obtuvieron por hidrodestilación el AE *L. dentata* originaria de Marruecos, con un porcentaje de rendimiento de 1.41% (p/p) (125). Estas importantes variaciones pueden ser atribuidas a las diferentes temporadas de colecta y/o condiciones climáticas en los sitios de recolección de las plantas aromáticas (62).

Con respecto al AE de *R. officinalis*, se obtuvo un porcentaje de rendimiento de $0.73 \pm 0.18\%$ (p/p). Este resultado concuerda con el reportado por Bekkara y cols., el cual obtuvo un porcentaje de rendimiento de 0.8% (p/p) para el AE de *R. officinalis* de la misma variedad de planta y técnica de extracción (126). Por otro lado, Zaouali y cols., analizaron dos variedades de AE de *R. officinalis* (*typicusand* y *trogldytorum*) de zona semi-húmeda y árida superior de Túnez, respectivamente. El rendimiento de extracción de la variedad *trogldytorum* de zona árida fue aproximadamente 2.3 veces mayor que la variedad *typicusand* de zona húmeda. Estos resultados ponen en evidencia que los porcentajes de rendimiento pueden variar de acuerdo a las variedades de la planta y a las condiciones climatológicas relacionadas con la región y tipo de suelo (127).

En la industria de los AE se ha establecido la importancia de evaluar las características físicas de los AE para garantizar su control de calidad de forma rutinaria. Las variaciones en los parámetros físicos, tales como densidad, índice de refracción y rotación óptica permiten detectar posibles adulteraciones o degradación de sus

componentes, y por ende, asegurar su actividad biológica (128). En este sentido, se evaluaron los parámetros físicos de densidad, índice de refracción y rotación óptica en base a la FEUM (109). En una primera etapa, se seleccionaron los estándares de anetol, eugenol y limoneno como controles de las evaluaciones debido a su similitud fisicoquímica con los componentes de los AE (*i.e. polaridad, presión de vapor*) para posteriormente evaluar los AE. En la Tabla 8, se presentan los valores obtenidos de la caracterización física de los controles y AE. En el caso de los controles, se observa que los valores se encuentran dentro de los intervalos reportados en la FEUM (129) (Anexo II) lo cual confirma la repetibilidad y reproducibilidad de las evaluaciones físicas.

Para la caracterización del AE de *R. officinalis*, el índice de refracción y la densidad relativa están dentro de los intervalos de aceptación establecidos en la FEUM (129) (Anexo II); sin embargo, los valores de rotación óptica están fuera del intervalo establecido. Es importante mencionar que la FEUM (129) no especifica la zona ni la temporada de colecta de la planta analizada, por lo que podría haber pequeñas variaciones en los valores. En el caso del AE de *L. dentata*, no se cuenta con valores establecidos en la FEUM; únicamente está reportada la caracterización física de *L. angustifolia* (Anexo II) (129). Los valores obtenidos en la caracterización física de *L. dentata*, son mayores que los establecidos para *L. angustifolia*. Con relación a esto, Lis-Balchin establece que las diferentes especies de Lavandula presentan variaciones en su composición química, por ejemplo, la *L. angustifolia* presenta entre 30-40% de linalol a diferencia de la *L. dentata* que presenta un 1.63% (Tabla 9). Estas variaciones en la

composición química, efectivamente, se reflejan en los diferentes valores obtenidos en su caracterización física.

La caracterización química realizada por CG-MS y CG-FID permitió identificar los componentes presentes en los AE, así como su porcentaje de abundancia (110). La CG representa una técnica analítica adecuada para el análisis cualitativo y cuantitativo de los AE, ya que ofrece alta sensibilidad, gran estabilidad y un rango dinámico lineal excepcionalmente alto que permite el análisis de componentes volátiles del AE a concentraciones muy bajas o en niveles de trazas (130).

En un primer paso, se obtuvieron los cromatogramas de ambos AE (Figuras 13 y 14) utilizando métodos por CG-MS previamente desarrollados (110). Posteriormente, se realizó la correcta identificación de los componentes presentes en los AE en base a la biblioteca NIST, al índice de Kovats, al índice aritmético y a los datos de referencia (111). En un segundo paso, los cromatogramas CG-MS fueron comparados con los cromatogramas obtenidos por CG-FID (Figuras 15 y 16) y se calculó, en base a las áreas, su porcentaje de abundancia (%A). La composición química y el %A de los componentes de cada AE se muestran en la Tabla 9.

Para el AE de *L. dentata*, se identificaron 16 componentes, el 80.71% del porcentaje total del AE corresponde a monoterpenos oxigenados, el 16.19% a monoterpenos hidrocarbonados y el 3.11% no fueron identificados. Los componentes con mayor %A fueron el 1,8-cineol (68.59%) y el β -pineno (11.53%), ambos monoterpenos. Estudios

realizados con el AE de *L. dentata* nativa de Túnez y obtenido por hidrodestilación, también determinaron que el 1,8-cineol es el componente mayoritario pero con un %A menor (131).

En relación con el AE de *R. officinalis*, se identificaron 22 componentes (Tabla 9), el 62.34% del área total del AE corresponde a monoterpenos oxigenados, el 35.14% a monoterpenos hidrocarbonados, el 1.07% a sesquiterpenos hidrocarbonados, el 0.87% a sesquiterpenos oxigenados y el 0.84% corresponde a alcoholes y cetonas. Sus componentes con mayor %A fueron el alcanfor (39.46%) y el 1,8-cineol (14.63%) ambos monoterpenos oxigenados. Ojeda-Sana y cols., reportaron un %A entre 18.7 y 21.6% para el 1,8-cineol en el AE de *Rosmarinus* obtenido por hidrodestilación (132). Sin embargo, Rašković y cols. reporta un %A del 43.77% para el 1,8-cineol como el constituyente principal del AE de *R. officinalis* (86). La diferencia en el %A puede ser atribuido al origen geográfico de la planta, ya que la planta fue recolectada en la zona del Mediterráneo y la planta del presente estudio fue recolectada en América del Norte.

En la Tabla 9 se observa que ambos AE presentan un alto %A de monoterpenos en su composición química. Diferentes grupos de trabajo han establecido que un alto %A de monoterpenos en el AE, favorece su actividad antioxidante. Específicamente, al 1,8-cineol, monoterpeno oxigenado, se le ha atribuido una buena actividad antioxidante (133).

Con el objetivo de realizar el seguimiento de los AE durante las pruebas biológicas en piel de cerdo, se seleccionaron los componentes mayoritarios de cada AE en base a su abundancia y actividad biológica. Para el AE de *L. dentata* se estableció el β -pineno y 1,8-cineol; mientras que para el AE de *R. officinalis* el 1,8-cineol y el alcanfor.

4.2 Obtención y caracterización fisicoquímica de NC y emulsiones con AE de *L. dentata* y *R. officinalis*

Para la formulación de las NC se utilizó la técnica de nanoprecipitación establecida por Fessi y cols (112). En la técnica de nanoprecipitación, la fase orgánica (FO) que contiene el polímero formador de NC se pone en contacto con la fase acuosa (FA) con una ligera agitación magnética. Cuando ambas fases están en contacto, el disolvente miscible en agua difunde desde la FO hacia la FA y lleva consigo las cadenas poliméricas que están en solución. Posteriormente, a medida que el disolvente difunde en la FA, las cadenas poliméricas se agregan permitiendo la formación de NC por la deposición interfacial de polímero después del desplazamiento del solvente (134).

Con base en el fundamento, se ha establecido que la formación de NC se ve influenciada por diversos factores como el tipo de polímero y disolvente, y la concentración de polímero en la FO (91). Para el tipo de polímero, se seleccionaron tres polímeros biocompatibles de la marca Eudragit[®] (L 100, E 100 y E PO), para asegurar su compatibilidad con la piel para su futura aplicación tópica (135).

Específicamente, el polímero Eudragit® L 100 ha sido comúnmente utilizado como polímero de recubrimiento entérico de activos para modificar su liberación. Es un polímero a base de ácido metacrílico y metilmetacrilato que tiene como grupo funcional el ácido carboxílico, lo cual le brinda una naturaleza aniónica (136).

Los polímeros E-100 y E PO se han utilizado ampliamente para mejorar la solubilidad de los activos no polares; ambos polímeros son versátiles, no son tóxicos y se han usado ampliamente en la formación de películas (137). En cuanto a su solubilidad, son solubles a un pH inferior a 5, lo cual favorecería su aplicación en piel, ya que esta membrana presenta un pH entre 5-6 (138).

La técnica de nanoprecipitación establece que el disolvente utilizado en la formación de NC, debe ser miscible en agua para favorecer la difusión de la FO hacia la FA (139). En base a lo anterior, los solventes evaluados fueron el etanol, acetona y una mezcla de acetona:isopropanol. Por otra parte, se ha observado que los parámetros de solubilidad de los disolventes permiten explicar las interacciones solvente-agua durante el proceso de difusión de la FO hacia la FA (134).

La solubilidad es una propiedad física que se relaciona directamente con la polaridad. Los tres disolventes evaluados tienen diferente polaridad, el etanol tiene una polaridad de 0.654, mientras que el isopropanol y la acetona tienen una polaridad de 0.546 y 0.355, respectivamente (140). Galindo-Rodríguez y cols., establecen que los disolventes más polares presentan una alta afinidad solvente-agua, promoviendo la difusión del

disolvente y la partición de las cadenas poliméricas en la FA, conduciendo a la formación de NP con menor tamaño (134). El etanol al ser más polar es más soluble en agua que la mezcla de disolventes acetona:isopropanol, esto se correlaciona con lo mencionado anteriormente, ya que las NP de menor tamaño (100 nm) fueron obtenidas con el etanol en FO, contrario a la mezcla de disolventes menos polares con NP de tamaño mayor a 200 nm.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos con los tres polímeros y los tres disolventes evaluados. Se puede apreciar que la presencia de agregados de polímero fue persistente en la mayoría de los casos, excepto cuando el polímero Eudragit® E PO se encontraba en la FO compuesta por la mezcla de acetona:isopropanol (50:50). Las NP-blancas formadas presentaron un tamaño de partícula de 221 ± 1.53 nm, con índice de polidispersidad de 0.156 ± 0.005 y no hubo formación de agregados en el lote final. Debido a lo anterior, el Eudragit® E PO fue seleccionado como el polímero formador de NC. Además es importante mencionar que la naturaleza catiónica del polímero, favorecería la interacción con la piel, como resultado de la interacción electrostática entre las cargas del polímero y la piel (141).

Una vez seleccionado el polímero formador de las NP, se evaluó la influencia de la concentración de polímero Eudragit® E PO. Se evaluaron tres concentraciones de Eudragit® E PO en la FO (20-25 mg/mL). En la Figura 17 se observa que al aumentar la concentración del polímero en la FO, el tamaño de la NP aumenta. De acuerdo al fundamento de la técnica, al existir una mayor cantidad de cadenas poliméricas por

unidad de volumen de disolvente, se favorecerá la formación de NP con un tamaño mayor (134). En base a lo anterior, se seleccionó la formulación con 22.5 mg/mL de polímero Eudragit® E PO en la FO seleccionada y las NP obtenidas presentaron un tamaño de partícula mayor a 200 nm con ausencia de agregados.

Posteriormente, se realizó la incorporación del AE a las NP-blanco. Kiliçarslan y cols., establecen que la relación polímero:activo influye en las características físicas de las formulaciones. Se menciona que la mayor eficiencia de encapsulación se obtiene con una relación 2:1 (polímero:activo) (142). En base a esto, los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* fueron individualmente incorporados en la FO en una relación 2:1 (polímero:AE), con una concentración de 11.25 mg/mL de cada AE en la FO.

Otro aspecto importante para evaluar en la formulación de NC-AE con aplicación biológica, es la purificación de las NC. El proceso de purificación de las NC consiste en la eliminación de los disolventes sin la pérdida de los componentes del AE. Para esto se evaluaron dos técnicas: la evaporación a presión reducida y la diálisis. Después de la purificación de las NC-AE por ambas técnicas, se obtuvieron cromatogramas de las NC purificadas con los métodos de CG-FID desarrollados. Por ejemplo, en la Figura 18 correspondiente al cromatograma de las NC-AE de *L. dentata*, se observa una diferencia en la resolución e intensidad de las señales en cada técnica de purificación.

Para las NC-AE de *L. dentata* purificadas por diálisis se obtuvieron intensidades mayores de ambos componentes huella que con la purificación por evaporación a

presión reducida. Para el β -pineno, se obtuvieron áreas 2.39 veces mayor con diálisis que con evaporación a presión reducida. De igual forma, el área para el 1,8-cineol fue 1.44 veces mayor con diálisis que con evaporación a presión reducida. Para las NC-AE de *R. officinalis*, se observa el mismo comportamiento para el 1,8-cineol, ya que el área fue 4.16 veces mayor en diálisis que con evaporación a presión reducida. En el caso del alcanfor, se obtuvo la misma área con las dos técnicas de purificación. Este comportamiento puede ser atribuido a que el alcanfor presenta la menor presión de vapor en comparación con los otros dos componentes huella. En base a lo anterior, se seleccionó la técnica de diálisis para la purificación de las NC.

En la Tabla 11 se muestra la caracterización fisicoquímica de las NC-AE purificadas por diálisis. Las NC-AE de *L. dentata*, presentaron un tamaño de 230.99 ± 8.85 nm con un IPD de 0.22 ± 0.03 mientras que las NC-AE de *R. officinalis*, mostraron un tamaño de 227.73 ± 2.96 nm con un IPD de 0.20 ± 0.03 . Ambas NC-AE presentaron un tamaño de partícula deseado (≥ 200 nm) para su aplicación en piel, de acuerdo con Álvarez-Román y cols., que observaron que las NP con tamaño mayor a 200 nm se distribuían de forma homogénea sobre el EC y en los folículos pilosos favoreciendo su efecto biológico (42).

Con relación al IPD, este es un parámetro que se asocia con la medición del grado de variabilidad del tamaño de las NC. Los valores de IPD varían de 0 a 1, el valor más alto indica una distribución de tamaño menos homogénea, mientras que los valores cercanos a cero indican que la muestra es monodispersa, es decir, presenta una variabilidad

mínima del tamaño de la población (134). En el Anexo III, se presentan los gráficos de las curvas de distribución del tamaño de las NC obtenidas (Figura 36 y 37).

En la Tabla 11, también se muestra el potencial zeta de las NC-AE. Este potencial se basa en la medición del potencial electrostático en la doble capa eléctrica (capa Stern-capas difusa) que rodea la NC en solución. Las NC con un potencial zeta mayor a +30 mV o menor a -30 mV se consideran fuertemente catiónicas o aniónicas, respectivamente, y suelen tener altos grados de estabilidad (143). Las formulaciones de NC-AE de *L. dentata* y *R. officinalis* presentaron valores de 50.40 ± 0.75 mV y 54.47 ± 0.45 mV, respectivamente. El valor positivo del potencial zeta es consistente con la naturaleza catiónica del polímero Eudragit® E PO seleccionado. El polímero forma una pared que rodea el núcleo de AE en la NC, exponiendo su carga positiva al exterior de la partícula. El potencial zeta positivo de las NC favorecería su interacción con la superficie de la piel que posee carga negativa y por atracción de cargas se facilitaría la deposición de las NC-AE en la piel (107).

Por otra parte, la estabilidad de las NC-AE se determinó evaluando el efecto del tiempo sobre el tamaño de las NC. En las Figuras 19 y 20 se puede apreciar que el tamaño y el IPD de las NC obtenidas se mantuvieron constantes, en un periodo de 8 semanas, demostrando su estabilidad durante este periodo de tiempo. Así mismo, se realizó una evaluación visual de las formulaciones de NC cargadas y purificadas y no se observó la presencia de AE libre en la superficie de las formulaciones, ni agregados de polímero o algún cambio macroscópico importante. También, se puede observar que,

después de 8 semanas, el tamaño disminuyó en las NC con ambos AE. Para las NC-AE de *L. dentata*, la disminución del tamaño fue de un 25% del tamaño inicial, mientras que para las NC-AE de *R. officinalis* fue del 35%. Así mismo se observó la presencia de agregados en ambas formulaciones.

Como parte de la caracterización química de las NC-AE, se realizó un análisis de IR-FT en un intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , para determinar las posibles interacciones entre el AE y el polímero formador de las NC.

En la Figura 21 se muestra el espectro IR del polímero Eudragit® E PO, en el cual se identifican las bandas características de grupos funcionales presentes en la estructura del Eudragit® E PO (Anexo VII), en la región de 1160-1200 cm^{-1} se observa el estiramiento característico de grupos éster, mientras que en la región 1650-1750 cm^{-1} se observan señales de vibración que corresponden a grupos carbonilo C=O. En el espectro A de la Figura 22 obtenido del AE de *L. dentata* se identifican las señales de estiramiento C-C en la región de 950-1200 cm^{-1} , característicos de la presencia del 1,8-cineol en el AE, así como señales C=C en la región de 1600-1650 cm^{-1} grupo funcional presente en la estructura del β -pineno (Anexo VII) (144). Por otro lado, en la Figura 23 el espectro A corresponde al AE de *R. officinalis*, en el cual se observan señales de estiramiento de grupos carbonilo C=O en la región 1700-1750 cm^{-1} presente en la estructura del componente alcanfor, así mismo se identifican las señales de estiramiento C-C en la región de 950-1200 cm^{-1} , característicos de la presencia del 1,8-cineol en el AE, otro de los componentes mayoritarios de este AE. Es importante destacar, que las señales con mayor intensidad corresponden a los componentes mayoritarios de cada AE.

En el caso de las NC-AE de *L. dentata* y *R. officinalis* (espectros B de las Figuras 22 y 23, respectivamente), fue posible observar bandas características de los grupos funcionales presentes en el polímero Eudragit® E PO (1100-1150 cm⁻¹ y 1700-1750 cm⁻¹), además, no se observa la aparición de bandas correspondientes a la formación de nuevos compuestos, lo cual indica que sólo hay interacción química entre los compuestos formadores de las NC. Lo cual es indicativo de la encapsulación de los AE con el polímero formador de NC.

En la caracterización de las NC, es fundamental establecer el contenido de AE en las NC para su correcta dosificación y aplicación biológica. Se determinaron los porcentajes de encapsulación (%E) y eficiencia de encapsulación (%EE) de los dos componentes “huella” seleccionados para cada AE utilizando las Fórmulas 2 y 3. Cabe mencionar que para cuantificar los componentes huella de ambos AE se utilizaron los métodos de CG-FID previamente validados (Capítulo 3.3).

En la Tabla 12, se muestran los resultados obtenidos del %E y %EE para los componentes huella de cada NC-AE. Para las NC-AE de *L. dentata* se obtuvo un %E de 1.56% para el β-pineno y de 2.89% para el 1,8-cineol. Con un %E total de 4.45% con una variación de 0.25%. En el caso de las NC-AE de *R. officinalis*, se observó un %E de 2.95% para el 1,8-cineol y de 2.41% para el alcanfor. Con un %E total de 5.36% con una variación de 0.27%. Esto indica que aproximadamente el 4.45% o el 5.36% de la NC está formada por los dos componentes huella del aceite de *L. dentata* o de *R. officinalis*, respectivamente y el resto corresponde al Eudragit® E PO. Los %E obtenidos en este

trabajo son menores al obtenido por Salas-Cedillo con las NC de AE de *Schinus molle*, con un %E total del 7.84% con una variación de 0.006% (47). Esta diferencia puede deberse a que Salas Cedillo utilizó otro polímero formador de NC (Eudragit® L100-55) y cuantificó tres componentes huella (mirceno, α -felandreno y limoneno) con diferentes propiedades fisicoquímicas.

Se ha considerado que la eficiencia de la técnica de nanoprecipitación, depende de su naturaleza química del activo y particularmente de su polaridad (145). El 1,8-cineol tiene un coeficiente de partición de 2.74 y el alcanfor de 2.38, y se observó que ambos componentes tuvieron un %E de aproximadamente 3% en las NC-AE de *R. officinalis* independientemente del %A en el AE (14.63% de 1,8-cineol y 39.46% de alcanfor). En el caso de las NC-AE de *L. dentata*, el 1,8-cineol tuvo un %E de $2.89\% \pm 0.12\%$ a pesar de tener un %A del 68.59%.

Por otra parte, para las NC-AE de *L. dentata*, se obtuvo un %EE de 28.97% para el β -pineno y de 11.31% para el 1,8-cineol, con un %EE total del 40.28% con una variación de 2.93%. En las NC-AE de *R. officinalis*, se obtuvo un %EE de 43.29% para el 1,8-cineol y de 14.61% para el alcanfor, con un %EE total de 57.90% con una variación de 2.84%. Lo anterior indica que los componentes de ambos AE fueron al menos encapsulados en las NC en un 40.28% para el AE de *L. dentata* y un 57.90% para el AE de *R. officinalis*. Diferentes publicaciones mencionan que los porcentajes de eficiencia de encapsulación de activos lipofílicos por la técnica de nanoprecipitación se encuentran alrededor del 80% (145). Wu y cols., mencionan que los componentes polares presentan

una mayor tendencia a difundir de la FO hacia la FA, lo cual podría favorecer la encapsulación de componentes no polares (146). Con relación a esto, en las NC-AE de *L. dentata*, el %EE del β -pineno fue del doble en comparación con el %EE del 1,8-cineol a pesar de que este último tiene un %A del 68.59%. Este comportamiento se puede deber a que los dos componentes tienen polaridad diferente, el β -pineno es no polar (LogP(o/w) de 4.16) a diferencia del 1,8-cineol con un LogP(o/w) de 2.74. Sin embargo, este comportamiento no se observó en las NC-AE de *R. officinalis*.

Si bien los %EE obtenidos en este trabajo para los dos AE fue menor al 60%, es importante enfatizar que la encapsulación de un producto natural complejo, como los AE, es un proceso que representa mayor dificultad debido a su naturaleza volátil en comparación con la encapsulación de un fármaco (147).

4.3 Desarrollo y validación de métodos analíticos por CG-FID para cuantificar los AE en NC poliméricas

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante evaluaciones de laboratorio, que las características de desempeño del método satisfacen los requisitos para su aplicación analítica (109). Los métodos analíticos por CG-FID (inyección directa) desarrollados para cuantificar los componentes “huella” de los AE en las NC, se validaron bajo los criterios para la validación de métodos fisicoquímicos expedidos por la comisión de control analítico y ampliación de cobertura de la Secretaría

de Salud (CCAYAC-P-058, 2011) (117). Se evaluaron los siguientes parámetros para la validación del sistema: linealidad, límite de cuantificación, límite de detección y precisión, expresada como repetibilidad y precisión intermedia; mientras que para la validación del método se evaluó: exactitud y precisión, expresada como repetibilidad y precisión intermedia.

En relación a los programas cromatográficos se inició con las condiciones cromatográficas previamente descritas por Danh y cols. (115) y Derwich y cols. (116). Posteriormente, se modificaron estos programas cromatográficos, con el objetivo de mejorar la separación de las señales cromatográficas de los AE y reducir el tiempo de análisis de los AE. Para el AE de *L. dentata* se modificó la rampa de calentamiento y se disminuyó el tiempo de análisis del AE a 14.5 min en comparación con 83 min de análisis propuesto por Dahn y cols (115). Para el AE de *R. officinalis* se modificaron la rampa de calentamiento y la temperatura del inyector y detector, con lo que se redujo el tiempo de análisis a 16 min comparado con el tiempo de 60 min obtenido por Derwich y cols (116). Las modificaciones realizadas en los métodos por CG-FID permitieron obtener un análisis simple con mejor resolución, reduciendo el tiempo de corrida, así como el costo de validación y análisis de cada AE. Los programas cromatográficos modificados para el AE de *L. dentata* y *R. officinalis*, se muestran en la Tabla 14 y 15, respectivamente. Para cada AE se seleccionó el correspondiente programa 5.

La validación del sistema se realizó con estándares de los dos componentes huella seleccionados para cada AE. Para la validación del método se emplearon NC-AE adicionadas con la mezcla de estándares.

Los parámetros de validación del método analítico para los AE de *L. dentata* y *R. officinalis* se muestran en las Tablas 16 y 17, respectivamente.

Los métodos analíticos demostraron ser lineales con un coeficiente de determinación lineal de 0.999, mayor a 0.99 establecido por la CCAYAC (117). Para el AE de *L. dentata* el método demostró ser lineal en el intervalo de concentración total de la mezcla de estándares de β -pineno y 1,8-cineol (10 a 160 $\mu\text{g/mL}$). De igual manera, para el AE de *R. officinalis* se estableció que el intervalo de concentración total de la mezcla de estándares de 1,8-cineol y alcanfor (10 a 160 $\mu\text{g/mL}$) fue lineal, con un coeficiente de determinación lineal superior a 0.99.

Con respecto a los límites de detección y cuantificación de los componentes del AE de *L. dentata*, para el β -pineno se determinaron valores de 0.147 y 0.446 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, mientras que, para el segundo componente, 1,8-cineol, se establecieron valores de 1.279 y 3.876 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para el AE de *R. officinalis* los valores de límite de detección y cuantificación para el componente 1,8-cineol fueron de 0.478 y 1.449 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, y para el segundo componente, el alcanfor, los resultados fueron de 0.624 y 1.890 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Velázquez-Dávila con un método por inyección directa para la cuantificación del AE de *Magnolia grandiflora* (107). Los componentes huella seleccionados, el β -pineno, el alcanfor y el acetato de bornilo, obtuvieron límites de detección y cuantificación cercanos a los obtenidos en el presente trabajo. Para el β -pineno los valores de límites de detección y cuantificación fueron de 1.71 y 5.70 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Mientras que para el acetato de bornilo fueron de 1.74 y 5.78 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para el tercer componente huella, el alcanfor, los resultados fueron de 0.48 y 1.38 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (107). Los resultados del presente trabajo permiten garantizar que los métodos de CG-FID por inyección directa desarrollados para ambos AE son capaces de detectar concentraciones por debajo del nivel inferior de intervalo de trabajo.

Por otra parte, el sistema demostró ser preciso con porcentajes de desviación estándar relativa menor al 10%, y los resultados se expresaron como repetibilidad y reproducibilidad (148). En las Tablas 16 y 17 se muestran los resultados para el AE de *L. dentata* y *R. officinalis*, respectivamente, que indican que el sistema fue preciso tanto en el mismo día como en días no consecutivos de validación para ambos AE.

Para la validación del método, se determinó su exactitud y precisión mediante la técnica de adición estándar. Para esto, las muestras de NC-AE fueron adicionadas con la mezcla total de estándares de los componentes huella seleccionados para cada AE. La exactitud del método se determinó empleando cinco niveles de concentración (10, 20,

40, 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$), mientras que la precisión del método se determinó a tres niveles de concentración (10, 40 y 160 $\mu\text{g/mL}$).

Los métodos analíticos demostraron ser exactos con porcentajes de recuperación cercanos al 100%. Para el AE de *L. dentata* se obtuvieron porcentajes de recuperación de 97.17 y 100.98%, para el β -pineno y 1,8-cineol, respectivamente. Para el AE. de *R. officinalis* los valores fueron de 100.53% para el 1,8-cineol y 99.98% para el alcanfor. De acuerdo con Miaoa y cols., los porcentajes de recuperación cercanos al 100% permiten concluir que el método analítico es exacto. Miaoa y cols, validaron un método analítico por CG-FID para el análisis cuantitativo de AE de *Alpinia oxyphylla* (149).

Los métodos analíticos demostraron ser precisos con %DER menores al 10%, y los resultados se expresaron como repetibilidad y reproducibilidad del método. Para el AE de *L. dentata* se obtuvieron %DER para repetibilidad y reproducibilidad del β -pineno de 4.86% y 8.91%, respectivamente; mientras que para el 1,8-cineol se obtuvieron %DER para repetibilidad y reproducibilidad de 4.98% y 6.42%, respectivamente. Por otro lado, para el AE de *R. officinalis* los resultados obtenidos de %DER para repetibilidad y reproducibilidad para el 1,8-cineol fueron de 4.53% y 4.93%, respectivamente; para el alcanfor se obtuvieron %DER para repetibilidad y reproducibilidad de 4.00% y 4.82%, respectivamente. Los %DER obtenidos para cada AE se encontraron dentro de los parámetros de aceptación establecidos por Sousa y cols., en la validación de método analítico de aceite de copaiba (148).

4.4 Actividad antioxidante de los AE libres y nanoencapsulados

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir o retardar la degradación oxidativa (*i.e. peroxidación lipídica*) de otra sustancia, de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres (72).

La peroxidación lipídica consiste en una serie de procesos de reacción en cadena que hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos mediada por radicales libres y asociada con daños provocados en la membrana celular (*i.e. modificación de lípidos*). Los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares, los cuales se producen continuamente durante los eventos fisiológicos normales y pueden iniciar fácilmente la peroxidación de los lípidos de la membrana, lo que lleva a la acumulación de peróxidos lipídicos (81).

Debido a su función como interface entre el cuerpo y el medio ambiente, la piel está crónicamente expuesta a agentes prooxidativos tanto endógenos como ambientales, lo que lleva a la generación nociva de especies reactivas de oxígeno (EROS). Existe evidencia de que la oxidación lipídica está involucrada en el daño de los componentes celulares, como los lípidos de la membrana celular, y asociada al envejecimiento prematuro (150). La determinación de la inhibición de la lipoperoxidación de AE permite la búsqueda de antioxidantes de origen natural con aplicación tópica.

Existen diferentes técnicas para determinar la actividad antioxidante mediante la lipoperoxidación, en las cuales se emplea el ácido linoleico como sustrato oxidable (83,119,151). El ácido linoleico pertenece al grupo de los ácidos omega-6 y es el ácido graso poliinsaturado más abundante de la piel. Su presencia asegura la salud de la piel, ya que contribuye a la formación de ceramidas esenciales en la estructura de la barrera epidérmica. Se ha observado que la ausencia de ácido linoleico en el EC provoca problemas de permeabilidad en la barrera de la piel (152). De esta manera, el empleo del ácido linoleico como sustrato de reacción permite realizar una evaluación representativa de la actividad antioxidante de los AE en piel.

La actividad antioxidante de los AE libres y las NC-AE se evaluó por el método de inhibición de la lipoperoxidación de ácido linoleico por iniciador de radicales ABAP. Los resultados se expresaron en términos de su capacidad para inhibir la lipoperoxidación del ácido linoleico (81,118).

El método de inhibición de la lipoperoxidación de ácido linoleico por iniciador de radicales ABAP permite evaluar la actividad antioxidante de los AE en un tiempo de 15 minutos. El método se basa en la determinación espectrofotométrica de la formación de dienos conjugados por la oxidación del ácido linoleico, en ausencia y en presencia de un potencial antioxidante (118). Se realizaron modificaciones al método establecido por Ruberto y cols., para asegurar que las absorbancias cumplieran con la ley de Lambert-Beer. En este sentido se modificaron los volúmenes de los reactivos y la concentración de los controles (50 µg/mL).

Los porcentajes de inhibición (%I) de la lipoperoxidación obtenidos para los controles y AE se muestran en la Tabla 18. Los controles positivos carvacrol y timol fueron seleccionados en base a su demostrada actividad antioxidante (153). Los controles 1,8-cineol y alcanfor se eligieron porque son dos de los componentes más abundantes en los AE evaluados. El %I de la lipoperoxidación del 1,8-cineol, alcanfor, carvacrol y timol fueron del 27.67%, 28.64%, 30.11% y 30.95%, respectivamente. Los resultados obtenidos de %I de la lipoperoxidación reflejan una baja actividad antioxidante y no coincide con lo reportado por otros autores. En relación a los AE, el %I de la lipoperoxidación fue aproximadamente del 25% sin diferencia significativa entre ellos. Sin embargo, se observó una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre los AE libres y nanoencapsulados. Cabe mencionar que este método de inhibición de la lipoperoxidación de ácido linoleico por iniciador de radicales ABAP, no es un método adecuado para AE que contengan un %A de monoterpenos oxigenados elevado. Se propuso determinar la actividad antioxidante de los controles y AE por otro mecanismo de reacción.

Por otro lado, la actividad antioxidante en emulsión de ácido linoleico se determinó por el método de tiocianato férrico (FTC). El método se basa en la determinación espectrofotométrica de un complejo colorido formado por el ión Fe^{3+} y el tiocianato de amonio a una $\lambda_{\text{máx}}$ de 500 nm. Durante la lipoperoxidación del ácido linoleico, se forman hidroperóxidos, los cuales a su vez oxidan el Fe^{2+} a Fe^{3+} . Este último ión es el que participa en la formación del complejo colorido con el tiocianato (122). En ausencia de un agente antioxidante, el ácido linoleico se oxida, lo que conduce a una mayor

concentración del hidropéroxidos y por lo tanto una mayor formación del complejo colorido Fe^{3+} - tiocianato de amonio. Una mayor concentración del complejo colorido se refleja en un aumento en la absorbancia y un bajo %I de la lipoperoxidación (Fórmula 11).

Como control positivo se seleccionó un antioxidante de origen natural, el α -tocoferol, el cual es un micronutriente liposoluble con un potente efecto antioxidante en piel (154). De igual manera se seleccionaron como controles positivos los estándares de 1,8-cineol y alcanfor, debido a que son los componentes mayoritarios presentes en cada AE.

Las absorbancias de los controles analizados a tres niveles de concentración (15, 30 y 45 $\mu\text{g/mL}$) en diferentes tiempos de incubación (0, 5, 25 y 30 horas) se representan en la Figura 28. Es importante mencionar que, a mayores valores de absorbancia, menor será el %I de la lipoperoxidación del ácido linoleico y por lo tanto menor será la actividad antioxidante. Como se muestra en la Figura 28, la absorbancia del control negativo del %I (sin antioxidante) aumentó rápidamente en función del tiempo, con un valor máximo absorbancia (1.12 ± 0.01) a las 30 horas de incubación. Lo que indica una alta concentración de hidropéroxidos generados por la completa oxidación del ácido linoleico en ausencia de un agente antioxidante (155).

En la Tabla 19, se muestran los %I de la lipoperoxidación del ácido linoleico evaluados con los controles positivos, AE libres y NC-AE a tres niveles de concentración (15, 30 y 45 $\mu\text{g/mL}$) después de 30 horas de incubación.

Como era esperado para el control positivo, α -tocoferol, los %I fueron directamente proporcionales a su concentración, presentando mayor porcentaje de inhibición a mayor concentración. Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Gulçin y col. (155), quienes obtuvieron un %I de 54.7% para el α -tocoferol a 15 $\mu\text{g/mL}$. Otro grupo de investigación, Topal y cols. (83), reporta un %I de 73.88% para el α -tocoferol a 45 $\mu\text{g/mL}$, %I ligeramente mayor al obtenido en este trabajo probablemente debido a las modificaciones realizadas al método. Durante el desarrollo del método se modificó la concentración final con el objetivo de obtener absorbancias que cumplieran con la ley de Lambert-Beer.

Por su parte, los estándares de 1,8-cineol y alcanfor presentaron un %I de la lipoperoxidación dependiente de la concentración. Se observó una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los valores de %I del 1,8-cineol y alcanfor, a 45 $\mu\text{g/mL}$, siendo más efectivo el alcanfor. Además, ambos controles presentaron una diferencia significativa mínima ($p < 0.01$) comparada con el control positivo de α -tocoferol a las tres concentraciones evaluadas.

Cuando se evaluaron los AE de *L. dentata* y *R. officinalis*, también se observó que el %I de la lipoperoxidación fue dependiente de la concentración. Se observó que a 45 $\mu\text{g/mL}$, el AE de *L. dentata* no presentó diferencia significativa (*ns*) en el %I de la lipoperoxidación (66.79%) comparado con el AE de *R. officinalis* (65.21%). Yang y cols., reportaron que el AE de *Lavandula* era más efectivo para inhibir la peroxidación del ácido linoleico en un periodo de prueba de 10 días en comparación con otros AE,

dentro de los cuales se encontraba el AE de *R. officinalis* (68). En este sentido, Hosni y col., (156) establecen que la potente actividad antioxidante de los AE es debida a la presencia de un alto porcentaje de monoterpenos. En el presente trabajo los monoterpenos representan el 80.71% y 62.34% de los AE de *L. dentata* y *R. officinalis*, respectivamente, lo cual concuerda con su actividad antioxidante (mayor al 65% de inhibición de la lipoperoxidación). Si bien el %A de monoterpenos es mayor al 60%, es importante mencionar que los AE son mezclas complejas, su actividad antioxidante no se puede asignar a un solo grupo de componentes ya que componentes minoritarios podrían hacer una contribución significativa a la actividad del AE (84,157).

Ambos AE libres no presentaron diferencia significativa (ns) en el %I comparados con el 1,8-cineol, componente mayoritario presente en ambos AE. Sin embargo, el AE de *R. officinalis* presentó diferencia significativa ($p < 0.001$) en el %I al ser compararlo con el alcanfor, componente mayoritario. Como se mencionó anteriormente, la interacción entre los componentes presentes en el AE modifica la actividad antioxidante en comparación con un componente aislado.

Por otro lado, el %I de lipoperoxidación de las NC-AE fue menor que los AE libres con una diferencia significativa de $p < 0.0001$. Cuando el AE se encuentra en las NC, el %I de lipoperoxidación disminuyó entre un 3 y 5%. Esta ligera disminución en su actividad antioxidante estaría relacionada con la liberación de los componentes encapsulados en las NC hacia el medio. En la bibliografía, se menciona que sistemas de nanocápsulas obtenidos por la técnica de nanoprecipitación se comportan como sistemas

bifásicos de liberación con una fase inicial rápida, seguida por una segunda fase más lenta (47,158). La fase inicial es llamada efecto *Burst* y es dado por la desorción de los activos de la superficie de las NC (159). La segunda fase descrita, corresponde a la difusión de los activos (*i.e.* β -pineno, 1,8-cineol y alcanfor) desde el núcleo de la NP al medio. Esta segunda fase está influenciada por el coeficiente de partición de los activos entre el núcleo oleoso de las partículas y el medio acuoso externo, además de otros factores como las interacciones entre los activos y las cadenas poliméricas (160).

Cabe mencionar que las NC-AE de ambos aceites mantuvieron un %I de la lipoperoxidación cercano al 60% a una concentración de 45 $\mu\text{g/mL}$, lo cual representa una buena actividad antioxidante comparados con el control positivo de α -tocoferol, antioxidante de origen natural. Esta actividad antioxidante de los AE se conserva después del proceso de nanoencapsulación.

En el Anexo IV se muestran las gráficas de %I de la lipoperoxidación en función de la concentración de los controles positivos, AE libres y NC-AE (Figuras 38 y 39).

4.5 Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con técnicas de bioingeniería

La evaluación biofísica de la piel permite realizar una determinación cuantitativa de los procesos biofísicos y bioquímicos relacionados con la función barrera de la piel (161). En este trabajo, se utilizaron técnicas de bioingeniería no invasivas para

determinar los parámetros biofísicos de la piel de cerdo, como la pérdida de agua transepidérmica (*TEWL*), el contenido de agua del EC, el pH y la cantidad de sebo (104).

La piel de cerdo es reconocida como el modelo animal más apropiado debido a las similitudes anatómicas, histológicas y fisiológicas con la piel humana (10). Dentro de las similitudes se encuentran el espesor epidérmico, la densidad de folículos pilosos y el contenido en EC de glicoesfingolípidos, ceramidas, colágeno y elastina (162). La densidad promedio de folículos pilosos en la piel de cerdo es de aproximadamente 20 mientras que en la piel humana es de 14-32 dependiendo la zona de la piel (97). En cuanto a la composición química, las principales clases de lípidos en el EC humano y porcino son ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres los cuales están presentes en una proporción aproximadamente equimolar (163).

Con relación al espesor del EC, Sekkat y cols., establecen que la validez de la piel porcina como un modelo *in vitro* reside en la comparación del espesor del EC. Para la piel de cerdo obtuvieron un espesor de 11.8 ± 4.0 , mientras que para la piel humana fue de $10.9 \pm 3.5 \mu\text{m}$ (96). En el presente trabajo se obtuvo un espesor de EC de $13.7 \pm 1.2 \mu\text{m}$. Para determinar el espesor del EC de la piel de oreja de cerdo, se evaluó la pérdida de agua transepidermica ($\text{g}/\text{m}^2\text{h}$) después de la remoción progresiva de EC. Un aumento significativo de la *TEWL* es indicativo de la remoción total del EC. En la Figura 29 se muestran los valores de la *TEWL* obtenidos en función de la profundidad de EC en μm . En relación a esto, es importante mencionar que el valor de la *TEWL* fue de $24.80 \pm 1.80 \text{ g}/\text{m}^2\text{h}$, significativamente menor que la establecida como valor basal establecida en las

evaluaciones biofísicas ($30.07 \pm 2.20 \text{ g/m}^2\text{h}$). Esto probablemente debido a que las evaluaciones se realizaron en diferentes estaciones del año. En el grupo de trabajo se ha establecido que los parámetros biofísicos de la piel de cerdo determinados en primavera son menores que los obtenidos en verano.

En relación a las variaciones *TEWL*, Schlupp y cols. (164), reportaron un valor de basal de $10 \pm 3 \text{ g/m}^2\text{h}$. Esta diferencia se atribuye a factores tales como la raza del cerdo, el acondicionamiento de la piel antes de su análisis y el tipo de cámara de la sonda empleada. Por otro lado, el valor de pH coincide con lo reportado por Jung y cols., con valores de pH de 6 a 7 para la piel de cerdo (35). El contenido de agua del EC en este trabajo fue de $36.82 \pm 1.48 \text{ UA}$, similar al reportado por Kanikkannan y cols., de $32.17 \pm 5.12 \text{ UA}$ (165). Particularmente para este parámetro, es importante mencionar que se realizó con la misma sonda utilizada en el presente estudio (Corneometer CM825), por lo cual los resultados pueden ser correlacionados de manera confiable.

En el Anexo V se muestran los valores de los cuatro parámetros biofísicos evaluados después de la aplicación de EM-AE y NC-AE (Tablas 24 y 25, respectivamente) durante 1, 2 y 4 horas de contacto con la piel de cerdo. En las Figuras 30, 31, 32 y 33 se muestran los resultados del análisis estadístico de los valores para la *TEWL*, pH, contenido de agua del EC y cantidad de sebo, respectivamente.

El parámetro de la *TEWL* representa la pérdida total de agua que se origina desde las glándulas sudoríparas, y que difunde a través de la capa córnea a la superficie de la piel

en forma de vapor de agua (104). Estudios anteriores han demostrado que la exposición de la piel de cerdo a algún daño químico o físico genera modificaciones en la estructura de la piel lo que provoca una elevación en la *TEWL* (166).

En la Figura 30, se puede observar que cuando la EM y las NP sin AE son aplicadas en la superficie de la piel durante 1, 2 o 4 horas, la *TEWL* no presentó diferencias significativas con respecto a la piel sin tratamiento (basal). Lo cual pone en evidencia que las formulaciones tópicas sin AE no provocan modificaciones estructurales en la piel.

Con relación a la aplicación de las EM y NC con AE en la piel de cerdo, se observa un aumento significativo de la *TEWL* ($p < 0.0001$) con respecto a la piel sin tratamiento (basal). Estudios previos, han establecido que los AE modifican reversiblemente la estructura de barrera del EC. Se menciona que los AE pueden interaccionar por afinidad con los lípidos intercorneocitarios ocasionando un reacomodo temporal de la estructura “ladrillo-cemento” del EC. De esta forma, se favorecería la difusión de agua hacia el EC, aumentando así la *TEWL* (167).

Los valores de *TEWL* se expresaron como $\Delta TEWL$ entre las EM y NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco (Anexo V, Tabla 26) (168). De forma interesante se observa que cuando la EM-AE de *L. dentata* se aplicó en la piel durante 1 hora, la $\Delta TEWL$ fue de 17.20 y con las NC-AE fue de 6.67. Después de 2 horas de contacto de la EM-AE de *L. dentata*, se observó que la $\Delta TEWL$ disminuyó a 8.25 y con las NC-AE se

mantiene a 6.12. A las 4 horas, se observó que, con la EM-AE, la $\Delta TEWL$ disminuyó a 6.22 y la $\Delta TEWL$ con las NC-AE disminuyó a 5.32 (Anexo V, Tabla 26). Este comportamiento se podría deber a que, en las EM, el AE está libre y favorece una rápida interacción con los lípidos del EC, que a su vez modifican la estructura del EC y por ende aumenta la $TEWL$. A diferencia que, en las NC, el AE no está totalmente disponible y por lo tanto la modificación estructural del EC es menor.

Con el tiempo de aplicación de 2 horas, el AE en las EM se va evaporando y el efecto del AE sobre la $TEWL$, es menor que en la primera hora, lo mismo ocurre después de las 4 horas de contacto con la piel. En el caso de las NC, el valor de la $\Delta TEWL$ es constante, lo cual es atribuido a que las NC funcionan como reservorios de los AE protegiéndolos de la evaporación.

Por otra parte, la piel tiene un carácter ácido (pH entre 4.5 y 6) debido al llamado "manto ácido" formado por el manto aéreo (capa gaseosa de CO_2 que proviene del metabolismo celular y vapor de agua) y la emulsión epicutánea formada por el agua del sudor y los lípidos de las glándulas sebáceas (104,169). El mantener el pH de la piel asegura que el manto ácido permanezca intacto, y sea capaz de inhibir el crecimiento de bacterias y mantener el entorno ácido óptimo para que pueda prosperar la flora natural de la piel (104). Debido a lo anterior, es necesario evaluar el pH de la piel después de la aplicación de las EM y NC con AE.

En la Figura 31 se muestran los valores de pH obtenidos con la piel sin tratamiento y con la aplicación de las EM y NC con y sin AE durante 1, 2 y 4 horas de contacto con la

piel. Se puede observar que el pH de la piel de cerdo sin tratamiento (basal) no presentó cambios significativos (*ns*) después de la aplicación de las EM y NC con y sin AE. Esto se debe a que las EM y NC con y sin AE presentaron valores de pH entre 4.2 y 6.6, valores cercanos al intervalo de pH de la superficie de la piel (entre 4.5 y 6) (169). De esta forma la aplicación de los AE tanto en EM como en NC no causaron modificaciones al pH de la piel de cerdo, es decir el manto ácido permanece funcional sin alterar la homeostasis de la piel.

La hidratación de la piel está determinada por factores exógenos tales como la temperatura y la humedad relativa, así como por factores inherentes del EC, como el factor natural de hidratación (FNH). Este factor está compuesto principalmente por proteínas y aminoácidos, productos de la degradación de los queratinocitos y constituyentes de la sudoración (170). Por sus características higroscópicas, la mayoría de estos componentes son capaces de captar el agua de la atmósfera. Para determinar el contenido de agua en el EC, se utilizó una sonda que detecta la capacitancia del EC (propiedad de la piel de mantener una carga eléctrica). Cualquier variación en la hidratación del EC (10-20 μm), genera un cambio en la constante dieléctrica de la piel y por lo tanto un cambio en la capacitancia que la sonda mide (105).

En la Figura 32, se puede observar que cuando las NC sin AE (NP-blanco) son aplicadas en la superficie de la piel durante 1, 2 ó 4 horas, el contenido de agua del EC no presento diferencias significativas con respecto a la piel sin tratamiento (basal).

Sin embargo, cuando la EM sin AE (EM-blanco) se aplica en la piel de cerdo, se observa un aumento en el contenido de agua del EC de 16.52 UA a las 2 horas, y de 15.44 UA a las 4 horas. Este comportamiento podría ser debido a que las EM se encuentran en un medio acuoso (o/w) y cuando la piel está expuesta a un ambiente húmedo, los corneocitos del EC son capaces de absorber cantidades de agua, lo que ocasiona un aumento en la constante dieléctrica de la piel (171).

En la Tabla 26 (Anexo V) se muestran las diferencias (Δ) en el contenido de agua del EC de las EM-AE y NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco, respectivamente, después del tiempo de contacto de 1, 2 y 4 horas con la piel de cerdo.

Otro de los parámetros biofísicos evaluados en la piel de cerdo, fue la cantidad de sebo presente en EC. Sebo es el término general que define los lípidos excretados por las glándulas sebáceas que se extienden sobre la superficie de la piel, estos lípidos epidérmicos son un componente clave del EC, ya que aseguran la cohesión entre las múltiples capas celulares del EC y participan en la función barrera de la piel (104). Además, actúa como un lubricante para la piel y mantiene las condiciones ácidas (pH 5) en la superficie de la piel.

En la Figura 33 se muestra la cantidad de sebo en el EC con la aplicación de EM/NP-blanco, EM-AE y NC-AE durante 1, 2 y 4 horas. Se puede observar que no existe diferencia significativa (ns) en la cantidad de sebo cuando tanto las EM como las NC sin AE son aplicadas en la superficie de la piel durante 1, 2 o 4 horas con respecto a la piel

sin tratamiento (basal). Cabe resaltar que cuando se aplican las NC-AE en la piel la cantidad de sebo en el EC aumento significativamente ($p < 0.0001$) en comparación con la piel sin tratamiento (basal). Las NC-AE presentan un comportamiento independiente del tiempo de contacto de las NC-AE con la piel de cerdo, este comportamiento se observa para ambos AE sin presentar diferencias significativas entre ellos.

Esto podría ser debido a diferentes factores, dentro de los cuales se encuentran las características fisicoquímicas de las NC-AE, éstas tienen un tamaño mayor a 200 nm que permite su interacción mecánica y su deposición en el EC, principalmente en los folículos pilosos y en los pliegues de la piel (42); además, un potencial zeta positivo de las NC-AE favorece su interacción con la superficie de la piel, y por ende de los componentes de los AE. Por otra parte, se calculó que el número de partículas por mL depositadas en la superficie de la piel fue de 5.90×10^{11} (172), lo cual es importante, ya que a mayor número de partículas mayor será la interacción de los AE con el EC. Una vez en contacto las NC-AE con el EC, los AE depositados en la superficie de la piel, pueden estar en contacto con la cinta y ser detectados por el método fotométrico empleado (173), lo cual se refleja como un aumento significativo en la cantidad de sebo.

4.6 Perfil dermatocinético de los AE libres y nanoencapsulados en piel de cerdo, con estudios *in vitro* de permeación y *tape stripping*

La dermatocinética se define como el cambio en la cantidad de los componentes de los AE en función del tiempo de contacto con la piel de cerdo en relación con la profundidad de EC (μm). En las Figuras 34 y 35 se muestra la cantidad de los componentes huella en el EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo de contacto con la piel de las EM-AE y NC-AE de *L. dentata* y *R. officinalis* durante 1, 2 y 4 h.

Cuando se aplicaron las EM-AE y las NC-AE en la piel, se observó una diferencia significativa en la cantidad de los cuatro componentes huella en el EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Las NC-AE favorecen la deposición de los componentes huella sobre el EC hasta 5 veces en comparación con las EM-AE (Tabla 28). El aumento en la deposición de los componentes huella en el EC, está relacionado con las características fisicoquímicas de las NC. Por un lado, su tamaño nanométrico permite la deposición de las NC en las rugosidades de la piel por efecto mecánico. Por el otro lado, debido a su estructura polimérica, las NC protegen a los componentes huella de la evaporación en comparación con las EM. Tal es el caso, que no fue posible cuantificar los AE en EM por los métodos desarrollados ya que se encontraban fuera del límite de cuantificación.

Con respecto a las NC-AE, se puede observar que la cantidad de los cuatro componentes huella en el EC fue independiente del tiempo de contacto de las NC con la piel. Si bien, se observa una variación aproximada de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en función del tiempo,

después del análisis estadístico se estableció que no hay diferencia significativa. Estos resultados no coinciden con lo reportado por Álvarez-Román y cols., que observó que la deposición de las NP con fluoresceína en los folículos pilosos fue directamente proporcional al tiempo de contacto con la piel (174). En relación a esto, se debe considerar que, en este trabajo las NC contienen componentes lipofílicos y volátiles, lo cual podría modificar en una primera instancia la deposición de las NC en el EC, posteriormente la liberación de los componentes hacia los lípidos intercelulares y finalmente su evaporación a partir del EC.

En relación a que la deposición de los componentes huella en el EC fuera independiente del tiempo de contacto de las NC-AE con la piel, se puede correlacionar con lo observado en la evaluación de tres parámetros biofísicos. Tanto, la *TEWL*, el pH y la cantidad de sebo en el EC, no presentan diferencias significativas en relación al tiempo de contacto de las NC-AE con la piel.

En la Figura 34, se puede observar que cuando las NC-AE de *L. dentata*, son aplicadas en la piel, el componente 1,8-cineol se deposita entre 2-3 veces más que el β -pineno por cm^2 de EC (Tabla 28). Este comportamiento se puede correlacionar con el %E calculado en las NC, el 1,8-cineol tuvo un %E de 2.89% y el β -pineno de 1.56% (Tabla 12).

Sin embargo, cuando las NC-AE de *R. officinalis*, son aplicadas en la piel, el componente alcanfor se deposita 2 veces más que el 1,8-cineol por cm^2 de EC a pesar de tener el mismo %E en las NC (cerca al 3%).

En diferentes bibliografías se ha reportado que la deposición de activos en el EC está relacionada con las propiedades fisicoquímicas de los activos. Dentro de estas propiedades se encuentra el coeficiente de partición (LogP(o/w)), el peso molecular, y la presión de vapor en caso de AE (169). Al considerar cada una de las propiedades fisicoquímicas de los dos componentes huella del AE de *R. officinalis* en las NC-AE, se observa que el alcanfor y el 1,8-cineol, presentan valores de LogP(o/w) similares (2.38 y 2.74, respectivamente), además también tienen un peso molecular semejante (152.23 g/mol y 154.25 g/mol, respectivamente). Sin embargo, el alcanfor presenta una presión de vapor 10 veces menor que el 1,8-cineol (0.27 hPa y 2.0 hPa, respectivamente). Lo anterior indica que el alcanfor es menos volátil que el 1,8-cineol y por lo tanto tiene una mayor permanencia en el EC reflejada en una mayor cantidad de 1,8-cineol por cm^2 de EC.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Primero, se obtuvieron los aceites esenciales (AE) de *Lavandula dentata* y *Rosmarinus officinalis*, y se caracterizaron en función de sus propiedades físicas (*i.e.* densidad, índice de refracción y actividad óptica), estos parámetros permitieron definir que los AE cumplían con el control de calidad empleadas comúnmente. La caracterización química se realizó mediante CG-MS y CG-FID, se identificaron 16 y 22 componentes para los AE de *L. dentata* y *R. officinalis*, respectivamente. La presencia en un alto porcentajes de abundancia de monoterpenos oxigenados permitió inferir sobre el potencial biológico de los AE para una aplicación dérmica.

Posteriormente, se obtuvieron nanocápsulas poliméricas con cada AE (NC-AE) y se caracterizaron fisicoquímicamente. Las NC-AE presentaron un tamaño adecuado para su aplicación en piel (> 200 nm), que permitió asegurar la deposición de las NC en el EC de la piel. De igual manera, el potencial zeta obtenido para las nanoformulaciones favoreció la interacción NC-AE con la superficie de la piel y, en consecuencia, facilitó la

deposición de los AE en el EC de la piel. Además, las dos formulaciones de NC-AE fueron estables en función del tamaño de partícula durante 8 semanas.

Por otra parte, se desarrollaron y validaron dos métodos analíticos por CG-FID (inyección directa) para la cuantificación de los componentes huella de cada AE. Se disminuyó el tiempo de análisis cromatográfico para ambos AE. Los métodos demostraron ser lineales, exactos y precisos, y permitieron el monitoreo de los AE en los ensayos *in vitro* en piel de cerdo, mediante la cuantificación de sus respectivos componentes huella.

Con respecto a los actividad antioxidante, ésta se evaluó como la capacidad de los AE de inhibir la lipoperoxidación *in vitro* del ácido linoleico. Los AE libres y nanoencapsulados mostraron buena actividad antioxidante, en comparación con el α -tocoferol un antioxidante natural, con porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación mayores al 60% a una concentración de 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De igual manera, se demostró que la actividad antioxidante de los AE se mantuvo con un %I cercano al 60%, después de los procesos de encapsulación y purificación de las nanocápsulas, lo que evidenció que el proceso de encapsulación no afectó la actividad antioxidante de los dos AE.

Con relación a los ensayos biológicos, se evaluaron los parámetros biofísicos de la piel de cerdo antes y después de la aplicación de las formulaciones durante 1, 2 y 4 horas de contacto con la piel, se observó que las NC-AE no modificaron el pH normal de la piel y brindaron un efecto hidratante al aumentar significativamente el contenido de

agua del EC. Con esto se evidenció que las formulaciones de NC-AE eran seguras para su aplicación tópica en los tiempos de contacto evaluados en el presente trabajo.

Finalmente, se realizó una evaluación dermatocinética *ex vivo* de los AE en piel de cerdo mediante celdas de Franz modificadas y la técnica de *tape stripping*. Se estableció que la nanoencapsulación favoreció la deposición de los componentes huella de los AE sobre el EC hasta 5 veces mayor en comparación con los AE libres. Esto debido a las características fisicoquímicas de las NC, como el tamaño y el potencial zeta, los cuales son un factor clave en su interacción con la piel favoreciendo la deposición de las NC con carga positiva en la superficie de la piel asegurando el tiempo de residencia de los AE en la piel, para que puedan llevar a cabo su efecto antioxidante.

En conclusión, las nanocápsulas poliméricas con aceite esencial (NC-AE) fueron capaces de favorecer la deposición de los AE en el estrato córneo, sin causar alteraciones permanentes en la estructura y función barrera de la piel. De esta forma, las nanocápsulas con aceite esencial (NC-AE) desarrolladas en el presente trabajo son una alternativa con un gran potencial para ser empleadas como agentes antioxidantes de origen natural en el tratamiento preventivo del cuidado de la piel.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de formulación empleando un tensoactivo para aumentar el tiempo de estabilidad de las NC-AE, y evaluar su efecto en los parámetros biofísicos de la piel.
- Realizar la evaluación de la actividad antioxidante en un tiempo de incubación más prolongado (*i.e 96 h*).
- Realizar estudios *in vitro* de liberación de los AE nanoencapsulados.
- Evaluar por técnicas de microscopia los posibles cambios morfológicos de la piel de cerdo por la interacción con las NC.

CAPÍTULO 7

ANEXO I



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA
HERBARIO

Dra. C. ROCÍO ÁLVAREZ ROMÁN

Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, UANL

Presente.

Por este medio me permito hacer constar que la muestra botánica enviada bajo el nombre de "Lavanda", y que me indica utiliza en el proyecto de investigación: Formulaciones de aceites esenciales para el control de insectos vectores de importancia médica, para conocer su identidad taxonómica correcta, se revisó minuciosamente y fue clasificada como *Lavandula dentata* L., una especie de la familia LAMIACEAE.

La presente certifica únicamente el nombre científico de la planta y la familia a la cual pertenece, por lo cual el uso que se le dé a la planta es independiente de esta constancia.

Sin otro particular se le expide la presente para los fines y usos legales que le convengan.

Atentamente

Alere Flammam Veritatis

Cd. Universitaria a 10 de Octubre de 2017

Dr. Marco Antonio Guzmán Lucio
Jefe del Herbario

c.c.p. archivo

Pedro de Alba y Manuel Barragán s/n
Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza,
Nuevo León, México. C.P. 66455
Tels y Fax: 8329-4110 ext. 8456.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA
HERBARIO

Dra. C. ROCÍO ÁLVAREZ ROMÁN

Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, UANL

Presente.

Por este medio me permito hacer constar que la muestra botánica enviada bajo el nombre de "Romero", y que me indica utiliza en el proyecto de investigación: Formulaciones de aceites esenciales para el control de insectos vectores de importancia médica, para conocer su identidad taxonómica correcta, se revisó minuciosamente y fue clasificada como *Rosmarinus officinalis* L., una especie de la familia LAMIACEAE.

La presente certifica únicamente el nombre científico de la planta y la familia a la cual pertenece, por lo cual el uso que se le dé a la planta es independiente de esta constancia.

Sin otro particular se le expide la presente para los fines y usos legales que le convengan.

Atentamente

Alere Flammam Veritatis

Cd. Universitaria a 10 de Octubre de 2017

Dr. Marco Antonio Guzmán Lucio

Jefe del Herbario

c.c.p. archivo

Pedro de Alba y Manuel Barragán s/n
Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza,
Nuevo León, México. C.P. 66455
Tels y Fax: 8329-4110 ext. 6456.

ANEXO II

Tabla 21. Valores de referencia de la caracterización física de los controles (129).

	Índice de refracción^{1*}	Densidad relativa (g/mL)^{2*}	Rotación óptica (°)^{3**}
Anetol	1.557 – 1.561	0.983 – 0.988	-0.15° - 0.15°
Eugenol	1.540 – 1.542	1.064 - 1.070	N.D
(R)-Limoneno	1.471 – 1.474	0.840 - 0.847	+96° - +106°

Tabla 22. Valores de referencia de la caracterización física de los aceites esenciales (129).

	Índice de refracción	Densidad relativa (g/mL)	Rotación óptica (°)
<i>L. angustifolia</i>	1.455 – 1.466	0.878 – 0.892	-12.5 - -6.0
<i>R. officinalis</i>	1.464 – 1.473	0.895 – 0.920	-5.0 - +8.0

ANEXO III

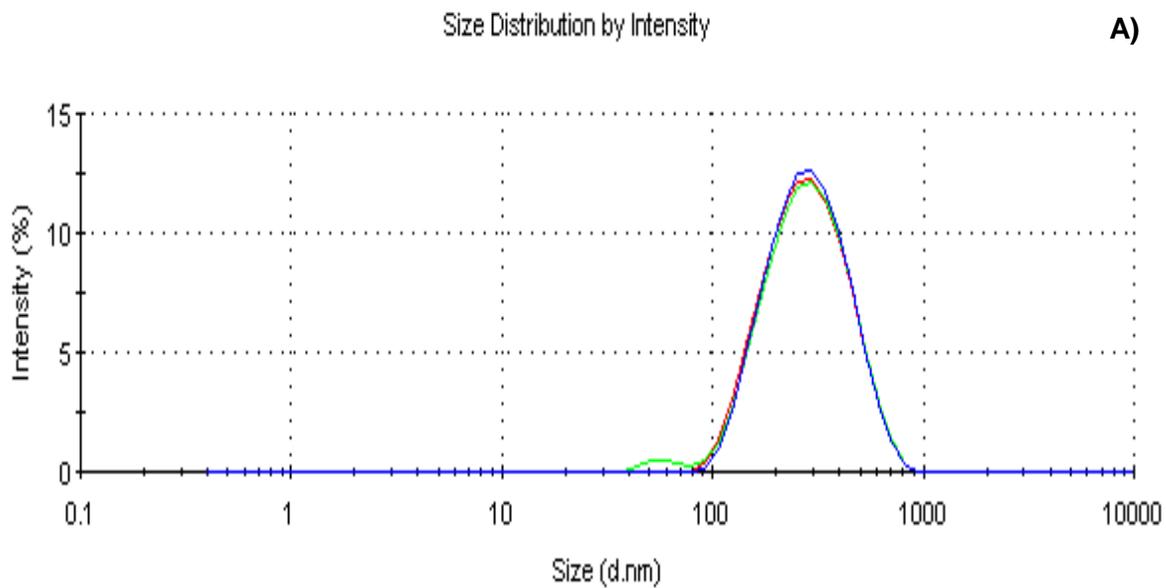


Figura 36. Gráfica de distribución de tamaño de las NC-AE-*L. dentata*.

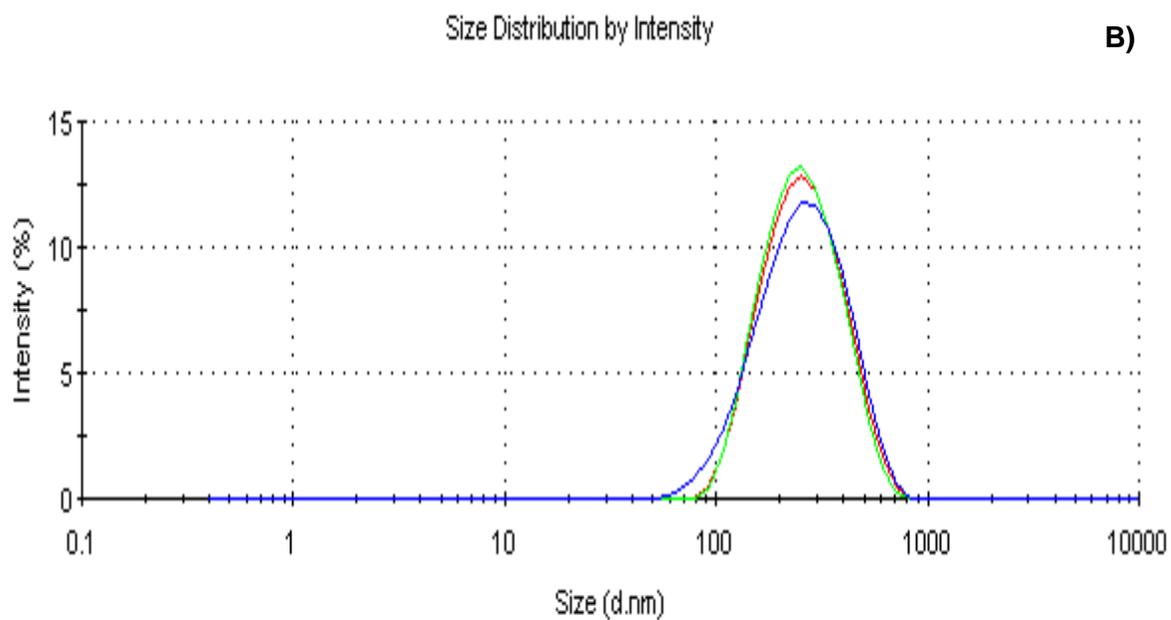


Figura 37. Gráfica de distribución de tamaño de las NC-AE de *R. officinalis*.

ANEXO IV

Tabla 23. Absorbancias de los controles, AE libres y NC-AE en función del tiempo de incubación.

Absorbancia por tiempo de incubación (h)				
<i>Muestras</i>	0	5	25	30
Control	0.074	0.260	0.587	1.120
α -tocoferol 15 $\mu\text{g/mL}$	0.064	0.154	0.324	0.439
α -tocoferol 30 $\mu\text{g/mL}$	0.086	0.175	0.300	0.402
α -tocoferol 45 $\mu\text{g/mL}$	0.098	0.191	0.283	0.358
1,8-cineol 15 $\mu\text{g/mL}$	0.061	0.141	0.291	0.441
1,8-cineol 30 $\mu\text{g/mL}$	0.071	0.156	0.285	0.403
1,8-cineol 45 $\mu\text{g/mL}$	0.075	0.159	0.257	0.388
Alcanfor 15 $\mu\text{g/mL}$	0.061	0.199	0.310	0.428
Alcanfor 30 $\mu\text{g/mL}$	0.063	0.180	0.282	0.400
Alcanfor 45 $\mu\text{g/mL}$	0.068	0.177	0.276	0.327
<i>AE-L. dentata</i> 15 $\mu\text{g/mL}$	0.056	0.170	0.297	0.446
<i>AE-L. dentata</i> 30 $\mu\text{g/mL}$	0.061	0.180	0.263	0.411
<i>AE-L. dentata</i> 45 $\mu\text{g/mL}$	0.064	0.191	0.252	0.372
<i>AE-R. officinalis</i> 15 $\mu\text{g/mL}$	0.064	0.209	0.301	0.450
<i>AE-R. officinalis</i> 30 $\mu\text{g/mL}$	0.066	0.231	0.288	0.412
<i>AE-R. officinalis</i> 45 $\mu\text{g/mL}$	0.070	0.244	0.273	0.390
NC-AE- <i>L. dentata</i> 15 $\mu\text{g/mL}$	0.071	0.203	0.296	0.475
NC-AE- <i>L. dentata</i> 30 $\mu\text{g/mL}$	0.075	0.207	0.263	0.442
NC-AE- <i>L. dentata</i> 45 $\mu\text{g/mL}$	0.079	0.199	0.271	0.426
NC-AE- <i>R. officinalis</i> 15 $\mu\text{g/mL}$	0.074	0.225	0.316	0.490
NC-AE- <i>R. officinalis</i> 30 $\mu\text{g/mL}$	0.076	0.235	0.302	0.448
NC-AE- <i>R. officinalis</i> 45 $\mu\text{g/mL}$	0.086	0.251	0.290	0.429

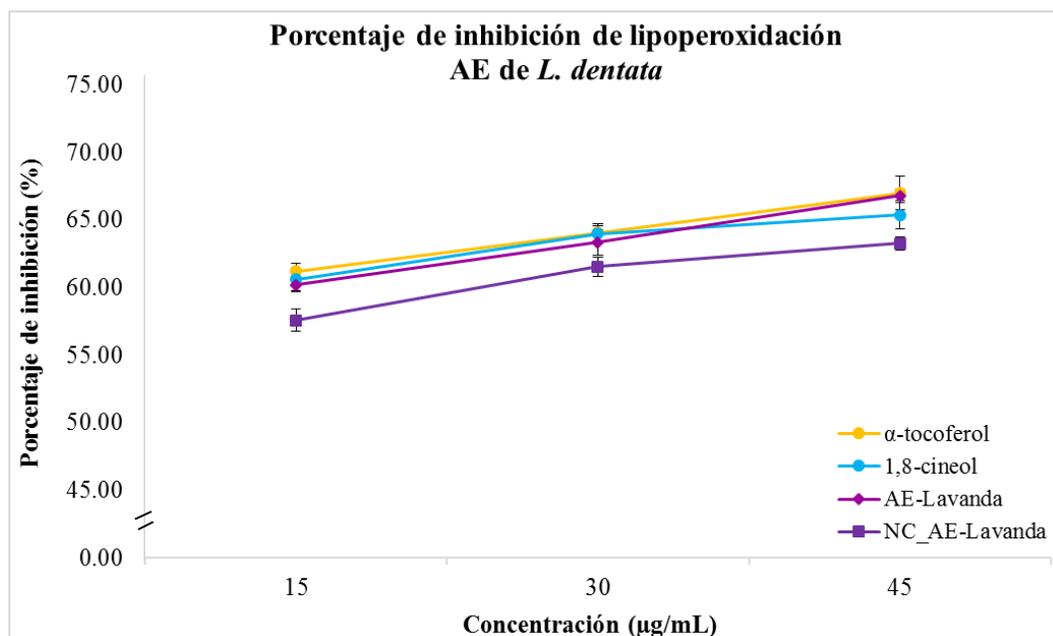


Figura 38. Porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación en función de la concentración para el AE de *L. dentata* y controles

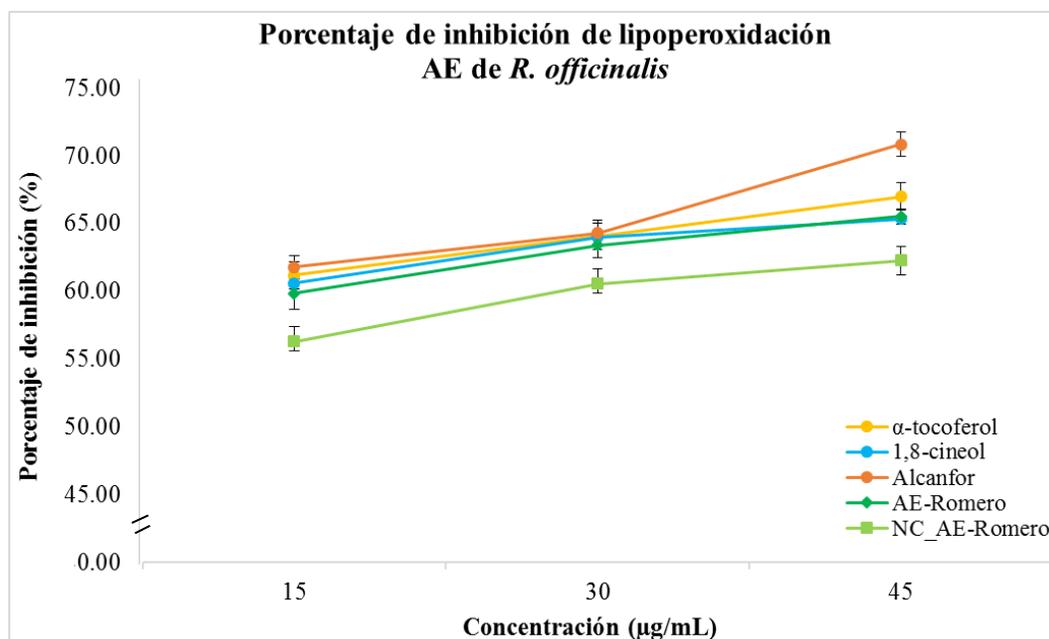


Figura 39. Porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación en función de la concentración para el AE de *R. officinalis* y controles.

ANEXO V

Tabla 24. Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con la aplicación de las EM-blanco y EM-AE (Media \pm DE, n=6).

EM-AE en piel de cerdo					
		Pérdida de agua transepidérmica (g/m²h)	pH	Contenido de agua del EC	Cantidad de sebo (µg/cm²)
	Piel de oreja de cerdo	30.07 \pm 2.20	5.70 \pm 0.11	36.82 \pm 2.73	0.91 \pm 0.83
1 HORA	EM-Blanco	31.25 \pm 1.86	5.64 \pm 0.07	45.88 \pm 2.45	1.00 \pm 0.82
	EM_AE-L. <i>dentata</i>	48.45 \pm 2.79	5.66 \pm 0.18	59.38 \pm 6.22	1.20 \pm 0.84
	EM_AE-R. <i>officinalis</i>	38.12 \pm 3.19	5.64 \pm 0.19	55.66 \pm 3.74	1.00 \pm 0.00
2 HORAS	EM-Blanco	32.35 \pm 1.40	5.84 \pm 0.23	53.34 \pm 3.23	1.25 \pm 0.50
	EM_AE-L. <i>dentata</i>	40.60 \pm 3.13	5.66 \pm 0.17	62.37 \pm 7.28	1.00 \pm 0.89
	EM_AE-R. <i>officinalis</i>	47.73 \pm 4.33	5.80 \pm 0.24	71.69 \pm 5.69	1.00 \pm 0.71
4 HORAS	EM-Blanco	35.48 \pm 1.87	5.92 \pm 0.22	52.26 \pm 11.50	1.00 \pm 0.00
	EM_AE-L. <i>dentata</i>	40.80 \pm 2.92	5.61 \pm 0.21	63.01 \pm 4.11	1.60 \pm 0.89
	EM_AE-R. <i>officinalis</i>	43.10 \pm 1.80	5.95 \pm 0.32	76.38 \pm 6.80	1.40 \pm 0.55

Tabla 25. Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con la aplicación de las NP-blanco y NC-AE (Media \pm DE, n=6).

NC-AE en piel de cerdo					
		Pérdida de agua transepidérmica (g/m ² h)	pH	Contenido de agua del EC	Cantidad de sebo (μg/cm ²)
	Piel de oreja de cerdo	30.07 \pm 2.20	5.70 \pm 0.11	36.82 \pm 2.73	0.91 \pm 0.83
1 HORA	NP-Blanco	32.47 \pm 0.94	5.68 \pm 0.09	44.45 \pm 1.03	1.17 \pm 0.75
	NC-AE-<i>L. dentata</i>	39.13 \pm 1.17	5.86 \pm 0.13	56.96 \pm 2.64	9.83 \pm 2.14
	NC-AE-<i>R. officinalis</i>	37.82 \pm 1.80	5.72 \pm 0.14	51.32 \pm 2.52	6.17 \pm 1.47
2 HORAS	NP-Blanco	34.65 \pm 1.26	5.69 \pm 0.06	45.27 \pm 2.32	1.33 \pm 0.52
	NC-AE-<i>L. dentata</i>	40.77 \pm 2.54	5.89 \pm 0.08	57.99 \pm 2.62	10.50 \pm 1.87
	NC-AE-<i>R. officinalis</i>	42.13 \pm 2.54	5.85 \pm 0.12	55.63 \pm 4.86	8.50 \pm 2.26
4 HORAS	NP-Blanco	35.60 \pm 1.86	5.78 \pm 0.12	45.34 \pm 2.73	2.33 \pm 1.03
	NC-AE-<i>L. dentata</i>	40.92 \pm 2.87	5.89 \pm 0.08	59.01 \pm 3.00	11.17 \pm 1.83
	NC-AE-<i>R. officinalis</i>	42.78 \pm 1.93	5.86 \pm 0.11	56.29 \pm 2.33	8.83 \pm 1.47

Tabla 26. Diferencia de la *TEWL* (Δ) de las EM-AE y NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco, respectivamente (Media \pm DE, n=6).

Diferencia de la <i>TEWL</i> (Δ) de las EM-AE y NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco			
		Δ <i>TEWL</i> EM-AE	Δ <i>TEWL</i> NC-AE
1 Hora	<i>AE-L. dentata</i>	17.20 \pm 2.79	13.50 \pm 6.22
	<i>AE-R. officinalis</i>	6.87 \pm 3.19	9.77 \pm 3.74
2 Horas	<i>AE-L. dentata</i>	8.25 \pm 3.13	9.03 \pm 7.28
	<i>AE-R. officinalis</i>	15.38 \pm 4.33	18.36 \pm 5.69
4 Horas	<i>AE-L. dentata</i>	6.22 \pm 2.92	14.08 \pm 4.11
	<i>AE-R. officinalis</i>	8.52 \pm 1.80	27.46 \pm 6.80

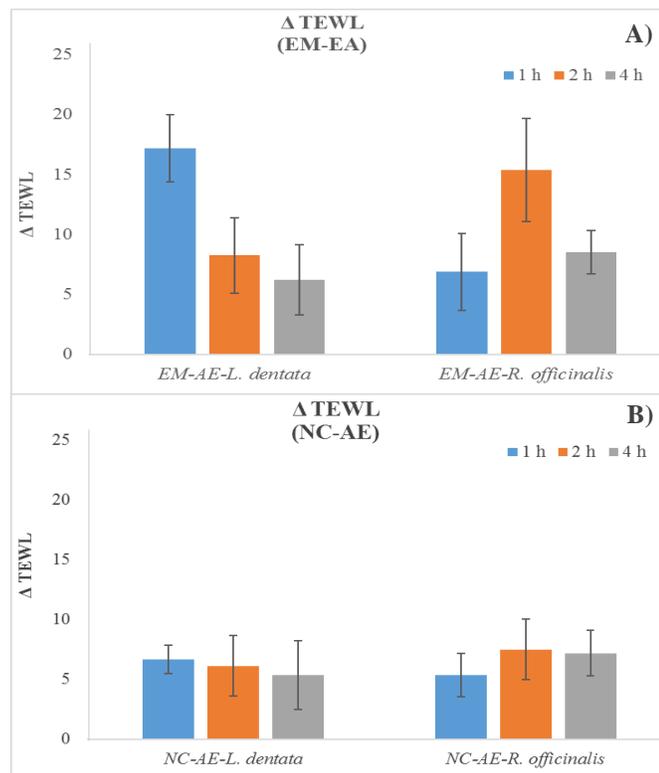


Figura 40. Diferencia de la *TEWL* (Δ) de las A) EM-AE y B) NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco, respectivamente (Media \pm DE, n=6).

Tabla 27. Diferencia en el contenido de agua del EC (Δ) de las EM-AE y NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco, respectivamente (Media \pm DE, n=6).

Diferencia del contenido de agua del EC (Δ) de las EM-AE y NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco			
		Contenido de agua del EC EM-AE	Contenido de agua del EC NC-AE
1 Hora	<i>AE-L. dentata</i>	13.50 \pm 6.22	12.52 \pm 2.64
	<i>AE-R. officinalis</i>	9.77 \pm 3.74	6.87 \pm 2.52
2 Horas	<i>AE-L. dentata</i>	9.03 \pm 7.28	12.72 \pm 2.62
	<i>AE-R. officinalis</i>	18.36 \pm 5.69	10.36 \pm 4.86
4 Horas	<i>AE-L. dentata</i>	10.08 \pm 4.11	13.67 \pm 3.00
	<i>AE-R. officinalis</i>	24.12 \pm 6.80	10.95 \pm 2.33

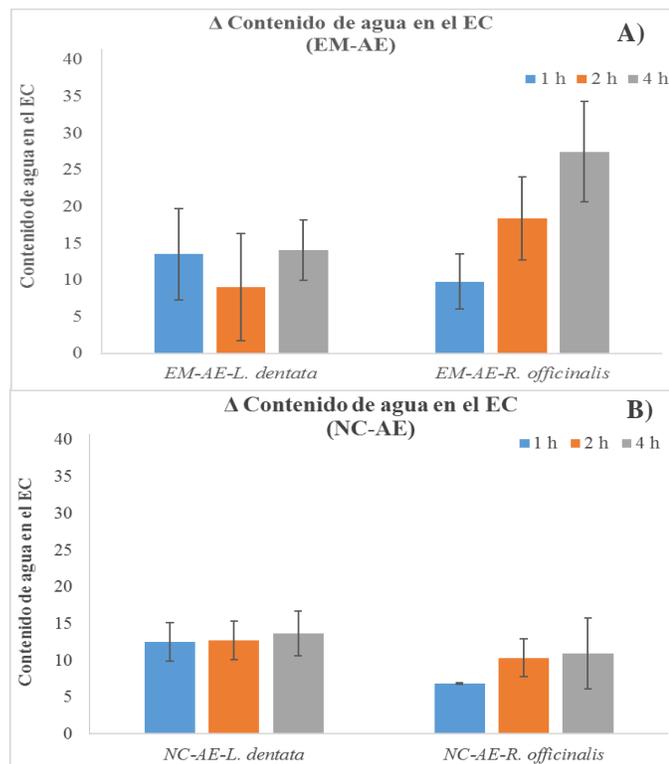


Figura 41. Diferencia del contenido de agua del EC (Δ) de las EM-AE y NC-AE comparadas con las EM y NP-blanco, respectivamente (Media \pm DE, n=6).

ANEXO VI

Tabla 28. Cantidad de β -pineno, 1,8-cineol y alcanfor en función del tiempo de contacto con la piel 1, 2 y 4 h (Media \pm DE; n=5).

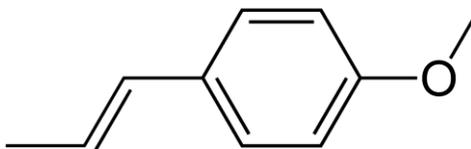
		<i>Cantidad de componente huella en EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>		
		<i>Componente huella</i>	<i>1 h</i>	<i>2 h</i>
AE de L. <i>dentata</i>	β -pineno (NC)	10.69 \pm 2.10	8.27 \pm 3.28	6.93 \pm 2.24
	β -pineno (EM)	1.28 \pm 0.40	1.14 \pm 0.29	0.80 \pm 0.01
	1,8-cineol (NC)	36.91 \pm 6.25	32.28 \pm 5.46	25.71 \pm 1.31
	1,8-cineol (EM)	0.44 \pm 0.47	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
AE de R. <i>officinalis</i>	1,8-cineol (NC)	8.82 \pm 3.21	14.07 \pm 2.26	16.00 \pm 6.11
	1,8-cineol (EM)	2.77 \pm 2.06	7.38 \pm 1.31	8.39 \pm 2.85
	Alcanfor (NC)	20.60 \pm 8.32	27.23 \pm 6.05	27.99 \pm 8.60
	Alcanfor (EM)	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

ANEXO VII

ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS DE LOS MATERIALES UTILIZADOS

III.I Anetol

1. Estructura.



2. Nombre químico: trans-1-metoxi-4-(1-propenil)benceno

3. Nombre común: Anetol

4. Formula molecular: C₁₀H₁₂O

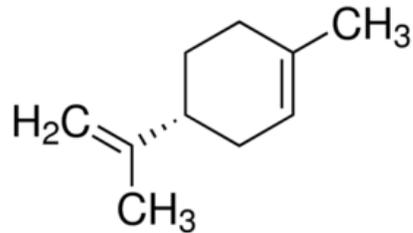
5. Peso molecular: 148.2 g/mol

6. Propiedades químicas y físicas

<i>Propiedades</i>	<i>Característica</i>
Estado	Líquido
Densidad relativa	0.988 g/cm ³
Punto de ebullición	234 °C
Coefficiente de partición	3.39
Solubilidad	Soluble en acetona y acetato de etilo. Ligeramente soluble en agua
Presión de vapor	1.33 hPa a 63 °C

III.II Limoneno

1. Estructura.



2. Nombre químico: (+)-p-Menta-1,8-dieno

3. Nombre común: Limoneno

4. Formula molecular: C₁₀H₁₆O

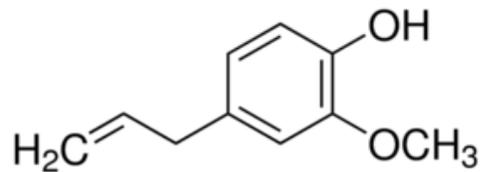
5. Peso molecular: 136.23 g/mol

6. Propiedades químicas y físicas

<i>Propiedades</i>	<i>Característica</i>
Estado	Líquido
Densidad relativa	0.842 g/cm ³
Punto de ebullición	178 °C
Coefficiente de partición	4.20
Solubilidad	Insoluble en agua
Presión de vapor	2.1 hPa a 63 °C

III.III Eugenol

1. Estructura.



2. Nombre químico: 2-Metoxi-4-(2-propenil)fenol

3. Nombre común: Eugenol

4. Formula molecular: $C_{10}H_{12}O_2$

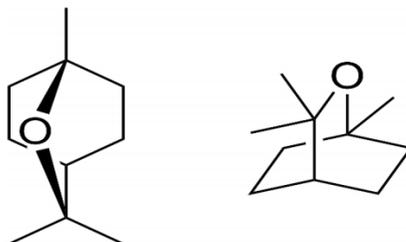
5. Peso molecular: 164.2 g/mol

6. Propiedades químicas y físicas

<i>Propiedades</i>	<i>Característica</i>
Estado	Líquido
Densidad relativa	1.06 g/cm ³
Punto de ebullición	254 °C
Coefficiente de partición	2.7
Solubilidad	Soluble en alcohol, éter y cloroformo. Insoluble en agua
Presión de vapor	<0.1 hPa a 25 °C

III.IV 1,8-cineol

1. Estructura.



2. Nombre químico: 1,3,3-trimetil- 2-oxabicyclo[2,2,2]octano

3. Nombre común: Eucaliptol

4. Formula molecular: $C_{10}H_{18}O$

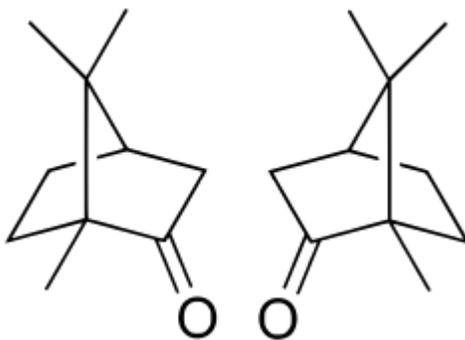
5. Peso molecular: 154.25 g/mol

6. Propiedades químicas y físicas

<i>Propiedades</i>	<i>Característica</i>
Estado	Líquido
Densidad relativa	0.921 g/cm ³
Punto de ebullición	176.5 ° C (449,73 K)
Coefficiente de partición	2.74
Solubilidad	Soluble en metanol, etanol y cloroformo. Insoluble en agua
Presión de vapor	No disponible.

III.V Alcanfor

1. Estructura.



2. Nombre químico: 1,7,7-Trimetilbiciclo[2.2.1]heptan-2-ona

3. Nombre común: 2-Camforona

4. Formula molecular: $C_{10}H_{16}O$

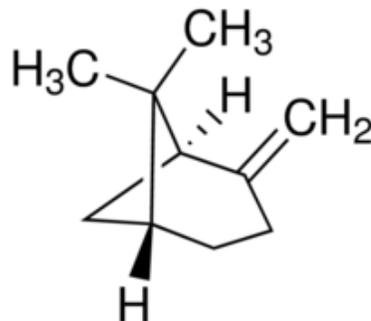
5. Peso molecular: 152.23 g/mol

6. Propiedades químicas y físicas

<i>Propiedades</i>	<i>Característica</i>
Estado	Sólido
Densidad relativa	0.99 g/cm ³
Punto de ebullición	207.4 °C
Coefficiente de partición	2.38
Solubilidad	Soluble en agua, y en etanol 1 g/ 10 mL
Presión de vapor	0.18 mmHg (20 °C) 0.27 hPa (20 °C)

III.VI β -pineno

1. Estructura.



2. Nombre químico: (1R,5R)-6,6-Dimetil-2-metilenebicyclo[3.1.1]heptano

3. Nombre común: Beta-pineno

4. Formula molecular: C₁₀H₁₆

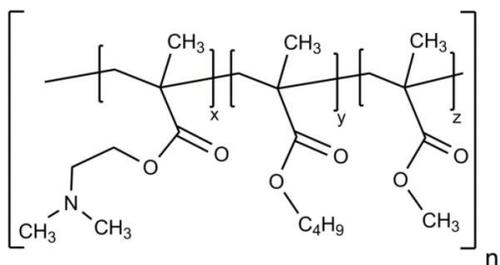
5. Peso molecular: 136.23 g/mol

6. Propiedades químicas y físicas

<i>Propiedades</i>	<i>Característica</i>
Estado	Líquido
Densidad relativa	0.87 g/cm ³
Punto de ebullición	164 - 169 °C
Coefficiente de partición	4.16
Solubilidad	Insoluble en agua.
Presión de vapor	2.93 mmHg (25 °C) 5 hPa (25 °C)

III.VII Eudragit® E PO

1. Estructura.



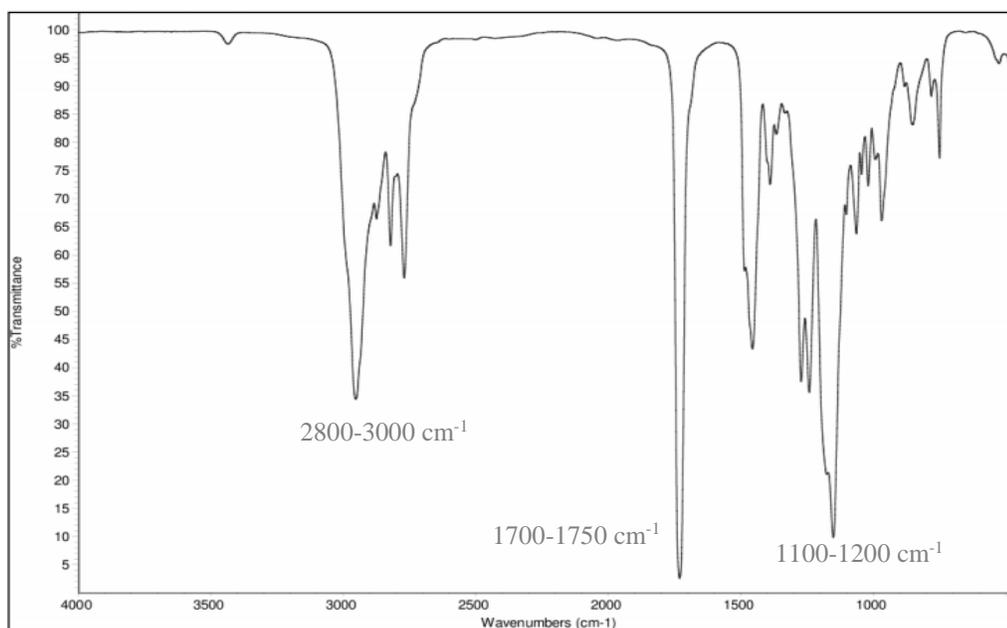
2. Nombre químico: copolímero del ácido metacrílico

3. Nombre común: Eudragit E PO

4. Propiedades químicas y físicas

<i>Propiedades</i>	<i>Característica</i>
Estado	Polvo
Densidad relativa	0.811 - 0.821 g/cm ³
Solubilidad	Disuelve en 7 g de metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetona, acetato de etilo, cloruro de metileno o ácido clorhídrico 1 N

5. Espectro IR



BIBLIOGRAFÍA

1. D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):12222–48.
2. Lane ME. Nanoparticles and the skin – applications and limitations. *J Microencapsul.* 2011;28(8):709–16. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02652048.2011.599440>
3. Simões M, Sousa J, Pais A. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Lett.* 2015;357(1):8–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.001>
4. Hun Lee S, Kyoo Jeong S, Ku Ahn S. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J.* 2006;47(3):293–306.
5. Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? *J Pharm Sci.* 2010;99(1):21–50.
6. Landmann L. The epidermal permeability barrier. *Anat Embryol (Berl).* 1988;178(1):1–13.
7. Elias P. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol.* 1983;80(1):44–9.
8. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol.* 2012;30(3):257–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>

9. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights*. 2007;2:117739280700200. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/117739280700200002>
10. Contri R V., Fiel LA, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Transport of substances and nanoparticles across the skin and *in vitro* models to evaluate skin permeation and/or penetration. In: *Nanocosmetics and Nanomedicines* [Internet]. 2011. p. 3–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161> <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir991> <http://www.scielo.cl/pdf/udecada/v15n26/art06.pdf> <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861150233&partnerID=tZOtx3y1>
11. World Health Organization. *Environmental Health Criteria 235 Dermal Absorption*. 2006.
12. Chen M, Gupta V, Anselmo AC, Muraski JA, Mitragotri S. Topical delivery of hyaluronic acid into skin using SPACE-peptide carriers. *J Control Release*. 2014;173(1):67–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.007>
13. Dąbrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Ski Res Technol*. 2018;24(2):165–74.
14. Kalia Y, Guy R. Modeling transdermal drug release. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;48(2–3):159–72.

15. Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: A skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003;55(3):271–7.
16. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers . Vol. 64, *Adv Drug Deliv Rev.* Elsevier B.V.; 2012. 128–137 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.032>
17. Morganti P, Ruocco E, Wolf R, Ruocco V. Percutaneous absorption and delivery systems. *Clin Dermatol* . 2001;19(4):489–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535394>
18. Van Bocxlaer K, Yardley V, Murdan S, Croft SL. Drug permeation and barrier damage in Leishmania-infected mouse skin. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(6):1578–85.
19. Carter P, Narasimhan B, Wang Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *Int J Pharm.* 2019;555:49–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.032>
20. Frank LA, Contri R V., Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2015;7(5):623–39.
21. Flores FC, Ribeiro RF, Ourique AF, Rolim CMB, De Bona Da Silva C, Pohlmann AR, et al. Nanostructured systems containing an essential oil: Protection against volatilization. *Quim Nova.* 2011;34(6):968–72.

22. Abreu FOMS, Oliveira EF, Paula HCB, De Paula RCM. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydr Polym.* 2012;89(4):1277–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.048>
23. Woranuch S, Yoksan R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydr Polym.* 2013;96(2):578–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.117>
24. Beyki M, Zhavveh S, Khalili ST, Rahmani-Cherati T, Abollahi A, Bayat M, et al. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan-cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Ind Crops Prod.* 2014;54:310–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.033>
25. Akbari J, Saeedi M, Morteza-Semnani K, Rostamkalaei SS, Asadi M, Asare-Addo K, et al. The design of naproxen solid lipid nanoparticles to target skin layers. *Colloids Surfaces B.* 2016;145:626–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.064>
26. Badri W, Fessi H, Errachid A, Baraket A, Agusti G, El Asbahani A, et al. Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella Sativa L.* essential oil for the topical treatment of inflammation. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2018;46(May):234–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.022>
27. Hasheminejad N, Khodaiyan F, Safari M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chem.* 2019;275(September 2018):113–22. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.085>

28. Granata G, Geraci C, Stefani S, Cafiso V, Stracquadiano S, Napoli E, et al. Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chem.* 2018;269:286–92.
29. Armendáriz-Barragán B, Álvarez-Román R, Galindo-Rodríguez SA. Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro- y nanoparticulados. In: *Investigación en Plantas de Importancia Médica.* 2016. p. 411–36. Available from: <http://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/issue/view/34>
30. Villafuerte L, García B, Garzón M de L, Hernández A, Vázquez ML. Nanopartículas lipídicas sólidas. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2008;39(1):38–52.
31. Zoe D. Enhancement of Topical Delivery with Nanocarriers. In: *Nanotechnology in Dermatology.* In: Nasir A, Friedman A WA, editor. Springer; 2013. p. 87–92.
32. Kfoury M, Auezova L, Greige-Gerges H, Ruellan S, Fourmentin S. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. *Food Chem.* 2014;164:454–61.
33. Mostafa D, Kassem A, Asfour M, Al Okbi S, Mohamed D, Hamed T. Transdermal cumin essential oil nanoemulsions with potent antioxidant and hepatoprotective activities: *In-vitro* and *in-vivo* evaluation. *J Mol Liq.* 2015;212:6–15.
34. Daneshmand S, Jaafari MR, Movaffagh J, Malaekheh-Nikouei B, Iranshahi M, Seyedian Moghaddam A, et al. Preparation, characterization, and optimization of auraptene-loaded solid lipid nanoparticles as a natural anti-inflammatory agent: *In vivo* and *in vitro* evaluations. *Colloids Surfaces B.* 2018;164:332–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.054>

35. Jung S, Otberg N, Thiede G, Richter H, Sterry W, Panzner S, et al. Innovative liposomes as a transfollicular drug delivery system: penetration into porcine hair follicles. *J Invest Dermatol.* 2006;126:1728–32.
36. Sebaaly C, Jraij A, Fessi H, Charcosset C, Greige-Gerges H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chem.* 2015;178:52–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.067>
37. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998;24(12):1113–28. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03639049809108571>
38. Alvarez-Roman R, Barre G, Guya RH, Fessi H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001;52(2):191–5.
39. Bahamonde-Norambuena D, Molina-Pereira A, Cantin M, Muñoz M, Zepeda K, Vilos C. Polymeric Nanoparticles in Dermocosmetic. *Int J Morphol.* 2015;33(4):1563–8. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022015000400061&lng=en&nrm=iso&tlng=en
40. Lboutounne H, Faivre V, Falson F, Pirot F. Characterization of transport of chlorhexidine-loaded nanocapsules through hairless and Wistar rat skin. *Ski Pharmacol Physiol.* 2004;17:176–82.

41. Ammala A. Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets. *Int J Cosmet Sci.* 2013;35(2):113–24.
42. Alvarez-Román R, Naik A, Kalia Y, Guy R, Fessi H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm Res.* 2004;21(10):1818–25.
43. Tachaprutinun A, Meinke MC, Richter H, Pan-In P, Wanichwecharungruang S, Knorr F, et al. Comparison of the skin penetration of *Garcinia mangostana* extract in particulate and non-particulate form. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;86(2):307–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.12.001>
44. Barbosa AI, Costa Lima SA, Reis S. Development of methotrexate loaded fucoidan/chitosan nanoparticles with anti-inflammatory potential and enhanced skin permeation. *Int J Biol Macromol.* 2019;124:1115–22.
45. Iannitelli A, Grande R, di Stefano A, di Giulio M, Sozio P, Bessa L, et al. Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly(DL-lactide-*co*-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *Int J Mol Sci.* 2011;12(8):5039–51.
46. Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydr Polym.* 2013;95(1):50–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>
47. Salas-Cedillo H. Desarrollo de un potencial insecticida nanoparticulado de *Schinus molle* para el control de *Aedes aegypti*. Tesis de Maestría. UANL; 2016.
48. Balzus B, Sahle FF, Hönzke S, Gerecke C, Schumacher F, Hedtrich S, et al. Formulation and *ex vivo* evaluation of polymeric nanoparticles for controlled delivery of corticosteroids to the skin and the corneal epithelium. *Eur J Pharm*

- Biopharm . 2017;115:122–30. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.02.001>
49. Butani D, Yewale C, Misra A. Topical amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* . 2016;139:17–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.032>
50. Matshetshe KI, Parani S, Manki SM, Oluwafemi OS. Preparation, characterization and *in vitro* release study of β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles loaded *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Int J Biol Macromol* . 2018;118:676–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.125>
51. Proksch E, Brandner J, Jensen JM. The skin: An indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 2008;17(12):1063–72.
52. Kohen R. Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother*. 1999;53(4):181–92.
53. Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:860479.
54. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002;127(1):183–98. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b009171p>
55. Puglia C, Offerta A, Saija A, Trombetta D, Venera C. Protective effect of red orange extract supplementation against UV-induced skin damages: Photoaging and solar lentigines. *J Cosmet Dermatol*. 2014;13(2):151–7.
56. Álvarez E. Consecuencias del estrés oxidativo de la piel por radiaciones ultravioleta. *Rev Cuba Invest Biomed*. 1995;14(1).

57. Asbahani A El, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int J Pharm* . 2015;483(1–2):220–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
58. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod*. 2014;62:250–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
59. Amorati R, Foti M, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. *J Agric Food Chem*. 2013;61(46):10835–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24156356> <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf403496k>
60. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):446–75.
61. Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid Based Complement Altern Med* . 2014;1–14. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/651593/>
62. Salazar-Aranda R, Pérez-López LA, C. de la Torre Y, Torres A, Waksman N, Flores A. Essential oils from *Zanthoxylum fagara* Wild Lime, *Ruta chalepensis* L. and *Thymus vulgaris* L.: Composition and activity against *Aedes aegypti* larvae. *Pak J Pharm Sci*. 2015;28(5):1911–5.
63. Viuda-Martos M, Navajas YR, Zapata ES, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a

- Mediterranean diet. Flavour Fragr J. 2010;25(November):13–9. Available from: %5C%5CRobsrv-05%5Creference manager%5CArticles%5C8230.pdf
64. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis L.* and *Salvia officinalis L.*, *Lamiaceae*) essential oils. J Agric Food Chem. 2007;55(19):7879–85.
 65. Kadri A, Zarai Z, Chobba I, Békir A, Gharsallah N, Damak, M. et al. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil cultivated from the South-Western of Tunisia. J Med Plants Res. 2011;5(29):6502–8.
 66. Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. J Agric Food Chem. 2006;54(5):1822–1828.
 67. Vazirian M, Mohammadi M, Farzaei M., Amin G, Amanzadeh Y. Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* subsp. essential oil from Iran. Res J Pharm. 2015;2(1):41–6.
 68. Yang S-A, Jeon S-K, Lee E-J, Shim C-H, Lee I-S. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. Nat Prod Res. 2010;24(2):140–51.
 69. Ruiz-Ciau D, Cuevas-Glory L, Quijano L, Sauri-Duch E. Chemical composition and antioxidant DPPH activity of the floral and leaves essential oils of *Montanoa speciosa* DC. Am J Plant Sci. 2017;8:745–53.

70. Zhang X, Guo Y, Guo L, Jiang H, Ji Q. *In vitro* evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Biomed Res Int*. 2018;1–8.
71. Smeriglio A, Alloisio S, Raimondo FM, Denaro M, Xiao J, Cornara L, et al. Essential oil of *Citrus lumia* Risso: Phytochemical profile, antioxidant properties and activity on the central nervous system. *Food Chem Toxicol* . 2018;119:407–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.053>
72. Londoño J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Desarrollo y Transversalidad*. 2011;129–63.
73. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS Radical Cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9):1231–7.
74. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal*. 2011;24(7):1043–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
75. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*. 2006;19(6–7):669–75.
76. Granados C, Yáñez X, Acevedo D. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Myrcianthes leucoxylla* de Norte de Santander (Colombia). *Inf Tecnol*. 2014;25(3):11–6.

77. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70–6.
78. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 1999;269(2):337–41.
79. Guzmán-Chozas M, Vicario I, Guillén-Sans R. Spectrophotometric profiles of off-flavor aldehydes by using their reactions with 2-thiobarbituric acid. *J Agric Food Chem.* 1997;45(7):2452–7. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0642332195&partnerID=40&md5=8eaefbb8c01377be1d8d6a3f8e86ee4c>
80. Jardine D, Antolovich M, Prenzler PD, Robards K. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) investigation of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) reaction. *J Agric Food Chem.* 2002;50(6):1720–4.
81. Gülçin I, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem.* 2010;3(1):43–53.
82. Alan Y, Savci A, Çakmak B, Kurt H. Determination of the antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja hortensis* ingredients. *J Inst Nat Appl Sci.* 2016;21(2):167–77.
83. Topal F, Alwasel SH, Kocuyigit UM, Nar M, Kalin P, Gocer H, et al. Antioxidant activity of taxifolin: an activity–structure relationship. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(4):674–83.

84. Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. Food Chem. 2008;108(3):1019–22.
85. Romeu C, Botta-Ferret E, Díaz-Finalé Y. Caracterización Fitoquímica del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y evaluación in vitro de su actividad acaricida. Fitosanidad. 2007;11(2).
86. Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complement Altern Med . 2014;14:225. Available from: <http://www.ebscohost.com>
87. Shellie R, Mondello L, Marriott P, Dugo G. Characterization of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. J Chromatogr A. 2002;970:225–34.
88. Justus B, Paula J de FP de, Maia BHLNS, Almeida VP de, Assunção DP da SF de, Borsato DM, et al. Chemical composition and biological activities of the essential oil and anatomical markers of *Lavandula dentata* L. cultivated in Brazil. Brazilian Arch Biol Technol. 2018;61(0).
89. Christofoli M, Bicalho KU, de Melo Casal C, de Cássia Domingues V, Costa ECC, Alves CCF, et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. Ind Crops Prod. 2015;70:301–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.025>

90. Zhao Y, Chang Y-X, Hu X, Liu C-Y, Quan L-H, Liao Y-H. Solid lipid nanoparticles for sustained pulmonary delivery of *Yuxingcao* essential oil: Preparation, characterization and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm.* 2017;516(1–2):364–71.
91. Ephrem E, Greige-Gerges H, Fessi H, Charcosset C. Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *J Microencapsul.* 2014;31(8):746–53.
92. Wattanasatcha A, Rengpipat S, Wanichwecharungruang S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *Int J Pharm.* 2012;434(1–2):360–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.017>
93. <https://www.fda.gov/aboutfda/enespanol/>.
94. Herkenne C, Alberti I, Naik A, Kalia Y, Mathy FX, Pr at V, et al. *In vivo* methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharm Res.* 2008;25(1):87–103.
95. Herkenne C, Naik A, Kalia Y, Hadgraft J, Guy R. Dermatopharmacokinetic prediction of topical drug bioavailability *in vivo*. *J Invest Dermatol.* 2007;127(4):887–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700642>
96. Sekkat N, Kalia YN, Guy RH. Biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. *J Pharm Sci.* 2002;91(11):2376–81.
97. Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Heike A, Lademann J. Porcine ear skin: An *in vitro* model for human skin. *Ski Res Technol.* 2007;13(1):19–24.
98. Huong SP, Bun H, Fourneron JD, Reynier JP, Andrieu V. Use of various models for *in vitro* percutaneous absorption studies of ultraviolet filters. *Ski Res Tech.* 2009;15:253–61.

99. Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann HJ, Fluhr JW. The *tape stripping* procedure - evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72(2):317–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.008>
100. Zou Y, Celli A, Cao Y, Maibach H. Confocal laser scanning microscopy to estimate nanoparticles human skin penetration *in vitro*. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:8035–41.
101. Berardesca E. Non invasive diagnostic techniques in clinical dermatology. Berardesca E, Maibach H, Wilhelm K, editors. Ed. Springer; 2014. 1–250 p.
102. Wilhelm KP, Cua AB, Maibach HI. Skin aging. Effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Arch Dermatol Res.* 1991;127:1806–9.
103. Pereira TA, Guerreiro CM, Maruno M, Ferrari M, Rocha-Filho PA. Exotic vegetable oils for cosmetic O/W nanoemulsions: *In vivo* evaluation. *Molecules.* 2016;21(3):1–16.
104. Walters KA, Roberts MA. Dermatologic, cosmeceutic, and cosmetic development: therapeutic and novel approaches. CRC Press; 2007. 1–648 p.
105. <https://www.courage-khazaka.de/de/>.
106. Velázquez-Dávila L. Efecto de la encapsulación de clotrimazol en nanopartículas sobre su grado de penetración en piel de cerdo. Tesis de Licenciatura. UANL; 2011.
107. Velázquez-Dávila L. Evaluaciones dermatocinéticas y antimicóticas de productos naturales incorporados en nanocápsulas biodegradables. Tesis de Doctorado. UANL; 2017.

108. Cavazos-Rodríguez M. Encapsulación de moléculas antioxidantes en nanopartículas poliméricas para su aplicación dermatológica. Tesis de Maestría. UANL; 2011.
109. Secretaria de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 10a ed. 2011.
110. Guerra-Boone L, Alvarez-Román R, Salazar-Aranda R, Torres-Cirio A, Rivas-Galindo VM, Waksman N, et al. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. Pak J Pharm Sci. 2015;28(1):363–9.
111. Adams RP. Identification of essential Oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th ed. Allured Pub Corp; 2007. 1–804 p.
112. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JPP, Ammouy N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int J Pharm. 1989;55:R1–4.
113. Lugo-Estrada L. Obtención y caracterización de nanopartículas poliméricas para la encapsulación de aceites esenciales por la técnica de nanoprecipitación. Tesis de Maestría. UANL; 2012.
114. Gonzalez-Moreno B. Optimización de una técnica de microextracción en fase sólida para cuantificar aceite esencial de *Thymus vulgaris* en cubiertas poliméricas formadas a partir de nanocápsulas. UANL; 2018.
115. Danh LT, Triet N, Hana LT, Zhaoa J, Mammucaria R, Foster N. Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender essential oil extracted by supercritical CO₂. J Supercrit Fluids. 2012;70:27–34.

116. Derwich E, Benziane Z, Chabir R, Taouil R. In vitro antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in Morocco. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011;3(3):89–95.
117. Secretaria de Salud. Criterios para la Validacion de Metodos Fisicoquimicos. 2011. Available from: <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/cvfq032011.pdf>
118. Ruberto G, Baratta M. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 2000;69(2):167–74.
119. Gülçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Antioxidant activity of clove oil - A powerful antioxidant source. *Arab J Chem.* 2012;5(4):489–99.
120. Lee J., Hwang W, Lim ST. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. *Candolle* roots. *J Ethnopharmacol.* 2004;93:409–415.
121. Elmastaş, M., Gülçin I, Beydemir Ş, Küfrevioğlu Öİ, Aboul-Enein HY. A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) seeds extracts. *Anal Lett.* 2006;39:47–65.
122. Gülçin I., Elmastaş M, Aboul-Enein H. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arab J Chem.* 2012;5:489–499.
123. Dilworth L., Riley CK, Stennett D. Plant Constituents: Carbohydrates, oils, resins, balsams, and plant hormones. In: *Pharmacognosy Fundamentals, Applications and Strategies.* Academic Press; 2017. p. 61–80.

124. Stanojević LP, Radulović NS, Djokić TM, Stanković BM, Ilić DP, Cakić MD, et al. The yield, composition and hydrodistillation kinetics of the essential oil of dill seeds (*Anethi fructus*) obtained by different hydrodistillation techniques. *Ind Crops Prod.* 2015;65:429–36.
125. Imelouane B, Elbachiri A, Wathelet J., Dubois J, Amhamdi H. Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the essential oil of *Lavandula dentata*. *World J Chem.* 2010;5(2):103–100.
126. Bekkara F, Bousmaha L, Taleb bendiab S, Boti J, Casanova J. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biol Santé.* 2007;7:6–11.
127. Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem Toxicol* . 2010;48(11):3144–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.010>
128. Do TKT, Hadji-Minaglou F, Antoniotti S, Fernandez X. Authenticity of essential oils. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2015;66:146–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.007>
129. Secretaria de Salud. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. 2a ed. 2013.
130. Sfetsas T, Michailof C, Lappas A, Li Q, Kneale B. Qualitative and quantitative analysis of pyrolysis oil by gas chromatography with flame ionization detection and comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2011;1218(21):3317–25. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.034>

131. Touati B, Chograni H, Hassen I, Boussaïd M, Toumi L, Brahim N Ben. Chemical composition of the leaf and flower essential oils of Tunisian *Lavandula dentata* L. (*Lamiaceae*). Wiley Online Libr Chem Biodivers. 2011;8(8):1560–70.
132. Ojeda-Sana AM, Van-Baren CM, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. Food Control. 2013;31(1):189–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.022>
133. Rocha-Caldas GF, Oliveira AR da S, Araújo AV, Lafayette SSL, Albuquerque GS, Silva-Neto J da C, et al. Gastroprotective mechanisms of the monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). PLoS One . 2015 Aug 5;10(8):e0134558. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134558>
134. Galindo-Rodriguez S, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. Pharm Res. 2004;21:1428–39.
135. Armendariz-Barragán B. Nanomedicinas a base de productos naturales para el tratamiento de la tuberculosis. Tesis de Doctorado. UANL;2017.
136. Widjaja M, Gan J, Talpaneni JSR, Tjandrawinata RR. Determination of Eudragit® L100 in an enteric-coated tablet formulation using size-exclusion chromatography with charged-aerosol detection. Sci Pharm. 2018;86(3):1–8.

137. Tang J, Na X, Ji H, Liu H, Wang Z, Linhua W. Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2429–35.
138. Lambers H, Piessens S, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci*. 2006;28:359–370.
139. Hornig S, Heinze T, Becer CR, Schubert US. Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation. *J Mater Chem*. 2009;19(23):3838–40.
140. Reichardt C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. 3er editio. Wiley-VCH Publishers; 2003.
141. Singh S, Neelam, Arora S, Singla Y. An Overview of multifaceted significance of Eudragit polymers in drug delivery systems. *Asian J Pharm Clin Res*. 2015;8(5).
142. Kiliçarslan M, Baykara T. The effect of the drug/polymer ratio on the properties of the verapamil HCl loaded microspheres. *Int J Pharm*. 2003;252(1–2):99–109.
143. Clogston J, Patri A. Zeta Potential Measurement. In: *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. Springer; 2011. p. 63–70.
144. Schulz H, Özkan G, Baranska M, Krüger H, Özcan M. Characterization of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vib Spectrosc*. 2005;39(2):249–56.
145. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010;385(1–2):113–42.
146. Wu Y, Luo Y, Wang Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method.

- LWT - Food Sci Technol . 2012;48(2):283–90. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.027>
147. Silva-Flores PG, Pérez-López LA, Rivas-Galindo VM, Paniagua-Vega D, Galindo-Rodríguez SA, Álvarez-Román R. Simultaneous GC-FID quantification of main components of *Rosmarinus officinalis L.* and *Lavandula dentata* essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. J Anal Methods Chem. 2019;2019:1–9.
148. Sousa J, Brancalion A, Souza A, Turatti I, Ambrósio S, Furtado N, et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. J Pharm Biomed Anal. 2011;54(4):653–9.
149. Miaoa Q, Konga W, Zhaoa X, Yang S, Yang M. GC-FID coupled with chemometrics for quantitative and chemical fingerprinting analysis of *Alpinia oxyphylla* oil. J Pharm Biomed Anal. 2015;102:436–42.
150. Briganti S, Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. J Eur Acad Dermatology Venereol. 2003;17(6):663–9.
151. Zhang J, Dou J, Zhang S, Liang Q, Meng Q. Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil and methanol extracts of rhizoma *Alpinia officinarum* from China *in vitro*. African J Biotechnol. 2010;9(28):4414–21.
152. Kendall AC, Kiezel-Tsugunova M, Brownbridge LC, Harwood JL, Nicolaou A. Lipid functions in skin: Differential effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cutaneous ceramides, in a human skin organ culture model. Biochim Biophys Acta - Biomembr. 2017;1859(9):1679–89. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.016>

153. Gursul S, Karabulut I, Durmaz G. Antioxidant efficacy of thymol and carvacrol in microencapsulated walnut oil triacylglycerols. *Food Chem.* 2019;278:805–10.
154. Thiele JJ, Ekanayake-Mudiyanselage S. Vitamin E in human skin: Organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. *Mol Aspects Med.* 2007;28(5–6):646–67.
155. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.* 2006;217(2–3):213–20.
156. Hosni K, Jemli M, Dziri S, M'rabet Y, Ennigrou A, Sghaier A, et al. Changes in phytochemical, antimicrobial and free radical scavenging activities of the Peruvian pepper tree (*Schinus molle L.*) as influenced by fruit maturation. *Ind Crops Prod.* 2011;34(3):1622–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.004>
157. Miguel M, Gago C, Antunes M, Lagoas S, Faleiro M, Megías C, et al. Antibacterial, antioxidant, and antiproliferative activities of *Corymbia citriodora* and the essential oils of eight Eucalyptus Species. *Medicines.* 2018;5(3):61.
158. Cauchetier E, Deniau M, Fessi H, Astier A, Paul M. Atovaquone-loaded nanocapsules: Influence of the nature of the polymer on their *in vitro* characteristics. *Int J Pharm.* 2003;250:273–81.
159. Cruz L, Soares LU, Costa TD, Mezzalira G, Da Silveira NP, Guterres SS, et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int J Pharm.* 2006;313(1–2):198–205.
160. Zili Z, Sfar S, Fessi H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Int J Pharm.* 2005;294(1–2):261–7.

161. Dobrev H. Ethical aspects of cosmetic testing. In: Practical Aspects of Cosmetic Testing . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 15–25. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-05067-1_2
162. Flaten GE, Palac Z, Engesland A, Filipović-Grčić J, Vanić Ž, Škalko-Basnet N. *In vitro* skin models as a tool in optimization of drug formulation. Eur J Pharm Sci . 2015;75:10–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.018>
163. Abd E, Yousef SA, Pastore MN, Telaprolu K, Mohammed YH, Namjoshi S, et al. Skin models for the testing of transdermal drugs. Clin Pharmacol Adv Appl. 2016;8:163–76.
164. Schlupp P, Weber M, Schmidts T, Geiger K, Runkel F. Development and validation of an alternative disturbed skin model by mechanical abrasion to study drug penetration. Results Pharma Sci. 2014;4:26–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rinphs.2014.09.002>
165. Kanikkannan N, Burton S, Patel R, Jackson T, Sudhan Shaik M, Singh M. Percutaneous permeation and skin irritation of JP-8 + 100 jet fuel in a porcine model. Toxicol Lett. 2001;119(2):133–42.
166. Chilcott RP, Dalton CH, Emmanuel AJ, Allen CE, Bradley ST. Transepidermal water loss does not correlate with skin barrier function *in vitro*. J Invest Dermatol . 2002;118(5):871–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01760.x>
167. Herman A, Herman AP. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: A review. J Pharm Pharmacol. 2015;67(4):473–85.

168. Xie F, Chai JK, Hu Q, Yu YH, Ma L, Liu LY, et al. Transdermal permeation of drugs with differing lipophilicity: Effect of penetration enhancer camphor. *Int J Pharm.* 2016;507(1–2):90–101.
169. De Azevedo Ribeiro RC, Barreto SMAG, Ostrosky EA, Da Rocha-Filho PA, Veríssimo LM, Ferrari M. Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill extract as moisturizing agent. *Molecules.* 2015;20(2):2492–509.
170. Robinson M, Visscher M, Laruffa A, Wickett R. Natural moisturizing factors (NMF) in the stratum corneum (SC). I. Effects of lipid extraction and soaking. *J Cosmet Sci.* 2010;61(1):13–22.
171. Mojumdar EH, Pham QD, Topgaard D, Sparr E. Skin hydration: Interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum. *Sci Rep .* 2017;7(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15921-5>
172. Varela JA, Mariana G, Bexiga CÅ, Simpson JC, Dawson KA. Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells. *Additional Information. Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 1996;5(4):267–267.
173. Can Baser K, Buchbauer G. *Handbook of essential oils. Science, technology and applications.* 2nd editio. CRC Press; 2016.
174. Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release .* 2004 Sep;99(1):53–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365904002858>

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Perla Giovanna Silva Flores

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con orientación en Química Biomédica

Tesis: **DESARROLLO Y EVALUACIÓN DERMATOCINÉTICA DE NANOPARTÍCULAS CON ACEITES ESENCIALES PARA SU APLICACIÓN EN PIEL**

Campo de Estudio: Ciencias de la salud.

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 13 de agosto de 1985, hija de Eufemio Silva Covarrubias y Ma. de Jesús Flores García.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Químico Clínico Biólogo en 2007.

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Maestro en Ciencias con orientación en Farmacia en 2012.

Experiencia profesional: Químico analista responsable de perfiles de disolución en Ipharma, S.A. de C.V. (Agosto 2007-Marzo 2015).