

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIONES DERMATOCINÉTICAS Y ANTIMICÓTICAS DE
PRODUCTOS NATURALES INCORPORADOS EN
NANOCÁPSULAS BIODEGRADABLES**

POR

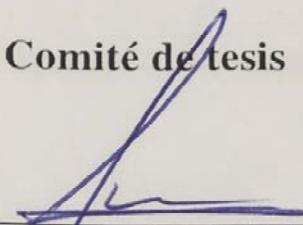
LILY ADRIANA VELÁZQUEZ DÁVILA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

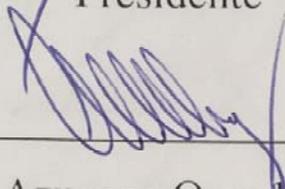
DICIEMBRE, 2017

**EVALUACIONES DERMATOCINÉTICAS Y ANTIMICÓTICAS DE
PRODUCTOS NATURALES INCORPORADOS EN
NANOCÁPSULAS BIODEGRADABLES**

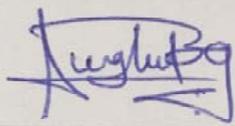
Comité de tesis



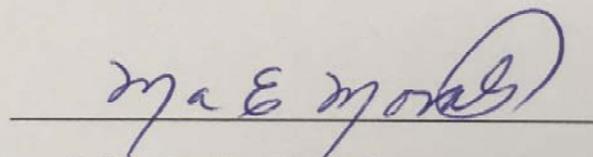
Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Presidente



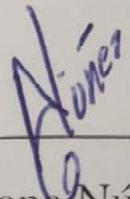
Dra. Ma. Azucena Oranday Cárdenas
Secretaria



Dr. Juan Gabriel Báez González
1^{er} Vocal



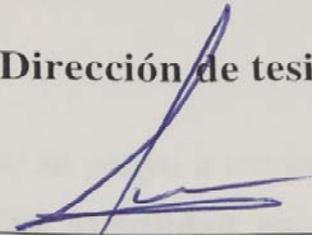
Dra. Ma. Eufemia Morales Rubio
2^{do} Vocal



Dra. Ma. Adriana Núñez González
3^{er} Vocal

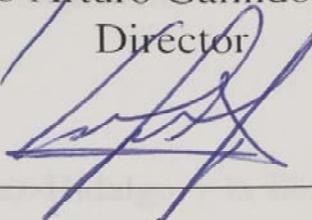
**EVALUACIONES DERMATOCINÉTICAS Y ANTIMICÓTICAS DE
PRODUCTOS NATURALES INCORPORADOS EN
NANOCÁPSULAS BIODEGRADABLES**

Dirección de tesis



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Director



Dra. Rocío Álvarez Román

Directora externa

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue apoyado por:

- CB-CONACyT- México / 2009-129961
- PN-CONACyT - México / 2014-248560
- PRODEP-SEP Networks DSA 103.5/15/14156
- AIRD-France, Jeunes Équipes (JEAI-2011, NANOBIOISA).

LAVD agradece a CONACyT por su apoyo a través de la beca **260673** y al programa “**Becas Mixtas 2015 – mzo 2016 Movilidad en el Extranjero (290936)**” para la realización de una estancia de investigación.

A la Dra. Pilar Vinardell Martínez-Hidalgo y la Dra. Montserrat Mitjans Arnal por su dirección durante la estancia doctoral en el Laboratorio de Fisiología, de la Facultad de Farmacia de la *Universitat de Barcelona*, en España.

DEDICATORIAS

Agradezco primeramente a Dios, por permitirme llegar hasta este lugar y por su fortaleza y respaldo cada día de mi vida. A mi familia por apoyarme en cada paso que doy y nunca dejarme dar por vencida. A mi esposo Israel por su apoyo incondicional, gracias por impulsarme día a día a ser mejor.

A mis compañeros de Química Analítica, Janeth y Misael por brindarme su amistad y permitirme ser parte de su vida. Gracias por cada momento, cada risa y cada conocimiento compartido valoro mucho todo lo aprendido.

A mis compañeros del CRCEI: Álvaro, Byron, Carolina, Química Lidia Oviedo y a la Dra. Gloria González por su apoyo durante mi estancia en ese lugar y por todo el conocimiento brindado y el adquirido en el área de microbiología.

A mis compañeros del laboratorio de Fisiología en la *Universitat de Barcelona*: Laura, Elisabeth, Ana Isa y la Dra. Carmen Morán por su apoyo y conocimiento brindado. Gracias por tanto en tan poco tiempo.

A mis amigas RNPA, EBHM, VICR y del CFEA por su apoyo y por darme ánimo cuando más lo necesitaba gracias por cada palabra y por ser parte de mi vida.

A RETSA, gracias al QBP Gregorio Hernández, Polo y Jorge por su disposición y apoyo con infinidad de muestras para realizar este trabajo.

Poned la mira en las cosas de arriba, no en las de la tierra. Porque habéis muerto, y vuestra vida está escondida con Cristo en Dios. Cuando Cristo, vuestra vida, se manifieste, entonces vosotros también seréis manifestados con él en gloria.

Colosenses 3:2-4 RVR1960

ÍNDICE

I.	RESUMEN	
II.	INTRODUCCIÓN	1
III.	ANTECEDENTES	2
1.	Micosis superficiales	2
1.1.	Estrategias en el tratamiento de las micosis superficiales	3
2.	Estructura de la piel	4
2.1.	Transporte de principios activos a través de la piel	5
2.2.	Formulaciones para su administración tópica	7
3.	Productos naturales con actividad antimicrobiana	8
3.1.	Aceites esenciales	9
3.2.	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales	10
4.	Nanoencapsulación de compuestos biológicamente activos	11
4.1.	Nanopartículas poliméricas	11
4.2.	Incorporación de aceites esenciales en nanopartículas poliméricas	13
5.	Evaluación de la permeación y penetración de principios activos en la piel	14
IV.	JUSTIFICACIÓN	16
V.	HIPÓTESIS	16
VI.	OBJETIVO GENERAL	17
VII.	OBJETIVOS PARTICULARES	17
Capítulo 1.	Obtención y caracterización de nanocápsulas biodegradables con tres aceites esenciales y evaluación de su actividad citotóxica en la línea celular HaCaT	18
Capítulo 2.	Estudios de la actividad antidermatifítica de nanocápsulas con	36

	aceites esenciales y de permeación <i>in vitro</i> en piel de cerdo	
Capítulo 3.	Desarrollo y aplicación tópica de formulaciones de nanopartículas poliméricas cargadas con un clotrimazol	47
VIII.	CONCLUSIONES GENERALES	56
IX.	PERSPECTIVAS	58
X.	BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXO I.	Review: <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> methods for the evaluation of natural products against dermatophytes	74
ANEXO II.	Participación en congresos	81

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Tabla 1.	Parámetros fisicoquímicos de las formulaciones de NC con aceites esenciales incorporados	26
Tabla 2.	Porcentaje de eficiencia de encapsulación de aceite esencial incorporado en las formulaciones de NC	27
Tabla 3.	Valores de IC ₅₀ para (AE) de Ov, Tv, Mg, libres e incorporados en (NC), determinados mediante el ensayo de MTT	32

CAPÍTULO 2

Tabla 1.	Inhibiciones del crecimiento micelial de los dermatofitos con la aplicación de las NC cargadas con aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> y <i>O. vulgare</i> mediante la técnica <i>poisoned food</i>	40
----------	---	----

CAPÍTULO 3

Tabla 1.	Parámetros de validación parcial determinados por CLAR	52
Tabla 2.	Parámetros fisicoquímicos de las formulaciones de NP con CLT incorporado	53

ÍNDICE DE FIGURAS

ANTECEDENTES

Figura 1.	Estructura química de los azoles	3
Figura 2.	Estructura química de la piel	5
Figura 3.	Mecanismos de transporte a través de la piel a) intercelular, b) transcelular y c) por apéndices	6
Figura 4.	Estructura de las nanopartículas poliméricas a) matricial y b) capsular	12
Figura 5.	Técnica de nanoprecipitación	13
Figura 6.	Celda de Franz modificada empleada para la determinación de estudios de permeación transdérmica en piel de cerdo	15

CAPÍTULO 1

Figura 1.	Estabilidad coloidal de las formulaciones de NC con aceite esencial incorporado	28
Figura 2.	Ensayo de viabilidad celular, MTT (a) y CRN (b) para los aceites esenciales Ov, Tv, Mg (AE) libres e incorporados en (NC) sobre las tasas de supervivencia de la línea celular HaCaT	30
Figura 3.	Actividad citotóxica de AE-Ov, AE-Tv, AE-Mg, NC-Ov, NC-Tv y NC-Mg, a dos diferentes concentraciones con células HaCaT no irradiadas e irradiadas (células-irradiadas UVA 2.5 J/cm ²)	33
Figura 4.	Estimulación de queratinocitos con AE-Ov y NC-Ov como tratamiento para la producción de IL-1 α	34

CAPÍTULO 2

Figura 1.	Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales libres y nanoencapsulados. (a) Control de crecimiento, (b) NP-control (sin AE), (c) AE-Ov 125 μ g/mL, (d) AE-Tv 175 μ g/mL, (e) NC-Ov 250 μ g/mL, (f) NC-Ov 125 μ g/mL, (g) NC-Tv 350 μ g/mL y (h) NC-Tv 175 μ g/mL. <i>M. canis</i> (1), <i>M. gypseum</i> (2), <i>T. mentagrophytes</i> (3), <i>T. tonsurans</i> (4), <i>T. rubrum</i> (5) y <i>E. floccosum</i> (6)	42
-----------	--	----

Figura 2.	Cantidad de γ -terpineno y timol en el estrato córneo después de 2, 4, 6 y 24 h de contacto con a) AE-Tv, b) NC-Tv, c) AE-Ov y d) NC-Ov	44
-----------	--	----

CAPÍTULO 3

Figura 1.	Perfiles de concentración de CLT en el estrato córneo después de 1 h de contacto con las formulaciones de NP	53
-----------	--	----

Figura 2.	Cantidad acumulada del CLT en el estrato córneo después de la aplicación de tres formulaciones de NP durante 1 h	55
-----------	--	----

I. RESUMEN

En México, las micosis superficiales afectan al 10% de la población. El tratamiento convencional consiste en el uso de fármacos tópicos (i.e. clotrimazol). Sin embargo, la limitante más importante que presentan es su pobre penetración en la piel, además del riesgo de aparición de resistencias. El empleo de productos naturales (i.e. aceites esenciales) es una práctica difundida en México y se ha reportado que los aceites esenciales (AE) contienen componentes activos contra algunos microorganismos, específicamente, hongos. En este estudio, ha sido propuesto el uso tópico de nanopartículas (NP), orientado a incrementar la absorción de los activos en piel. En una primera etapa, se incorporaron los AE de *Magnolia grandiflora* (AE-Mg), *Thymus vulgaris* (AE-Tv) y *Origanum vulgare* (AE-Ov) en nanocápsulas (NC). Las NC presentaron un tamaño de ≈ 200 nm, con un porcentaje de eficiencia de encapsulación de 28.82% para NC-Tv, de 22.89% para NC-Ov y, por último, 13.62% para NC-Mg. Se evaluó el efecto citotóxico de los AE libres e incorporados en las NC contra la línea celular HaCaT. Se obtuvieron los valores de IC_{50} : 51.03, 117.63 y > 200 $\mu\text{g/mL}$, para AE-Ov, AE-Tv y AE-Mg, respectivamente y 60.26, >120 y >200 $\mu\text{g/mL}$ para sus respectivas formulaciones de NC. En una segunda etapa, se realizaron estudios *in vitro* de permeación en piel de cerdo con los AE libres y en NC hasta por 24 horas. Se estableció que propiedades fisicoquímicas de los compuestos presentes en los AE, así como, propiedades relacionadas con las NC están involucrados en la penetración de compuestos en la piel. Para evaluar la actividad antifúngica de AE-Tv y AE-Ov libres y en NC se adaptó la técnica *poisoned food* con seis cepas de hongos dermatofitos. Se estableció una CMI de 175 y 125 ppm para AE-Tv y AE-Ov, mientras que para las NP con AE incorporado se demostró la actividad antifúngica de ambas formulaciones contra, al menos, cuatro de las seis cepas de hongos dermatofitos. Finalmente, se obtuvieron NP catiónicas, aniónicas y neutras cargadas con clotrimazol (CLT) y se realizaron estudios *in vitro* de permeación en piel de cerdo y la técnica *tape stripping*. Se observó que las NP con carga positiva mostraron una atracción por la superficie de la piel, favoreciendo la liberación del CLT sobre la superficie de la piel. Esta investigación abre expectativas para la optimización del tratamiento tópico de enfermedades fúngicas.

ABSTRACT

In Mexico, superficial mycoses affect to 10% of the population. The conventional treatment involves the administration of topical drugs (i. e. clotrimazole). Nevertheless, these kind of drugs present some remarkable drawbacks as poor skin penetration and risk of the emergence of drug-resistant strains. The use of natural products (i. e. essential oils) is a practice widely known in Mexico and it has been reported that essential oils (EO) have active compounds against some microorganisms, specifically fungi. In this study, the topical use of nanoparticles to increase the skin absorption of the actives has been proposed. In a first phase, the EO of *Magnolia grandiflora* (EO-Mg), *Thymus vulgaris* (EO-Tv) and *Origanum vulgare* (EO-Ov) were incorporated in nanocapsules (NC). The NC presented a size of ≈ 200 nm, with an encapsulation efficiency of 28.82% for NC-Tv, 22.89% for NC-Ov and 13.62% for NC-Mg. The cytotoxic effect of the free- and encapsulated-EO was evaluated on the cell line HaCaT. The IC_{50} values were: 51.03, 117.63 and > 200 $\mu\text{g/mL}$, for EO-Ov, EO-Tv and EO-Mg, respectively, and, 60.26, >120 y >200 $\mu\text{g/mL}$ for their respective formulations of NC. In a second phase, *in vitro* permeation studies on pig skin were performed for evaluating the free- and encapsulated-EO up to 24 h. The results shown physicochemical that properties of the compounds in the EO and characteristics of NC were involved in the absorption of the compounds into the skin. For evaluating the antifungal activity of EO-Tv and EO-Ov free and encapsulated in NC, the poisoned food technique was adapted using six dermatophyte fungal strains. Minimal Inhibition Concentration was established, for EO-Tv was 175 ppm and for EO-Ov was 125 ppm. Both formulations of NP loaded with EO presented antifungal activity, at least on four strains. Finally, cationic, anionic and neutral NP were prepared to incorporate clotrimazole (CLT). The formulations were evaluated by *in vitro* permeation studies on pig skin and *tape* stripping technique. The results indicated that particles positively charged can be attracted to the skin surface in order to improve release of CLT into skin surface. This study displays new expectations for the optimization of the topical treatment in fungal diseases.

II. INTRODUCCIÓN

En México, las micosis superficiales constituyen del 70 al 80% de todas las micosis y afectan al 10% de la población. El tratamiento convencional de las micosis superficiales es con fármacos del tipo de los azoles (i.e. clotrimazol CLT). Este grupo de fármacos antimicóticos tienen un amplio espectro de acción, no obstante, la limitante más importante que presentan es su pobre penetración en los tejidos afectados, además de la posible aparición de cepas farmacorresistentes. El empleo de productos naturales (i.e. aceites esenciales) es una práctica difundida en México y se ha reportado que los aceites esenciales (AE) contienen componentes activos contra algunos microorganismos, específicamente, hongos. Las nanopartículas poliméricas (NP) han sido propuestas como vectores de principios activos debido a que presentan algunas ventajas, entre las que destacan, la protección al principio activo y su capacidad para controlar la liberación del activo dentro del rango terapéutico deseado. En este contexto, en el presente trabajo se propuso el desarrollo de formulaciones de NP biodegradables con AE y la evaluación tanto de su actividad antimicótica *in vitro*, como de su nivel de penetración en piel de cerdo, a fin de obtener una posible alternativa para mejorar el tratamiento de las micosis superficiales. Primeramente, en el Capítulo 1, se reporta el desarrollo de formulaciones de NP cargadas con AE (AE-Ov, AE-Tv y AE-Mg), las cuales fueron caracterizadas fisicoquímicamente. Posteriormente, para determinar si los AE y sus respectivas formulaciones eran seguras para una administración tópica, se realizó la evaluación citotóxica empleando la línea celular HaCaT. En el Capítulo 2, para conocer el efecto antifúngico de los AE y sus formulaciones de NC, se detalla la adaptación de la técnica *poisoned food* con seis cepas de dermatofitos. Así mismo, se determinó si el AE y sus formulaciones tienen la capacidad de penetrar en la piel, mediante un ensayo *in vitro* de permeación en piel de cerdo. Por último, en el Capítulo 3, tomando como referencia un antimicótico modelo (CLT), se reporta el desarrollo de tres formulaciones de NP (catiónicas, aniónicas y neutras) cargadas con CLT, las cuales fueron caracterizadas fisicoquímicamente. Con la finalidad de establecer si existe una relación directa entre la penetración del CLT y la densidad de carga superficial de las NP, se realizó un estudio *in vitro* de permeación con piel de cerdo y la técnica *tape stripping*.

III. ANTECEDENTES

1. Micosis superficiales

Las dermatomicosis o micosis superficiales son infecciones que se caracterizan porque el hongo invade las capas externas de la epidermis, el pelo y las uñas (Vilata 2006a). De acuerdo al agente causal de la infección, estas micosis se dividen en dermatofitosis, pitiriasis versicolor y candidiasis.

Específicamente, las dermatofitosis son causadas por hongos denominados dermatofitos, los cuales tienen la capacidad de invadir tejidos queratinizados produciendo lesiones popularmente conocidas como “tiñas”. Generalmente, la denominación de las infecciones causadas por dermatofitos refiere a la localización anatómica involucrada en la infección, por ejemplo, *tinea barbae* (tiña de la barba y el bigote), *tinea capitis* (tiña del cuero cabelludo, las cejas y pestañas), *tinea corporis* (tiña de la piel lampiña), *tinea cruris* (tiña de la ingle), *tinea manuum* (tiña de la mano), *tinea pedis* (tiña de los pies) y *tinea unguium* (tiña de las uñas) (Molina 2011.).

Las dermatomicosis son las infecciones superficiales y cutáneas fúngicas más comunes en el hombre. Este tipo de infecciones son causadas por hongos filamentosos pertenecientes a las especies de los generos: *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*. Estos hongos filamentosos tienen afinidad por la queratina, la cual es uno de los componentes principales del pelo, las uñas y la piel; de hecho, estos sitios son considerados como áreas primarias de infección por dermatofitos (Borgers *et al.* 2005). En el área clínica, el agente etiológico más frecuentemente implicado es *T. rubrum*, seguido de *T. mentagrophytes* y *M. canis*; la distribución del resto de las especies varía en función de la localización geográfica (Gupta *et al.* 1998). Se estima que este tipo de padecimientos, afectan del 20-25% de la población mundial, mientras que en México afectan al 10% de la población y esta incidencia continúa creciendo constantemente (Vena *et al.* 2012; Manzano-Gayosso 2008; Kim *et al.* 2015).

1.1. Estrategias en el tratamiento de las micosis superficiales

El tratamiento convencional de las micosis superficiales es con fármacos tipo azoles. Dentro de esta clasificación los compuestos más utilizados en la actualidad son los imidazoles (clotrimazol, ketoconazol, miconazol) y los triazoles (fluconazol, itraconazol), mismos que se caracterizan por la presencia en su estructura química de un anillo azólico de 5 átomos (Figura 1). Estos compuestos actúan sobre las membranas celulares fúngicas al inhibir la enzima citocromo P450 14-alfa-desmetilasa fúngica. Ello da lugar a la formación de una membrana anormal tanto desde el punto de vista morfológico como funcional (Fernández *et al.* 2005).

Particularmente, este grupo de fármacos antimicóticos tienen un amplio espectro de acción, no obstante, la limitante más importante que presentan es su pobre penetración en los tejidos afectados, además de la posible aparición de resistencia.

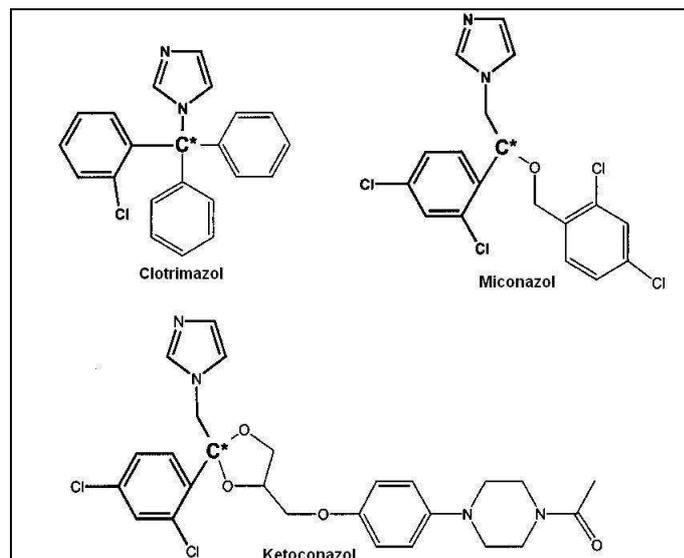


Figura 1. Estructura química de los azoles.

Específicamente, el clotrimazol (CLT) fue descrito por primera vez en 1969 y es un azol relativamente no tóxico con un amplio espectro de actividad antifúngica (Solich *et al.* 2002). Durante el tratamiento con CLT, en algunos casos, este fármaco no muestra efectividad contra el hongo, genera efectos secundarios y tasas elevadas de reincidencia de la infección. Dentro de los efectos adversos del CLT se encuentran: función hepática

anormal, náuseas y vómitos, con respecto a su administración oral e irritación y escozor de la piel cuando su aplicación es tópica. El tratamiento tópico del CLT, con frecuencia es el más recurrido comparado con la administración oral de fármacos en el tratamiento de infección micóticas cutáneas debido a que, el CLT es prácticamente insoluble en agua y sus niveles de absorción son bajos cuando este es administrado vía oral (Paradkar *et al.* 2015). Sin embargo, este fármaco presenta una limitante con respecto a su aplicación tópica, la cual es una pobre penetración en las lesiones; lo anterior está relacionado con su coeficiente de partición ($\text{Log } K_{o/w} = 4.1$). Esta propiedad es uno de los factores determinantes para lograr concentraciones óptimas de fármaco en la superficie de la piel (Vilata 2006b; Marwah *et al.* 2016).

2. Estructura de la piel

La piel es uno de los órganos más extensos en el cuerpo humano. Dentro de sus funciones primarias se encuentra la función como barrera contra peligros presentes en el medio ambiente, tales como: la radiación ultravioleta, los daños físicos y químicos y los microorganismos. La piel está estructurada en tres capas principales: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 2).

Epidermis: es la capa más externa de la piel, posee un grosor entre 0.05-1 mm dependiendo de la parte del cuerpo donde se encuentre. Posee tres poblaciones principales de células: queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans. Los primeros son las células predominantes en la epidermis y son producidos en la lámina basal de la piel para después pasar por un proceso de maduración, diferenciación y migración hacia la superficie de la piel. El tiempo de tránsito de los queratinocitos de la capa basal a la superficie de la piel (estrato córneo) es alrededor de los 14 días. El estrato córneo es la capa más externa de la epidermis y actúa principalmente como una barrera.

Dermis: muchos tipos de células residen en la dermis incluyendo fibroblastos, macrófagos, mastocitos y células inmunes circulantes. La dermis es responsable de la elasticidad, la flexibilidad y la resistencia a la tracción de la piel. Además, proporciona

protección contra daños mecánicos, retención de agua y ayuda en la regulación térmica. La dermis contiene y soporta los receptores de estímulos sensoriales y es un elemento clave en la cicatrización de heridas.

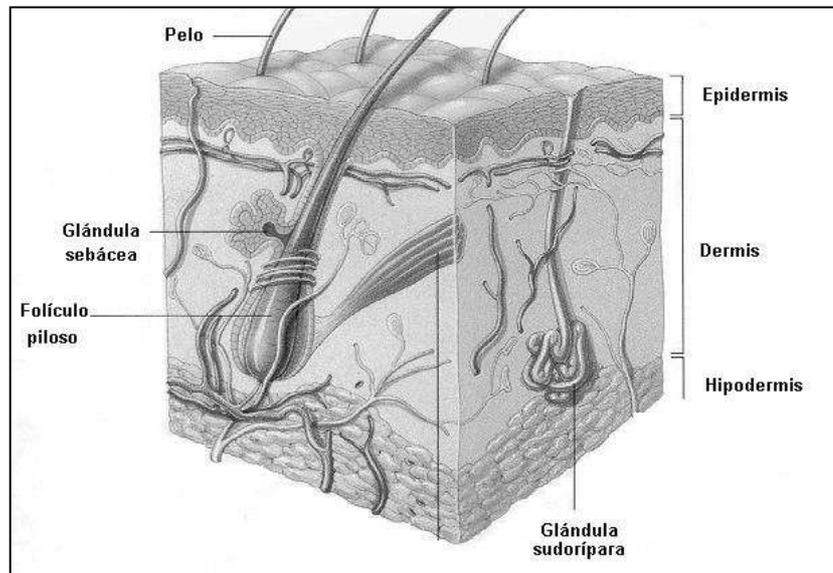


Figura 2. Estructura de la piel.

Hipodermis: está compuesta principalmente de tejido adiposo, que aísla al cuerpo y sirve como una fuente de energía de reserva. Así mismo, amortigua y protege a la piel y es compatible con nervios, vasos sanguíneos y vasos linfáticos (Maibach y Honari 2014).

2.1. Transporte de principios activos a través de la piel

El estrato córneo funciona como una membrana compacta capaz de limitar el proceso de penetración y actúa como una barrera de difusión pasiva. La integridad del estrato córneo y la concentración de fármaco aplicada son aspectos importantes que determinan los perfiles de penetración de los fármacos en la piel. Las rutas pasivas a través de las cuales los fármacos pueden atravesar el estrato córneo son la intercelular, la transcelular y por apéndices (Figura 3) (Beck *et al.* 2011).

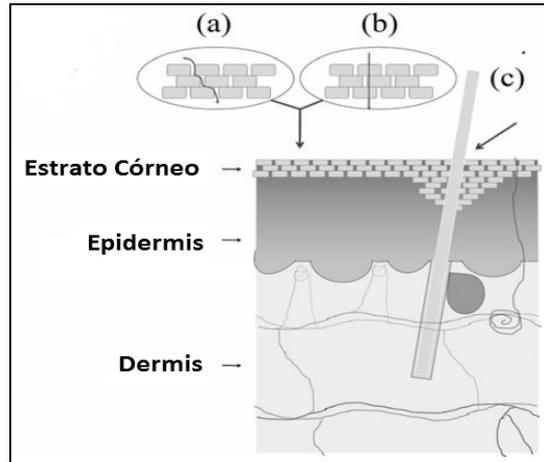


Figura 3. Mecanismos de transporte a través de la piel a) intercelular, b) transcelular y c) por apéndices.

Intercelular: este tipo de transporte se da a través de la solubilización del compuesto activo en los lípidos extracelulares los cuales se encuentran dispuestos estructuralmente en bicapas.

Transcelular: este tipo de transporte se da a través de los corneocitos y las bicapas lipídicas. Dentro de estas últimas, el transporte puede llevarse a través dos vías: vía lipídica (difusión a través de la matriz lipídica) y vía polar (difusión a través de grupos con cabeza polar).

Por apéndices: este tipo de transporte se da a través de las glándulas sudoríparas o folículos pilosos. Estos apéndices representan solo el 0.1 – 1.0% del área superficial de la piel y, en años recientes, ha surgido un interés por el direccionamiento de moléculas a través de estas estructuras, particularmente, el direccionamiento folicular.

2.2. Formulaciones para su administración tópica

El direccionamiento de moléculas a través de la piel se logra mediante la modificación estructural del principio activo o mediante la reformulación del vehículo que lo contiene. La modificación estructural del principio activo incluye la optimización de propiedades fisicoquímicas tales como el tamaño, lipofilicidad y carga. Para la modificación de las formulaciones con principio activo, se ha enfocado en el uso de formas de dosificación basadas en partículas/vesículas, un ejemplo de ello son: las micropartículas, los liposomas y las nanopartículas, entre otros (Benson y Watkinson 2011).

Maheshwari *et al.* realizaron dos formulaciones (etosomas y liposomas) para la liberación transdermal de CLT. Las formulaciones de etosomas y liposomas mostraron un tamaño de partícula de 132 y 121 nm, respectivamente. Durante los estudios de permeación en piel de rata, se determinó el flujo de permeación transdérmico en estado estacionario del CLT y se obtuvieron valores de 56.24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para la formulación de etosomas y de 50.16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para a formulación de liposomas. Los investigadores concluyeron que las formulaciones a base de etosomas poseían mejores propiedades con respecto a la formulación con liposomas, esto al presentar mejor solubilidad, retención y adaptabilidad en las bicapas lipídicas de la piel. Sin embargo, atribuyeron dichas propiedades a la presencia de un solvente en su formulación (etanol). Otro dato importante es que no presentaron estudios que respalden el tiempo de estabilidad de dichas formulaciones (Maheshwari *et al.* 2012).

Por otra parte, Kumari y Kesavan desarrollaron una microemulsión de CLT con una cubierta de quitosano. La microemulsión presentó un tamaño de partícula de 22 nm y una población homogénea. Los resultados obtenidos en los estudios de permeación en piel de rata mostraron que la microemulsión cubierta con quitosano presentaba una liberación controlada uniforme. Además, en los estudios de retención en piel, se observó que la formulación con la capa de quitosano ($\approx 70\mu\text{g}/\text{mg}$), mostró mayor retención en comparación con formulaciones sin esta capa ($\approx 35\mu\text{g}/\text{mg}$), por lo tanto, se atribuyó este

comportamiento a la naturaleza mucoadhesiva del quitosano y a los excelentes puntos de contacto entre la formulación y la carga negativa de la piel (Kumari y Kesavan 2017).

Esposito, *et al.* realizaron una formulación de nanopartículas lipídicas cargadas con CLT que mostraron una distribución bimodal, con una población principal de 120 nm y una menos representativa de 297 nm. Durante los estudios de permeación, realizados sobre una membrana de nylon (poro de 0.2 μm), observaron que los rangos de difusión (49.37 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) eran similares a los obtenidos con una formulación comercial de Canesten® (50.32 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) durante 7 horas. Esta similitud la atribuyeron a la baja viscosidad de las formulaciones, considerada como el factor limitante de la difusión, aún sobre el tipo de nanoestructura. Además, se estableció que la formulación de nanopartículas lipídicas fue más activa contra *Candida albicans* con respecto al fármaco puro, ya que la formulación mostró una disminución del crecimiento de la levadura de hasta un 65.3% con respecto al control. Finalmente, los autores asumieron que esa actividad antifúngica estaba dada por la nanoestructura ya que permite la penetración del CLT a través de las paredes celulares inhibiendo la síntesis del ergosterol (Esposito *et al.* 2013).

3. Productos naturales con actividad antimicrobiana

El empleo de plantas medicinales es parte de una muy difundida tradición empírica en nuestro país que está apoyada en elementos culturales arraigados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce y estimula el gran valor de las plantas medicinales en la atención primaria de millones de personas y considera que el 80% de la población mundial utiliza estos recursos como principal fuente de atención primaria en sus problemas de salud (Álvarez *et al.* 2005). Las plantas contienen compuestos cuya actividad resulta ser favorable para combatir algunos microorganismos como parásitos, bacterias y hongos. Los aceites esenciales son un buen ejemplo de productos naturales que contienen una gama extensa de compuestos que poseen este tipo de actividades biológicas.

3.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos provenientes del material vegetal de una planta (flores, semillas, hojas, frutos, corteza y raíces) (Burt 2004). El total de contenido de aceite esencial en plantas generalmente es muy bajo, menor al 1% (Pengelly 2004).

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de compuestos de bajo peso molecular (normalmente menores de 500 Daltons), mismos que son extraídos por destilación a vapor, hidrodestilación y extracción por solvente (Raut y Karuppayil 2014). Estos contienen aproximadamente 100 compuestos, aunque existen algunos que pueden contener entre 20 y 60. Los compuestos encontrados en los aceites esenciales son de diferente naturaleza química, entre los cuales predominan los terpenos; la mayoría de estos son hidrocarburos, derivados oxigenados y algunos de ellos podrían contener nitrógeno o sulfuro (Thormar 2011).

No obstante, para poder ser utilizados como agentes antimicrobianos aún presentan ciertas limitaciones entre las que se encuentran: i) elevada tasa de degradación y reactividad química de los compuestos presentes, ii) baja solubilidad en agua que limita su aplicación biológica y iii) corto tiempo de bioactividad debido a su carácter volátil (Wattanasatcha *et al.* 2012). Por lo tanto, es necesario utilizar alternativas tecnológicas que protejan al aceite esencial y faciliten su correcta administración sin perder sus propiedades antifúngicas.

Por otra parte, para conocer el potencial terapéutico de los productos naturales, su evaluación microbiológica presenta ciertas limitaciones. Actualmente, no existe un procedimiento establecido de forma general para evaluar la actividad antifúngica de productos naturales contra cepas de hongos dermatofitos. A pesar de los diversos reportes, modificaciones y adaptaciones para la determinación de la actividad antifúngica de productos naturales, es difícil comparar las técnicas o los resultados obtenidos en cada una de ellas debido a la gran variabilidad metodológica aplicada para evaluar este tipo de moléculas activas.

3.2. Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales

Las pruebas de susceptibilidad se realizan con el fin de comparar la actividad inhibitoria de los principios activos contra diferentes cepas de microorganismos y detectar posible resistencia a los mismos. Sin embargo, la evaluación de aceites esenciales como agentes antimicrobianos aún presentan ciertas limitaciones relacionadas principalmente con sus propiedades fisicoquímicas. Para superar estas limitantes, una alternativa es la evaluación antifúngica mediante la técnica *poisoned food*.

Metodología *poisoned food*. Esta técnica consiste en emplear cultivos de cinco días de crecimiento, los cuales son perforados asépticamente con un sacabocados estéril (7 mm de diámetro). Los discos de micelio son puestos en una placa de agar gelificado que ha sido previamente preparada por impregnación a la concentración deseada del activo a 45-50 °C. Las placas son incubadas a 26 °C y el diámetro de la colonia es medido para establecer la inhibición del crecimiento micelial (Das *et al.* 2010).

Marwah *et al.* utilizaron la técnica *poisoned food* para evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Plectranthus cylindraceus*. Se realizaron las evaluaciones con cuatro especies de dermatofitos: *T. rubrum* (ATCC 28188), *T. mentagrophytes* (ATCC 18748), *M. gypseum* (ATCC 24102) y *M. canis* (ATCC 36299). La metodología consistió en mezclar diferentes cantidades del aceite esencial y el agente tensoactivo (polisorbato 20, al 0.01%, p/p) para, posteriormente, ser adicionados al medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA) con Polisorbato a 0.01 %. Las concentraciones del aceite esencial estuvieron en un rango de 125-500 µg/mL. Posteriormente, las placas fueron inoculadas con discos de micelio (con un diámetro de 5 mm) de cultivos de siete días de previo crecimiento. Posterior a tres días, se observó la completa inhibición de las cepas *T. rubrum* (ATCC 28188), *M. gypseum* (ATCC 24102) y *M. canis* (ATCC 36299) a una concentración de 250 µg/mL. La actividad antifúngica del aceite de *P. cylindraceus* se atribuyó a la presencia de carvacrol, un monoterpeno oxigenado que posee un grupo hidroxilo en posición meta, al que se le ha atribuido una actividad bactericida y fungicida de amplio espectro (Marwah *et al.* 2007).

4. Nanoencapsulación de compuestos biológicamente activos

Para ser utilizados como agentes antimicrobianos los aceites esenciales aun presentan ciertas limitantes relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas, tales como su solubilidad, volatilidad, reactividad química y degradación. Por lo tanto, es necesario buscar un vehículo o acarreador que proteja y facilite su administración y posterior liberación en el sitio de acción y, además, sin modificar sus propiedades antimicrobianas.

Debido a esto, surge la necesidad de incorporar dichas moléculas bioactivas en vehículos adecuados que aseguren su entrega al sitio de acción. Los medios convencionales para la administración tópica de principios activos incluyen el uso de vehículos tales como ungüentos, cremas, geles y en años recientes el uso de nanoemulsiones y nanopartículas (Kayser *et al.* 2005; Brown *et al.* 2008).

En años recientes, se ha propuesto el uso de la tecnología de la encapsulación para el diseño de procesos de formulación que mejoren la estabilidad, solubilidad y liberación de compuestos activos utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia (Ponce *et al.* 2010). Un ejemplo de este tipo de tecnologías es la incorporación de activos en sistemas coloidales, entre los que destacan las nanopartículas poliméricas (NP).

4.1. Nanopartículas poliméricas

Estos sistemas coloidales de uso farmacéutico poseen una forma esférica y su tamaño fluctúa en un rango de 1-600 nm. Además, presentan una estructura matricial o capsular polimérica que puede atrapar, encapsular o adsorber fármacos (Figura 4). En estos coloides poliméricos pueden incorporarse diferentes tipos de fármacos de carácter hidrofóbico o hidrofílico y orientarlos hacia un tejido o una célula diana.

Las nanopartículas (NP) pueden prepararse de distintos materiales, tales como proteínas, polisacáridos y polímeros sintéticos. La selección de la matriz de estos materiales es dependiente de algunos factores entre los cuales se encuentran: a) el tamaño requerido de las nanopartículas; b) las propiedades inherentes del fármaco encapsulado, por ejemplo, solubilidad y estabilidad; c) las características superficiales deseadas en la nanopartícula, como carga y permeabilidad; d) el grado de degradabilidad y biocompatibilidad; e) el perfil de liberación del fármaco, f) la antigenicidad del producto final y g) la vía de administración (Mohanraj y Chen 2006).

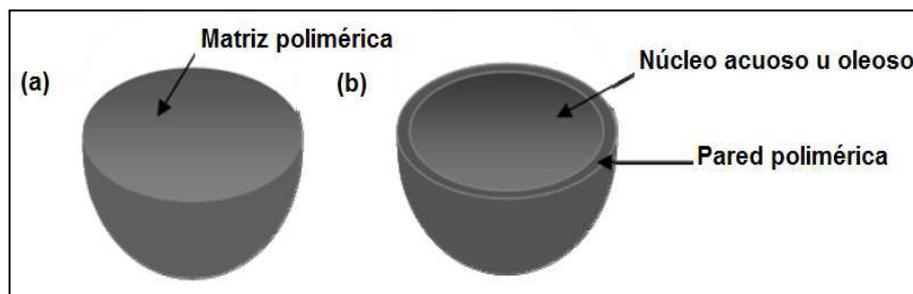


Figura 4. Estructura de las nanopartículas poliméricas: a) matricial y b) capsular.

Una de las técnicas más empleadas para la preparación de NP es la técnica de nanoprecipitación (Figura 5). Esta técnica también es llamada desplazamiento del solvente o deposición interfacial y fue propuesta por Fessi *et al.* (1989).

La técnica de nanoprecipitación consiste en preparar una fase orgánica que contiene un solvente miscible en agua, un polímero (sintético o natural) y el principio activo. Por otra parte, se prepara la fase acuosa que consiste en un solvente (generalmente agua) o una mezcla de ellos suplementados con un surfactante. En el método de nanoprecipitación, las NP son obtenidas como una suspensión coloidal formada a través de la lenta adición de la fase orgánica a la fase acuosa, todo esto a temperatura ambiente y con agitación moderada constante (Fessi *et al.* 1989; Mora-Huertas *et al.* 2010).

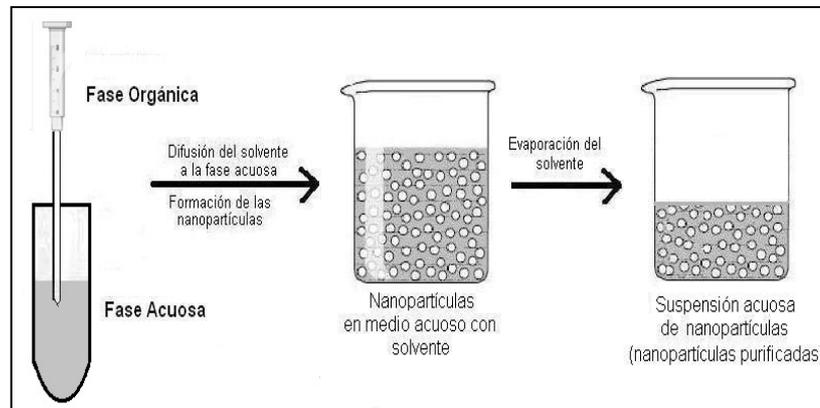


Figura 5. Técnica de nanoprecipitación.

4.2. Incorporación de aceites esenciales en nanopartículas poliméricas

La importancia de la incorporación de aceites esenciales en nanopartículas poliméricas radica en prevenir cambios químicos significativos en el aceite esencial durante su almacenamiento y manipulación. Estos cambios pueden deberse a la elevada volatilidad y descomposición de los componentes del aceite esencial. Los principales factores que influyen en la degradación de los aceites esenciales son: la exposición directa al calor, la humedad y el oxígeno.

La encapsulación de los aceites esenciales aumenta la estabilidad física de los mismos, además de protegerlos de cualquier interacción con el medio ambiente. Por consecuencia, su encapsulación disminuye la volatilidad e incrementa la bioactividad y liberación controlada (Grumezescu 2016).

Flores *et al.* evaluaron la eficacia antifúngica de nanoemulsiones y nanocápsulas que contenían aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* en un modelo de onicomycosis. La evaluación se realizó mediante dos ensayos *in vitro* de uña infectada con *T. rubrum*. Se concluyó que las nanocápsulas mostraron una actividad antifúngica mayor en todos los ensayos, observando un menor crecimiento del hongo por área (mm²) comparado con las nanoemulsiones. El estudio mostró evidencia sobre la importancia del uso de las NP empleadas para mejorar la efectividad de los principios activos (Flores *et al.* 2013). Por

otra parte, Hosseini *et al.* desarrollaron una formulación de NP de quitosano cargadas con aceite esencial de orégano. Las NP presentaron una distribución regular y una forma esférica. Los estudios de liberación *in vitro* de la formulación de nanopartículas mostraron de forma inicial un efecto *burst* (liberación de gran cantidad del activo de forma rápida), seguido de una lenta liberación controlada (Hosseini *et al.* 2013).

5. Evaluación de la permeación y penetración de principios activos en la piel

El objetivo de los estudios de permeación cutánea es entender y/o predecir la liberación y penetración de una molécula activa a través de la superficie de la piel. Los métodos más empleados para el estudio de la permeación cutánea de activos son los métodos *in vitro* e *in vivo*, siendo los primeros los que representan las técnicas más difundidas. Los métodos *in vitro* son aquellos realizados en un ambiente artificial, fuera del cuerpo o del organismo, mientras que, los métodos *in vivo* son aquellos realizados directamente en un organismo vivo (Hadgraft y Guy 1989).

En cuanto a métodos *in vivo*, uno de los más empleados es el método de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), el cual permite calcular directamente el contenido de agua en la piel (Takahashi 2002). Singla *et al.* observaron el efecto de la modulación de un gradiente de calcio sobre la absorción percutánea del ácido nicotínico, un fármaco hidrofílico, en ratas. La espectroscopía de ATR-FTIR fue empleada para determinar los cambios de conformación de los lípidos de la piel. Concluyeron que la modificación en el gradiente de calcio disminuye considerablemente la permeación del ácido nicotínico en la piel de rata (Singla *et al.* 2002).

Uno de los métodos *in vitro* más representativos para obtener información de la interacción fármaco-piel es el método de difusión en celdas de Franz. Desde su desarrollo en 1975, es el principal método utilizado para evaluar la permeación transdérmica de fármacos. Este dispositivo consta de un compartimento receptor, un compartimento donador y una membrana de difusión que se coloca entre los dos

compartimentos (Figura 6). Es importante indicar que como estudio complementario para determinar la progresión de un fármaco a través del estrato córneo es primordial la información obtenida con la técnica de *tape stripping* (Villarino y Landoni 2006; Pareja 2004; Faulí 1995). Los datos obtenidos con ambas técnicas son determinantes para elucidar la capacidad de penetración-permeación de un fármaco en la piel.

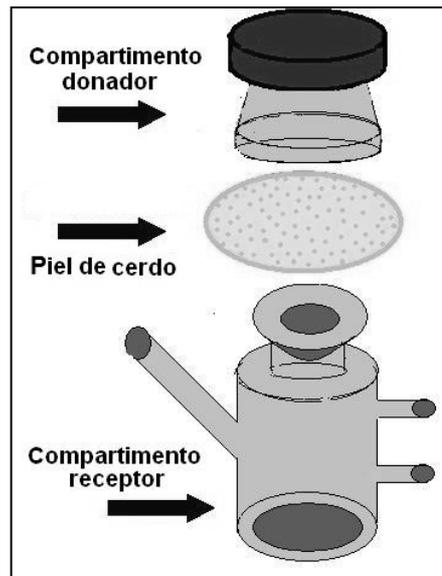


Figura 6. Celda de Franz modificada empleada para la determinación de estudios de permeación transdérmica en piel de cerdo.

En los métodos *in vitro* se utilizan, tanto piel animal o humana, como membranas artificiales (piel artificial). Tomando en cuenta la limitada disponibilidad de obtener piel humana, aunado a la creciente necesidad de evaluar productos dérmicos (farmacéuticos o cosméticos), se ha promovido la búsqueda de modelos alternativos de evaluación tópica. Algunas especies actualmente en uso son el ratón, la rata calva, el hámster, la víbora, el cerdo y la vaca. Sin embargo, las diferencias en el espesor del estrato córneo, el número de capas de corneocitos, la densidad del pelo, el contenido de agua, el perfil de lípidos y la morfología hacen que la piel animal sea más permeable que la humana. No obstante, al comparar los resultados de varias especies, la piel humana encuentra una mayor similitud con el tejido de la piel de cerdo (Ehrhardt y Kim 2008; Schmook *et al.* 2001).

IV. JUSTIFICACIÓN

En México, las micosis superficiales constituyen del 70 al 80% de todas las micosis y afectan al 10% de la población. El tratamiento convencional de las micosis superficiales consiste en fármacos tipo azol. Aunque este grupo de antimicóticos tienen un amplio espectro de acción, la limitante más importante que presentan es su pobre penetración en los tejidos afectados, además de la posible aparición de cepas de dermatofitos farmacorresistentes. El empleo de plantas medicinales es una práctica muy difundida en México, ya que se ha reportado que las plantas contienen principios activos cuya actividad resulta ser favorable para combatir algunos microorganismos, como los hongos. Por otra parte, se han desarrollado nuevos sistemas de administración, liberación y direccionamiento controlado de principios activos. En particular, las nanopartículas poliméricas han sido propuestas como vectores farmacéuticos de principios activos debido a que presentan algunas ventajas remarcables, entre las que destacan, la protección que brindan al principio activo y su capacidad para controlar la liberación del activo de forma efectiva dentro del rango terapéutico deseado. En este contexto, en el presente trabajo se propone la encapsulación de principios activos provenientes de plantas en nanopartículas biodegradables. Estos vectores podrían funcionar como excelentes reservorios del principio activo, ya que se ha reportado que son capaces de favorecer la residencia y la penetración de moléculas en las diferentes capas de la piel y con ello optimizar su efecto terapéutico. Considerando los principios activos provenientes de plantas y el empleo de las nanopartículas, ambos podrían ser utilizados en conjunto como una posible alternativa para mejorar el tratamiento de las micosis superficiales.

V. HIPÓTESIS

Las nanopartículas biodegradables sirven como reservorio de los aceites esenciales a fin de aumentar su retención y penetración como una posible alternativa para mejorar el tratamiento de las micosis superficiales.

VI. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar formulaciones de NP biodegradables con aceites esenciales y evaluar tanto su actividad antimicótica *in vitro*, como su nivel de penetración en piel de cerdo a fin de obtener una posible alternativa para mejorar el tratamiento de las micosis superficiales.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los aceites esenciales de *Magnolia grandiflora*, *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* por el método de hidrodestilación y realizar su caracterización física en función de su índice de refracción, actividad óptica y densidad relativa.
- Caracterizar químicamente los aceites esenciales por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas y Cromatografía de Gases con Detector de Ionización a la Flama (FID) para determinar los compuestos huella presentes.
- Estandarizar la técnica de nanoprecipitación para obtener nanopartículas biodegradables de ≈ 200 nm cargadas con los aceites esenciales y caracterizar las formulaciones en función de su tamaño, índice de polidispersidad y contenido de compuestos activos.
- Evaluar la actividad antimicótica de los aceites esenciales libres y encapsulados contra cepas de hongos dermatofitos (*Tricophytum rubrum*, *Microsporum canis*, y *Epidermophyton floccosum*).
- Evaluar el nivel de penetración en piel de cerdo de los aceites esenciales, de forma libre e incorporado en las nanopartículas, a través de un estudio *in vitro* de permeación.
- Evaluar la citotoxicidad de los aceites esenciales, de forma libre e incorporados en las nanopartículas, en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT.

CAPÍTULO 1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCÁPSULAS BIODEGRADABLES CON TRES ACEITES ESENCIALES Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN LA LÍNEA CELULAR HaCaT

RESUMEN

Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* y *Magnolia grandiflora*, han sido utilizados como agentes con actividad biológica. Estos aceites esenciales fueron incorporados en nanocápsulas poliméricas y se evaluó su efecto citotóxico, en la línea celular HaCaT. Como resultado, se obtuvieron tres formulaciones de nanocápsulas, una para cada aceite esencial incorporado, y presentaron un diámetro de ≈ 200 nm. Las formulaciones fueron estables por un periodo de 3 meses. Los estudios de citotoxicidad mostraron valores de IC₅₀ de 51.03, 117.63 y > 200 $\mu\text{g/mL}$, para los aceites esenciales de *O. vulgare*, *T. vulgaris* y *M. grandiflora*, respectivamente, y de 53.21, >120 y >200 $\mu\text{g/mL}$, para sus respectivas formulaciones de nanocápsulas. La incorporación de aceites esenciales en nanocápsulas, disminuyó su efecto citotóxico, lo cual puede deberse a que las nanocápsulas se comportaron como un reservorio de los mismos. Se obtuvieron formulaciones de nanocápsulas cargadas con aceites esenciales con un elevado potencial para ser administradas de forma segura en el tratamiento de infecciones tópicas.

INTRODUCCIÓN

La piel es la barrera primaria entre el medio ambiente interno y externo; además, provee una protección contra microorganismos y daños químico, mecánico y ambiental (Vaughn *et al.* 2015). Así mismo, la piel humana proporciona una barrera efectiva para la permeación de un gran número de principios activos, siendo el estrato córneo (capa más superficial) la barrera principal de los activos tópicos aplicados (Williams y Barry 1989). Por otro lado, prolongar la residencia y/o acumulación de principios activos en la

superficie de la piel, resulta interesante para efecto de deposición tópica de activos, sin los efectos colaterales que se dan en la aplicación sistémica. Se ha propuesto el uso de nanopartículas (NP) como vehículos tópicos, para favorecer la residencia de activos en el estrato córneo (Sahle *et al.* 2017; Balzus *et al.* 2017).

Previamente, se reportó que NP \approx 200 nm depositadas en la superficie del estrato córneo son incapaces de penetrarlo. Álvarez-Román *et al.* determinaron la distribución de NP (20-200 nm) no biodegradables, fluorescentes a base de poliestireno a través de piel de cerdo. Las formulaciones se administraron sobre la piel de cerdo y se observó su distribución en las estructuras de la piel a tres diferentes tiempos: 0.5, 1 y 2 horas. Se estableció que la acumulación de las NP era preferencialmente en las aberturas foliculares y que esta distribución aumentaba de manera tiempo-dependiente. Además, se concluyó que las NP no eran capaces de penetrar más allá del estrato córneo (Alvarez-Román *et al.* 2010). Por otra parte, Wu *et al.* estudiaron la deposición de tres formulaciones de NP \approx 100 nm en piel de cerdo: a) poliestireno amino-funcionalizado PS-NH₃⁺ (catiónicas), b) poliestireno carboxil-funcionalizado PS-CO₂ (aniónicas) y c) poli-(L-láctico) PLL⁻ (aniónicas). Se estableció que las NP catiónicas se depositaban y concentraban en la superficie del estrato córneo, mientras que las dos formulaciones aniónicas, solo presentaron poca evidencia de su retención en la superficie de la piel. Además, las formulaciones de NP no presentaron una penetración más allá de la superficie del estrato córneo. Se concluyó que las NP cargadas superficialmente ofrecen una ventaja para la liberación de compuestos activos en el estrato córneo (Wu *et al.* 2010).

A pesar de que numerosos estudios han demostrado el potencial de las NP como acarreadores tópicos de activos, no se han establecido estudios sistemáticos para evaluar la toxicidad de estas NP en la piel (Robbens *et al.* 2010). Kuskov *et al.* evaluaron la citotoxicidad de una formulación de NP a base del polímero poly-*N*-vinilpirrolidona contra una línea celular derivada de cáncer de mama (MCF-7). Se estableció que el empleo del polímero poly-*N*-vinilpirrolidona como formador de NP, permite la obtención de formulaciones no citotóxicas y con un gran potencial para ser aplicadas de

forma segura como sistemas de liberación de fármacos (Kuskov *et al.* 2016). Así mismo, Facchi *et al.* evaluaron una formulación de NP a base de quitosano-*N*-modificado cargadas con curcumina contra dos líneas celulares: una línea celular sana derivada de mono verde africano (VERO) y una línea celular de cáncer cervical (SiHa). Los estudios de citotoxicidad indicaron que la cantidad de curcumina, ya sea dispersada y/o encapsulada en las NP, podría incrementar su biocompatibilidad hacia las células VERO y, al mismo tiempo, podría aumentar ligeramente la citotoxicidad en la línea celular SiHa (Facchi *et al.* 2016).

Por otro lado, el modelo de células de queratinocitos humanos HaCaT con determinación colorimétrica MTT ha sido propuesto para la evaluación de efectos citotóxicos de metales (Ermolli *et al.* 2010), polímeros (Kucekova *et al.* 2014) y tensoactivos (Sanchez *et al.* 2006a). Este modelo de HaCaT se realiza con queratinocitos de origen humano y posee características similares de crecimiento y diferenciación celular (Ryle *et al.* 1989). Hasta el momento no se han realizado estudios de toxicidad de NP utilizando esta línea celular. Establecer la ausencia de toxicidad en queratinocitos es crucial para la aplicación de NP como vehículo de principios activos tópicos (Abu-Darwish *et al.* 2013).

En años recientes, ha sido evidenciada la actividad biológica de aceites esenciales provenientes de plantas (Grecco Sdos *et al.* 2014). Específicamente, se ha comprobado que los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* y *Magnolia grandiflora* presentan importantes actividades biológicas, entre las que destacan la antibacteriana, la antifúngica y la antioxidante, entre otras (Vági *et al.* 2005; Bozin *et al.* 2006; Dorman y Deans 2000; Aazza *et al.* 2014; Guerra-Boone *et al.* 2013). Actualmente, para su uso como agentes terapéuticos, se ha propuesto su incorporación en formulaciones de NP con la finalidad de superar ciertas limitantes relacionadas con la elevada degradación o reactividad química de sus componentes, su limitada solubilidad en agua y su corto tiempo de disponibilidad como activos biológicos debido a su volatilidad (Wattanasatcha *et al.* 2012). De Oliveira *et al.* desarrollaron una formulación para la incorporación del aceite esencial de *Lippia sidoides* en NP de alginato y goma de

anacardo. Se obtuvieron partículas de 223-399 nm, con una eficiencia de encapsulación por encima del 55 %. Finalmente, los perfiles de liberación de las formulaciones indicaron que las NP son un sistema de liberación potencial con una tasa de liberación adecuada. Se concluyó que la formulación de NP posee interesantes propiedades y un gran potencial para ser usada como un larvicida contra el mosquito *A. aegypti* (De Oliveira *et al.* 2014).

En relación a su toxicidad, existen reportes en los cuales se evalúa la toxicidad de aceites esenciales para ser administrados de forma tópica y segura. Park *et al.* evaluaron dos de los componentes fenólicos mayoritarios presentes en *Magnolia sp.*, el magnolol y el honokiol. El efecto citotóxico de ambos compuestos fue determinado por MTT en la línea celular HaCaT. Se estableció una toxicidad menor al 30% con el magnolol a una concentración menor a 10 µg/mL. Por su parte, el honokiol presentó una citotoxicidad de 52% a una concentración de 5 µg/mL. Se concluyó que ambos compuestos poseen relativamente bajos efectos citotóxicos y, además, se sugirió la posibilidad de incluirlos de forma segura como agentes tópicos para el tratamiento del acné (Park *et al.* 2004). Cabral *et al.* evaluaron la citotoxicidad del aceite de *Juniperus communis* subsp. *alpina* (Suter) Čelak en queratinocitos HaCaT a través del ensayo de MTT. La evaluación de la viabilidad celular no mostró una citotoxicidad significativa en las células HaCaT en un rango de concentraciones entre 0.32 y 0.65 µL/mL. Se concluyó que es posible determinar la dosis del aceite esencial de *J. communis* subsp. *alpina* con un bajo efecto perjudicial en queratinocitos, además se propuso que los aceites esenciales podrían ser útiles en estudios clínicos (Cabral *et al.* 2012). En este contexto, el objetivo del presente estudio fue establecer el efecto citotóxico de los aceites esenciales de *T. vulgaris*, *O. vulgare* y *M. grandiflora*, libres e incorporados en formulación de NP, contra una línea celular de queratinocitos humanos HaCaT para determinar su potencial uso en formulaciones tópicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y caracterización de los aceites esenciales. Los aceites esenciales de *T. vulgaris* (AE-Tv), *O. vulgare* (AE-Ov) y *M. grandiflora* (AE-Mg) se obtuvieron por hidrodestilación en un equipo Clevenger durante 4 h. El aceite esencial recuperado se almacenó protegido de la luz a -4°C.

Cromatografía de Gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases con detección de ionización de flama (CG-FID) (Clarus 480 GC, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) con una columna capilar Elite-5 (30m x 0.32mm x 0.25µm). Para el AE-Tv y el AE-Ov se preparó una curva de calibración a partir de soluciones patrón de tres estándares: o-cimeno, γ -terpineno y timol y se utilizó el 4-alilanol como estándar interno (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Los tres compuestos fueron seleccionados por ser componentes mayoritarios en los AE-Tv y AE-Ov. El programa de temperatura empleado fue: 50 °C incrementando 6 °C/min hasta 117 °C por 3 min y después incrementar de 45 °C/min hasta 289 °C por 1 min. Para el AE-Mg, se utilizaron los estándares β -pineno, camfor y bornil acetato, utilizando el mismo estándar interno. El programa de temperatura empleado fue: 60 °C por 20 min y después se incrementó 11 °C/min hasta 280 °C por 1 min. Para los tres aceites esenciales, la temperatura del inyector y detector fue de 250 °C. El flujo del gas acarreador (helio 99.999% de pureza) fue de 2 mL/min y la proporción del *Split* 1:05.

Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas (CG-EM). Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N (St. Clara, CA, USA), con una columna (30 m x 0.25mm x 0.2) y acoplado a un espectrómetro de masas selectivo, 5973 INERT (HP5MS). La temperatura de la fuente de ionización fue 230 °C, la temperatura del cuadrupolo fue de 150 °C y la temperatura del inyector 220 °C. Para cada corrida, el programa de temperatura del horno del CG fue: 35 °C por 9 min, incrementando 3 °C /min hasta 150 °C por 10 min; después se incrementó 10 °C /min hasta 250 °C y, finalmente, se incrementó 3 °C /min hasta 270 °C por 10 min. El flujo del gas acarreador (helio, 99.999% de pureza) fue de 2 mL/min. La energía de ionización fue de 70 eV. Las

muestras fueron inyectadas en modo *splitless*. El volumen de inyección de cada muestra fue de 2 μ L de cada solución de aceite esencial a una concentración de 2 mg/mL en diclorometano. El EM fue empleado en modo de barrido. Los componentes de los aceites esenciales fueron identificados por comparación de sus índices de retención relativos con los *n* alcanos C8–C20 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) y por comparación de su espectro de masas con los datos de referencia de la librería *US National Institute of Standards and Technology* (NIST) (Adams 2001).

Obtención y caracterización de las nanocápsulas con aceite esencial incorporado. Para la obtención de las nanocápsulas (NC) cargadas con los aceites esenciales se utilizó la técnica de nanoprecipitación propuesta por Fessi *et al.* (1989). Esta técnica consiste en incorporar, en agitación constante, una fase orgánica que contiene el polímero biodegradable ϵ - policaprolactona (PCL) (PM: 10 000, Fluka, Saint Quentin Fallavier, FR) y 18 mg del aceite esencial a una fase acuosa con un agente tensoactivo Lutrol F127 NF (Mississauga, CA). La suspensión de NC obtenida se sometió a diálisis por 3 h a temperatura ambiente y se utilizó una membrana de celulosa regenerada Spectra-Por (California, USA). Una vez obtenidas las NC se caracterizaron en función de su tamaño e índice de polidispersidad (IP) y densidad de carga superficial (Ψ_z) por espectroscopía de correlación fotónica (Zeta Nano ZS90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Finalmente, la estabilidad de las formulaciones de NC fue determinada mediante el monitoreo del tamaño de partícula a través del tiempo. Las formulaciones de NC fueron almacenadas a temperatura ambiente, en obscuridad y las lecturas se realizaron semanalmente durante 12 semanas.

Eficiencia de encapsulación. El porcentaje de eficiencia de encapsulación del aceite esencial se determinó de forma directa. La solución dializada de NC fue centrifugada a $55228 \times g$ por 2.5 h (Allegra 64R Centrifuge, Beckman-Coulter, EE.UU.). El paquete obtenido de NC fue desecado con Na_2SO_4 anhidro (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) y el contenido de aceite esencial se extrajo con metanol. El contenido de aceite esencial incorporado en las NC fue cuantificado por CG-FID empleando las condiciones cromatográficas antes mencionadas. Posteriormente, la eficiencia de encapsulación del

aceite esencial, se determinó en base a: $[(T - t) / T] \times 100$, en donde T es la cantidad total de aceite esencial presente en la fase orgánica y t es la cantidad de aceite esencial no encapsulado.

Cultivo celular. Queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT fueron cultivados en medio DMEM (4.5 g/L glucosa) suplementado con 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomina a 37°C, 5% CO₂. Las células HaCaT fueron cultivadas periódicamente en frascos de cultivo de 75 cm² (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) y tripsinizadas usando tripsina-EDTA cuando las células alcanzaran aproximadamente un 80 % de confluencia. La línea celular fue obtenida de Eucellbank (*Universitat de Barcelona*, España). El medio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM), el medio RPMI 1640, el suero fetal bovino (SFB), la solución L-glutamina (200 mM), solución tripsina-EDTA (170,000 U/L trypsin and 0.2 g/L EDTA) y la solución penicilina-estreptomina (10,000 U/mL penicillin and 10,000 U/mL streptomycin) fueron comprados en Lonza (Verviers, Belgium).

Ensayo de MTT. El ensayo de MTT (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-bromuro de tetrazolio) está basado en el protocolo descrito por primera vez por Mossmann (1983). En este ensayo, las células vivas reducen la sal de tetrazolio en insolubles cristales púrpura de formazán. Después de 24 h de exposición de los diferentes tratamientos en las células HaCaT (AE-Tv, AE-Ov, AE-Mg, AE-Tv, NC-Ov, NC-Mg y NP sin aceite esencial) fue removido el tratamiento contenido en el medio. Después, se adicionó a cada pozo 100 µL de MTT, diluido 1:10 en PBS (5 mg/mL) en medio libre de SFB y rojo fenol. Una vez que las placas fueron incubadas por 3 h, el medio les fue removido. Los productos púrpura de formazán fueron disueltos mediante la adición de 100 µL de DMSO (Sigma-Aldrich) a cada pozo. Las placas fueron agitadas por 10 min en un agitador de microplacas a temperatura ambiente y la absorbancia resultante de cada una de las soluciones fue leída a 550 nm usando un lector de microplaca Bio-Rad 550. La viabilidad celular fue calculada como el porcentaje de la reducción de sal de tetrazolio por las células viables en cada muestra contra un control celular no tratado (células solo con medio de cultivo).

Ensayo de captación del rojo neutro. Basado en el protocolo descrito por Borenfreund y Puerner (1985), el ensayo de captación del rojo neutro (CRN) se llevó a cabo siguiendo la exposición de las células a los mismos tratamientos usados en el ensayo de MTT. Las células HaCaT fueron incubadas 3 h con una solución del colorante RN (50 µg/mL) disuelto en medio libre de SFB y rojo fenol. Después las células fueron lavadas con PBS y para la extracción del colorante, se adicionaron 100 µL de una solución que contenía 50 % (v/v) de etanol absoluto y 1 % (v/v) de ácido acético en agua destilada. Las placas fueron agitadas por 10 min hasta la completa disolución del colorante. La absorbancia de la solución fue leída a 550 nm usando un lector de placas Bio-Rad 550. El efecto de cada tratamiento fue calculado como el porcentaje de captación del colorante RN (rojo neutro) por los lisosomas contra un control celular no tratado (células solo con medio de cultivo).

Ensayo de fototoxicidad. Este ensayo se realizó usando la línea celular HaCaT como modelo *in vitro* de predicción de fototoxicidad cutánea. La línea celular HaCaT fue cultivada por 24 h hasta la formación de monocapas. Dos placas de 96-pocillos fueron pre-incubadas durante 1 h con seis duplicados de AE-Ov, AE-Tv, AE-Mg, NC-Tv, NC-Ov y NC-Mg a dos diferentes concentraciones en medio libre de SFB y rojo fenol. Tomando como referencia resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, una placa de cada tratamiento fue expuesta a una dosis de luz UVA (2.5 J/cm²), mientras tanto la otra placa se almacenó en oscuridad. La irradiación UVA se obtuvo usando una lámpara L-D 15 W/10 UVA (Royal Philips Electronics, The Netherlands), con un rango de espectro de 315-400 nm. Posteriormente, el tratamiento presente en cada uno de los pocillos fue reemplazado con medio de cultivo y, después de 24 h, la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de CRN. La CRN es determinada después de 3 h de incubación a 550 nm usando un lector de microplaca BioRad 550. La viabilidad celular obtenida con cada muestra fue comparada con los controles no tratados (no irradiados) y el porcentaje de inhibición fue calculado. Para predecir el potencial citotóxico, es necesario comparar la viabilidad celular obtenida en presencia y ausencia de radiación UVA.

Determinación de Interleucina-1 α . De forma inicial fue necesario poner en contacto las células con los tratamientos (AE-Ov y NC-Ov). Después de esta exposición, el medio se recuperó, se centrifugó y se usó para la determinación de la IL-1 α extracelular (IL-1 α liberada). Posteriormente, las monocapas de queratinocitos fueron lavadas con PBS, después lisadas en 300 μ L de Tritón X-100 en PBS al 0.5 % (v/v) y la solución resultante fue centrifugada y usada para la determinación de la IL-1 α intracelular (IL-1 α asociada a la célula). Ambas IL-1 α liberada y asociada a la célula fueron determinadas usando un kit ELISA IL-1 α siguiendo las instrucciones del fabricante (Diaclone Research, France).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación y caracterización de las nanocápsulas con aceites esenciales

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica de las formulaciones con los aceites esenciales incorporados: NC-Tv, NC-Ov y NC-Mg. Se observó un diámetro de partícula \approx 200 nm, previamente ha sido reportado que NP de \approx 130 nm no son capaces de penetrar la piel y además se concentran principalmente en folículos pilosos y en tejido cerca de estos (Shim *et al.* 2004).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las formulaciones de NC con aceites esenciales incorporados (media \pm DE; n=3).

Característica fisicoquímica	Determinación		
	NC-Tv	NC-Ov	NC-Mg
Diámetro de partícula	172.3 \pm 3.9	168.8 \pm 3.7	173.2 \pm 8.1
Polidispersidad	0.097 \pm 0.02	0.135 \pm 0.01	0.123 \pm 0.03
Potencial Z (mV)	-8.06	-5.00	-7.65

Las formulaciones de NC presentaron un IP menor a 0.13 lo que indica una distribución homogénea de las poblaciones de NC presentes en cada una de las formulaciones. Con respecto a la evaluación del Ψ_z , las estructuras coloidales mostraron valores negativos,

esto es consistente con la naturaleza aniónica del polímero (Mattu *et al.* 2013). Resultados similares han sido descritos en literatura con NC de PCL cargadas con 3-benzofenona (protector solar), demostrando que es posible la deposición del protector solar en la superficie de la piel por un tiempo prolongado (Marcato *et al.* 2011).

Porcentaje de eficiencia de encapsulación de los aceites esenciales

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la determinación del porcentaje de encapsulación de los aceites esenciales incorporados en las NC. La eficiencia de encapsulación fue relativamente baja, considerando que la técnica de nanoprecipitación permite elevadas eficiencias de encapsulación de principios activos, hasta un 70 % de eficiencia de encapsulación (Mora-Huertas *et al.* 2011). Sin embargo, tomando en cuenta la naturaleza de nuestras muestras (aceites esenciales), los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Hosseini, *et al.* en donde desarrollaron una formulación de nanopartículas de quitosano cargadas con aceite esencial de orégano. En dicho estudio se estableció un porcentaje de eficiencia de encapsulación en un rango de 5.45% a 24.72% (Hosseini *et al.* 2013).

Tabla 2. Porcentaje de eficiencia de encapsulación de aceite esencial incorporado en las formulaciones de NC (media \pm DE; n=3).

Compuesto	Eficiencia de encapsulación (%)		
	NC-Tv	NC-Ov	NC-Mg
o-cimeno	99.9 \pm 5.9	–	–
γ -terpineno	13.7 \pm 2.3	26.1 \pm 6.2	–
Timol	17.3 \pm 1.2	25.9 \pm 2.8	–
β -pineno	–	–	14.8 \pm 0.9
Camfor	–	–	7.9 \pm 0.6
Bornil acetato	–	–	14.5 \pm 0.9

Estabilidad física

En la Figura 1 se muestra el diámetro de las tres formulaciones de NC cargadas con aceite esencial, el cual fue monitoreado durante 12 semanas. Se observó que el diámetro de las partículas no presentó variaciones significativas (*t de Student* 's $p < 0.05$) durante el tiempo de evaluación, por lo que se puede decir que las tres formulaciones son estables físicamente por al menos 12 semanas. Es importante mencionar que existen diferentes factores que pueden afectar la estabilidad de los sistemas nanoencapsulados (i.e. composición polimérica y condiciones de almacenamiento). La estabilidad de las NC está directamente relacionada con la cristalinidad, hidrofobicidad y tasa de degradación del polímero formador. En otras palabras, polímeros con elevada cristalinidad e hidrofobicidad pueden presentar tasas de degradación mas lentas (Lemoine *et al.* 1996). Específicamente, la PCL (polímero formador de NC) es semi-cristalina, hidrofóbica y presenta una tasa de degradación lenta, lo cual favorece la estabilidad de las NC cargadas con los tres aceites esenciales.

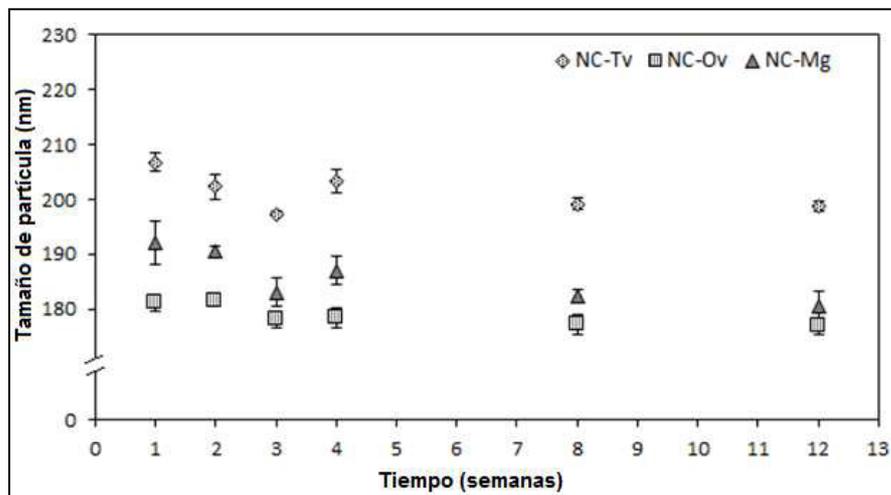


Figura 1. Estabilidad coloidal de las formulaciones de NC con aceite esencial incorporado (media \pm DE; n=3).

Determinación de la citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad celular se encuentran entre los bioensayos más comúnmente usados para predecir la toxicidad de principios activos en diversos tejidos (Sanchez *et al.* 2004). El ensayo de MTT permite la medición de la actividad metabólica celular a través del compartimento mitocondrial. Por otra parte, el ensayo de CRN mide la integridad de la membrana, a través de la difusión del colorante RN en la membrana celular intacta para ser acumulado dentro de los lisosomas (Marquis *et al.* 2009). En la Figura 2 se muestran los resultados para la determinación de la citotoxicidad a) mediante MTT y b) mediante CRN, tanto para los aceites esenciales libres como incorporados en las NC. En el ensayo de MTT, se observa que para el caso de AE-Mg (Fig. 2aA), la viabilidad celular es mayor al 80 % con concentraciones entre 12.5-200 $\mu\text{g/mL}$. Para AE-Tv (Figura 2aB), la viabilidad celular disminuye a 40 % con la mayor concentración evaluada (120 $\mu\text{g/mL}$). Se observa un efecto dosis dependiente, donde a medida que se aumenta la concentración de aceite esencial, hay una disminución en el porcentaje de viabilidad celular. En el caso de AE-Ov (Figura 2aC), la viabilidad se ve disminuida hasta un 10% cuando se utiliza 100 $\mu\text{g/mL}$, además se observó el mismo efecto dosis dependiente. Cuando los aceites son encapsulados en formulaciones de NC, se observó que en el caso de NC-Mg y NC-Tv (Figura 2aA,B), la viabilidad celular es favorecida, llega a ser de 100% en el rango de concentraciones de 12.5-200 $\mu\text{g/mL}$. Este comportamiento fue más evidente para el AE-Tv, en donde la encapsulación mejora la viabilidad celular hasta en un 50%. En el caso de NC-Ov (Figura 2aC), la viabilidad celular disminuye a 24 % con la mayor concentración evaluada (100 $\mu\text{g/mL}$). En otras palabras, la encapsulación del aceite tiene un menor efecto sobre la viabilidad celular, conservando la relación inversamente proporcional, a mayor concentración de NC-Ov, menor será la viabilidad celular. En la prueba de CRN (Figura b), se confirma este comportamiento para el AE-Ov (Figura 2bC) de forma libre y encapsulado NC-Ov (Figura 2bC). Sin embargo, la viabilidad celular aumenta en un 50% cuando el aceite se encuentra incorporado en NC (NC-Ov), esto a la mayor concentración evaluada (100 $\mu\text{g/mL}$). Con respecto a este mismo ensayo (CRN), para AE-Mg y AE-Tv (Figura 2bA,B), la viabilidad celular que presentaron fue de 30-40%. Por último, para las

formulaciones de NC-Mg y NC-Tv (Figuras 2bA, 2bB), al igual que en el ensayo de MTT, nuevamente la viabilidad celular se ve favorecida al permanecer constante en un rango de 80-100 % para las cinco concentraciones evaluadas.

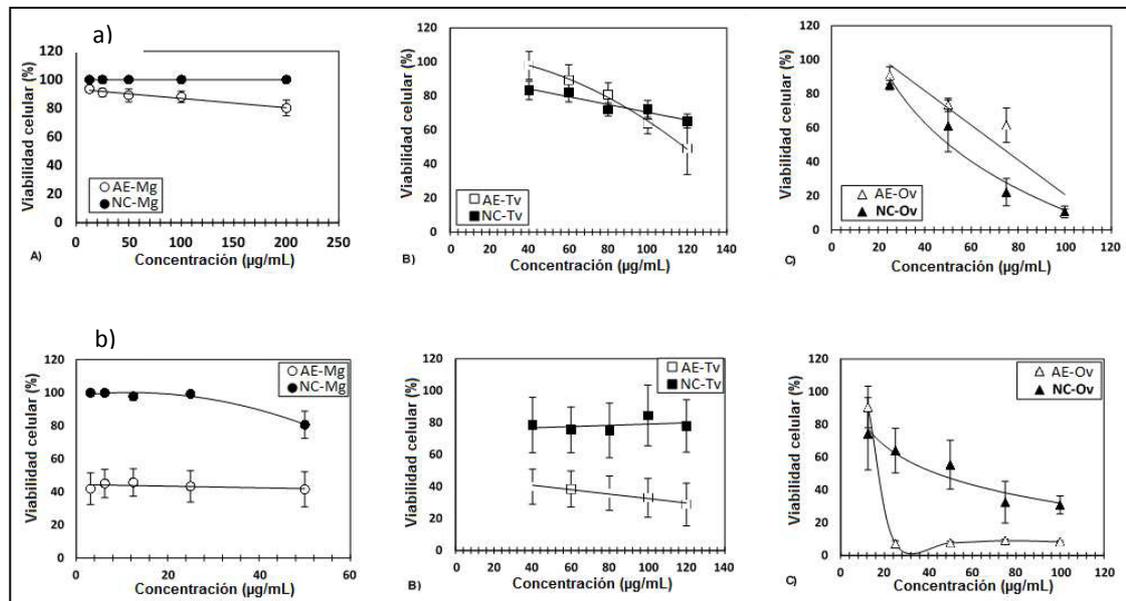


Figura 2. Ensayo de viabilidad celular, MTT (a) y CRN (b) para los aceites esenciales Ov, Tv, Mg (AE) libres e incorporados en (NC) sobre las tasas de supervivencia de la línea celular HaCaT (media \pm DE; n=3).

Es posible que los aceites esenciales tengan un efecto citotóxico debido a su composición química. Se sabe que tanto el AE-Tv como el AE-Ov, están conformados por compuestos de diferente naturaleza química, entre los que destacan monoterpenos y sesquiterpenos alifáticos y oxigenados. Además, para ambos aceites los componentes mayoritarios son: o-cimeno, γ -terpineno y timol (Velázquez-Dávila *et al.* 2017). Sertel, *et al.* determinaron la citotoxicidad de aceite de *T. vulgaris* (de 0.54 µg/mL hasta 18 mg/mL) en una línea celular de carcinoma UMSSCI. Se atribuyó el efecto citotóxico principalmente al timol. Además, también se consideró que dicho efecto puede ser favorecido por la presencia de otros componentes del aceite esencial en bajos porcentajes (Sertel *et al.* 2011). Por lo tanto, es importante tomar en cuenta que el timol está presente de forma abundante en ambos aceites esenciales. Los resultados del ensayo de MTT sugieren, específicamente, que tanto el AE-Tv como el AE-Ov interactúan de forma temprana con el compartimento mitocondrial, por consecuencia afectan la

actividad metabólica celular, específicamente su capacidad de supervivencia y proliferación celular.

Por su parte, el ensayo de CRN indica que la membrana plasmática es afectada en menor grado (Nogueira *et al.* 2013). Los valores de viabilidad celular fueron favorecidos cuando los aceites esenciales se encontraban incorporados en las NC. Existen reportes que indican que la incorporación de activos en las NP, permite una liberación controlada del principio activo (Ephrem *et al.* 2014). De esta forma, es posible que la liberación controlada de los componentes presentes en los aceites esenciales, pudieran estar siendo liberados paulatinamente a concentraciones no tóxicas durante el tiempo de contacto con la línea celular HaCaT. De esta forma se puede decir que las NC modulan la liberación del compuesto tóxico encapsulado, disminuyendo su disposición. Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, los efectos citotóxicos que presentaron estas formulaciones de NC pudieran deberse a la presencia de timol incorporado en las mismas (Tabla 2). Cabe mencionar que la formulación de NC-Ov fue la que presentó porcentajes de viabilidad más bajos para ambos ensayos (MTT y CRN) con respecto a la formulación NC-Tv. Esto puede estar relacionado con la cantidad de timol presente en la formulación, ya que de forma inicial en su composición el AE-Ov presenta una mayor cantidad de timol (79 %) con respecto al AE-Tv (43 %).

El potencial citotóxico de los aceites esenciales tanto libres como los incorporados en las NC fue evaluado mediante el ensayo de MTT en la línea celular HaCaT. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos, en donde, el AE-Ov y el AE-Tv presentan valores de IC₅₀ de 51.03 y 117.63 µg/mL respectivamente, cuando estos son expuestos de forma libre a la línea celular HaCaT. Estos valores coinciden con los de Özkan *et al.* quienes determinaron una IC₅₀ de 53.09 µg/mL para el compuesto timol y 149.12 g/mL para el aceite esencial de *Origanum onites* (Lamiaceae), esto fue evaluado en una línea celular de hepática HepG2. Se estableció que el aceite esencial resultó menos tóxico que el timol (componente del aceite esencial) por sí mismo (Özkan y Erdoğan 2011). Esto coincide con lo mencionado anteriormente, en donde el AE-Ov, con respecto al AE-Tv, presenta un porcentaje muy elevado de timol en su composición química. Los valores

IC₅₀ se ven favorecidos al incorporar los aceites en NC presentando 53.21 y >120 µg/mL respectivamente. Respecto al AE-Mg, este no presentó una diferencia en sus valores de IC₅₀ cuando este aceite era expuesto a la línea celular, tanto de forma libre como incorporado en NC (>200 µg/mL).

Tabla 3. Valores de IC₅₀ para (AE) de Ov, Tv, Mg, libres e incorporados en (NC), determinados mediante el ensayo de MTT (media ±DE; n=3*).

Formulación	IC ₅₀ (µg/mL)
AE-Ov*	51.03 ± 7.2
AE-Tv*	117.63 ± 8.3
AE-Mg	>200
NC-Ov*	53.21 ± 8.25
NC-Tv	>120
NC-Mg	>200

Ensayo de fototoxicidad

Se ha demostrado que la línea celular HaCaT permite distinguir compuestos fototóxicos y no-fototóxicos de forma similar que la línea celular validada para estos procedimientos. Específicamente, la línea celular HaCaT es más estable durante la evaluación fototóxica, comparada con una línea celular de Balb/c 3T3 (Rajnochová *et al.* 2016). La línea celular HaCaT es el modelo más próximo a los queratinocitos normales ofreciendo un modelo de estudio de los mecanismos regulatorios en células epidermales (Boukamp *et al.* 1988). Además, para algunos usos específicos, i.e. ensayos de seguridad de cosméticos, se prefiere el uso de queratinocitos, debido a que estas son las primeras células expuestas a los productos y a la luz solar (Zanatta *et al.* 2010). El potencial fototóxico se determina comparando las diferencias en la toxicidad entre las placas no expuestas a irradiación UVA (control negativo) y las placas expuestas a irradiación UVA (Amaral *et al.* 2014). La fototoxicidad de los aceites esenciales libres (AE-Ov, AE-Tv y AE-Mg) y los aceites esenciales cargados en las NC (NC-Tv, NC-Ov y NC-Mg) fue evaluada en queratinocitos humanos HaCaT usando el ensayo de CRN (Figura 3).

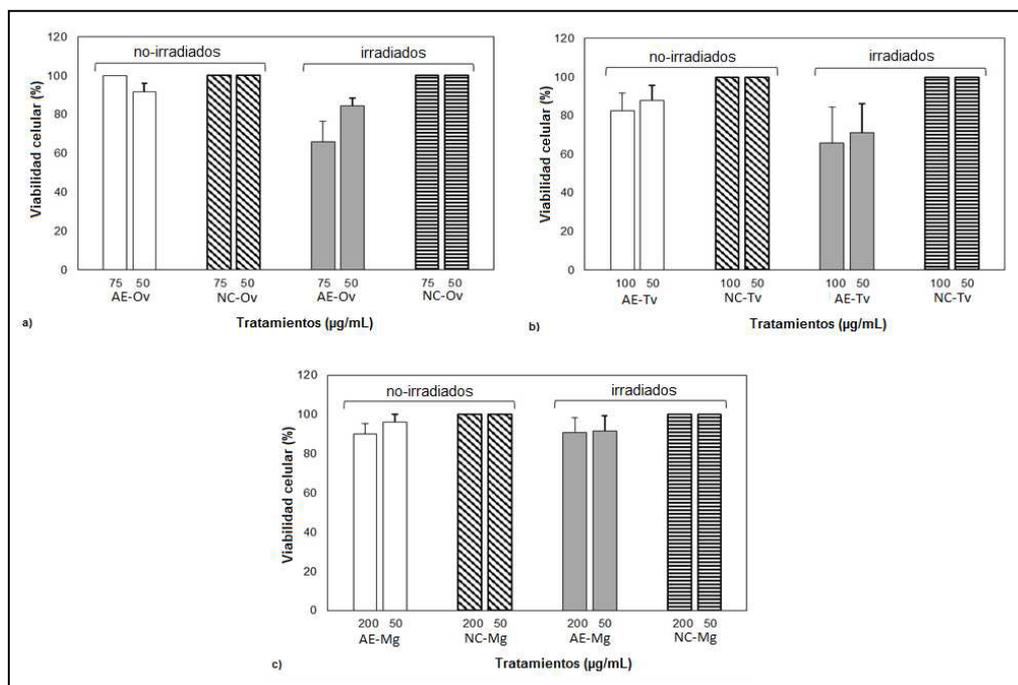


Figura 3. Actividad citotóxica de AE-Ov, AE-Tv, AE-Mg, NC-Ov, NC-Tv y NC-Mg, a dos diferentes concentraciones con células HaCaT no-irradiadas e irradiadas (células-irradiadas UVA 2.5 J/cm²).

Esta evaluación se realizó a dos diferentes concentraciones de cada uno de los tratamientos, la elección de las concentraciones se basó en: a) los valores establecidos de IC₅₀ y b) una concentración por encima de la IC₅₀. Tanto para AE-Tv y AE-Ov (Figuras 3^a y 3^b) se observa que ambas concentraciones irradiadas presentaron viabilidades celulares entre 60-80%. En el caso de AE-Mg (Figura 3^c), la viabilidad celular observada fue por encima del 80% para las dos concentraciones evaluadas e irradiadas. Sin embargo, para las formulaciones de NC-Tv y NC-Ov (Figuras 3^a y 3^b) esta viabilidad celular se ve revertida (100%) empleando las mismas concentraciones que de aceite esencial libre. Por último, para la formulación de NC-Mg (Figura 3^c), la viabilidad celular no mostró cambio alguno, permaneciendo por encima del 80%. Tomando en cuenta lo anterior se puede decir que los tratamientos que presentaron una viabilidad celular igual o superior a 80% (AE-Mg, AE-Tv, NC-Ov y NC-Mg) son considerados como tratamientos no-fototóxicos (OECD 2004).

Determinación de la Interleucina-1 α (IL-1 α)

La determinación de la IL-1 liberada tiene gran importancia debido a que las citocinas (IL-1) son uno de los iniciadores primarios en la respuesta pro-inflamatoria dérmica (Casas *et al.* 2013). Cuando los queratinocitos son activados por varios irritantes, son capaces de expresar o sobre-expresar la producción y/o liberación de estos mediadores inflamatorios especialmente de tipo citocina (IL-1) (Vinardell y Mitjans 2008). Tomando como referencia el estudio de citotoxicidad mencionado anteriormente, y para conocer de forma más específica la citotoxicidad producida por el AE-Ov sobre la línea celular HaCaT, se determinó la producción de IL-1 α (asociada a la célula y liberada al medio de cultivo). De esta forma, el contenido de IL-1 α intracelular y liberada en el medio de cultivo fue determinada por ELISA. En algunos casos la cantidad de citocina no fue detectada por el kit IL-1 α ELISA debido a su límite de detección (31.25 pg/mL). En la Figura 4 se muestra claramente, como a mayor concentración de los tratamientos, se observa un aumento en la cantidad de IL-1 α asociada a la célula (Figura 4b) y una disminución de IL-1 α liberada (Figura 4a).

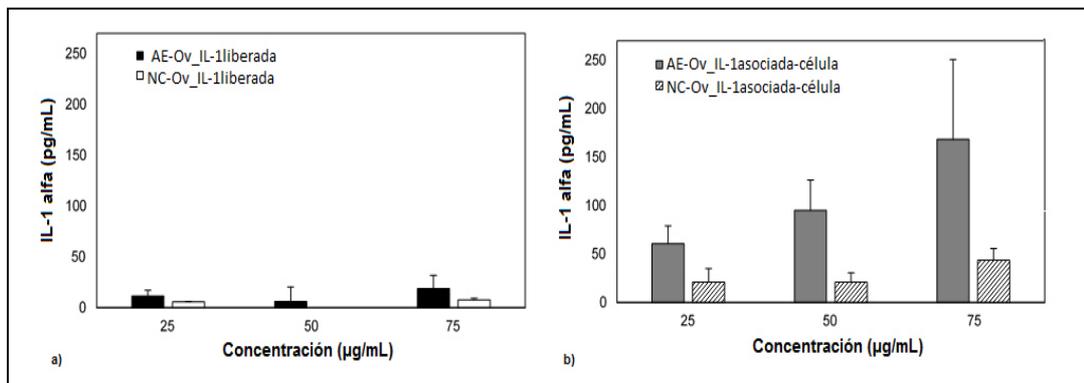


Figura 4. Estimulación de queratinocitos con AE-Ov y NC-Ov como tratamiento para la producción de IL-1 α .

Este comportamiento es observado tanto para el aceite esencial libre AE-Ov, como para el incorporado en las NC (NC-Ov). Sin embargo, la producción de IL-1 α (asociada y liberada) se ve reducida notablemente en un rango entre 50-75% cuando el aceite esencial se encuentra incorporado en las NC. Nogueira *et al.* evaluaron nanovesículas a base de lípidos (colesterol) para administración tópica. Con respecto al ensayo de

respuesta inflamatoria, se estableció que a las concentraciones más elevadas de sus tratamientos, algunas formulaciones presentaban una regulación negativa en la IL-1 α asociada a la célula y un aumento en la IL-1 α liberada. Este comportamiento le es atribuido directamente a la pérdida de la integridad de la membrana celular y concuerda con lo esperado, tomando en cuenta la naturaleza de los lípidos que conformaban las nanovesículas (Nogueira *et al.* 2013; Sanchez *et al.* 2006b). Ahora bien, lo establecido por Nogueira *et al.* es un comportamiento opuesto a lo observado en la presente investigación, por lo tanto, puede decirse que la relación directa entre la concentración del tratamiento administrado y la cantidad de IL-1 α asociada a la célula es debido a que la membrana celular no ha perdido su integridad. Lo que significa que la respuesta inflamatoria de los tratamientos empleados (AE-Ov y NC-Ov), está directamente relacionada con lo reportado para los estudios de citotoxicidad (Figura 2bB,C).

CONCLUSIÓN

En el presente estudio, se desarrollaron y caracterizaron formulaciones de NP con aceite esencial incorporado. Mismas que fueron evaluadas en ensayos de citotoxicidad, los cuales revelaron que la encapsulación de aceites esenciales en matrices poliméricas (NP), disminuye su efecto citotóxico posiblemente al comportarse como un liberador gradual de los mismos. Así mismo la línea celular HaCaT, permitió la evaluación citotóxica de aceites esenciales libres e incorporados en NP. Tanto los aceites esenciales libres como los incorporados en NP, no son capaces de inducir un efecto fototóxico en la línea celular HaCaT. Así mismo, la producción de IL-1 α observada está relacionada con la citocina asociada a la célula. Obteniendo como resultado tres formulaciones de NP cargadas con aceite esencial con un elevado potencial para ser administradas de forma segura como una alternativa en el tratamiento de infecciones tópicas.

CAPÍTULO 2. ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD ANTIDERMATOFÍTICA DE NANOCÁPSULAS CON ACEITES ESENCIALES Y DE PERMEACIÓN *in vitro* EN PIEL DE CERDO

RESUMEN

Los aceites esenciales contienen componentes cuya actividad es favorable para combatir algunos microorganismos tales como hongos (i.e. dermatofitos), un ejemplo de ello son los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*. Se evaluó la actividad antidermatofítica de estos aceites libres e incorporados en nanocápsulas. Como resultado se obtuvo una CMI de 125 y 175 $\mu\text{g/mL}$ para *O. vulgare* y *T. vulgaris*, respectivamente. Para sus formulaciones de nanocápsulas, se demostró que estas eran activas contra al menos cuatro de las seis cepas de hongos dermatofitos evaluados. Finalmente se evaluó la liberación en piel de los aceites esenciales libres e incorporados en nanocápsulas hasta por 24 h. Se estableció que propiedades fisicoquímicas de los compuestos presentes en los aceites esenciales, así como, propiedades relacionadas con los sistemas nanoparticulados juegan un papel importante en la penetración de compuestos en la piel en función del tiempo. Se obtuvieron nanocápsulas cargadas con aceites esenciales, las cuales prometen ser una alternativa para el tratamiento tópico de micosis superficiales.

INTRODUCCIÓN

Las dermatofitosis son infecciones causadas por hongos denominados dermatofitos, pertenecientes a las especies de los géneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum* (Molina 2011). Estos hongos filamentosos tienen afinidad por la queratina, la cual es uno de los componentes principales del pelo, las uñas y la piel, áreas primarias de infecciones por dermatofitos (Borgers *et al.* 2005). Se estima que este tipo de padecimientos, afectan del 20-25% de la población mundial y esta incidencia

continúa creciendo constantemente (Vena *et al.* 2012). El tratamiento convencional de las micosis superficiales es el empleo de fármacos tales como los azoles, no obstante la limitante más importante es la pobre penetración en los tejidos afectados, además de la posible aparición de microorganismos farmacorresistentes (Fernández *et al.* 2005).

Los aceites esenciales (AE) contienen componentes cuya actividad es favorable para combatir algunos microorganismos tales como parásitos, bacterias y hongos. Guerra-Boone *et al.* demostraron una importante actividad antifúngica de los AE de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* frente a cinco hongos dermatofitos utilizando la técnica de difusión en placa con disco y pozo, adaptando la técnica establecida por CLSI, documento M44-A2, 2010 (Guerra-Boone *et al.* 2015).

No obstante, para poder ser utilizados como agentes antimicrobianos aún presentan ciertas limitaciones entre los cuales se encuentran: i) la elevada tasa de degradación química de sus componentes, ii) la baja solubilidad en agua que limita su formulación y iii) la elevada volatilidad que limita el tiempo de bioactividad (Wattanasatcha *et al.* 2012). Por lo anterior, es necesario utilizar alternativas tecnológicas que protejan al AE y faciliten su correcta administración, sin perder sus propiedades antifúngicas. Un ejemplo de este tipo de tecnologías es la incorporación de activos en sistemas coloidales, entre los que destacan las nanopartículas poliméricas (NP). Estos sistemas acarreadores poseen una forma esférica, su tamaño fluctúa en un rango de 1-600 nm y permiten la incorporación de activos con carácter hidrofóbico (Tyler *et al.* 2016). De Oliveira *et al.* desarrollaron una formulación de NP de alginato/goma de anacardo preparadas por la técnica de secado por aspersion para la incorporación del aceite esencial de *Lippia sidoides*. Obtuvieron partículas de 223-399 nm, con una eficiencia de encapsulación por encima del 55 %. Los perfiles de liberación de las formulaciones indicaron que las NP son un sistema de liberación potencial para ser usada como un larvicida contra el mosquito *A. aegypti* (De Oliveira *et al.* 2014).

En este contexto el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antidermatofítica *in vitro* de los aceites esenciales de *T. vulgaris* y *O. vulgare* libre y nanoencapsulado, así como establecer su liberación en piel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y caracterización de los aceites esenciales. Los AE de *T. vulgaris* (AE-Tv) y *O. vulgare* (AE-Ov) se obtuvieron por hidrodestilación en un equipo Clevenger durante 4 h. Los AE recuperados se almacenaron y protegieron de la luz a -4°C.

Obtención y caracterización de las nanocápsulas con aceite esencial incorporado. Para la obtención de las nanocápsulas (NC) cargadas con los AE, se utilizó la técnica de nanoprecipitación propuesta por Fessi *et al.* (1989). Esta técnica consiste en incorporar, en agitación constante, una fase orgánica que contiene el polímero biodegradable ϵ -policaprolactona (CPL) (PM: 10 000, Fluka, Saint Quentin Fallavier, FR) y el AE a una fase acuosa con un agente tensoactivo Lutrol F127 NF (Mississauga, CA). La purificación de las NC fue realizada por diálisis durante 3 h (membrana de celulosa Spectra-Por, California, USA). Las NC se caracterizaron en función de su tamaño e índice de polidispersidad (IP) y densidad de carga superficial (Ψ_z) por espectroscopía de correlación fotónica (Zeta Nano ZS90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). El porcentaje de eficiencia de encapsulación de cada aceite esencial, se determinó de forma directa por cromatografía de gases con detector de ionización a la flama (CG-FID) siguiendo las condiciones previamente establecidas (Velázquez-Dávila *et al.* 2017a). La eficiencia de encapsulación del aceite esencial, se determinó utilizando la fórmula: $[(T - t) / T] \times 100$, en donde T es la cantidad total de aceite esencial presente en la fase orgánica y t es la cantidad de aceite esencial no encapsulado.

Descripción de la técnica poisoned food. Esta técnica consiste en la inhibición radial del crecimiento micelial de los dermatofitos en agar Sabouraud. Discos de agar de 5 mm de diámetro de cultivos puros de cada una de las seis cepas de dermatofitos (*Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*,

Trichophyton tonsurans y *Epidermophyton floccosum*), fueron colocados sobre una placa de agar Sabouraud que contenía aceite esencial en un rango de concentración de 10-1000 $\mu\text{g/mL}$ y Polisorbato 20 (0.01% p/v). Para las formulaciones de NC con AE de *T. vulgaris* (NC-Tv) se utilizaron concentraciones de 175 y 350 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para las NC cargadas con AE de *O. vulgare* (NC-Ov) se utilizaron concentraciones de 125 y 250 $\mu\text{g/mL}$. NP blanco (sin AE incorporado) fueron evaluadas para descartar interferencias relacionadas con los materiales empleados. Las placas empleadas como control contenían, agar Sabouraud y Polisorbato 20 (0.01% p/v). Clotrimazol fue empleado como control positivo a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$. Todas las placas Petri fueron incubadas a 30°C por ocho y quince días.

Permeación transdérmica. Se realizó el montaje de celdas de Franz modificadas, las cuales constan de un compartimento donador y un compartimento receptor entre los cuales se colocó la piel de cerdo, previamente acondicionada. El compartimento receptor contenía la solución amortiguadora de fosfatos salina con un pH de 7.4, mientras que el compartimento donador contenía los AE de tomillo y orégano o las formulaciones de NC-Tv y NC-Ov. Cada uno de los tratamientos estuvo en contacto con la piel de puerco a diferentes tiempos 2, 4, 6, 24 h. Posteriormente, se retiró la piel y fue colocada sobre 1.5 mL de metanol y se dejó en contacto durante 30 min a 150 rpm. Finalmente, se analizó cada una de las muestras por CG-FID bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las formulaciones de NC utilizadas para la realización tanto de los ensayos de actividad antifúngica como en los ensayos de permeación *in vitro* presentaron un diámetro de 172.3 ± 3.9 y 168.8 ± 3.7 para la formulación de NC-Tv y NC-Ov, respectivamente. Además, presentaron un IP de 0.097 ± 0.02 y 0.135 ± 0.01 , las NC-Tv y NC-Ov, respectivamente, indicando una distribución homogénea en las poblaciones de NC presentes en las formulaciones. Finalmente, ambas formulaciones presentaron un valor de Ψ_z negativo.

Determinación de la actividad antifúngica. La CMI de los AE de forma libre fue previamente establecida (Velázquez-Dávila *et al.* 2017b). En base a la CMI de cada uno de los AE, se utilizaron dos concentraciones diferentes para evaluar las formulaciones de NC, 175 y 350 µg/mL para *T. vulgaris* (NC-Tv) y 125 y 250 µg/mL para *O. vulgare* (NC-Ov). Las inhibiciones radiales del crecimiento micelial de los cinco dermatofitos aplicando las formulaciones de NC, se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Inhibiciones del crecimiento micelial de los dermatofitos con la aplicación de las NC cargadas con aceite esencial de *T. vulgaris* y *O. vulgare* mediante la técnica *poisoned food*.

Microorganismo	NC-Tv		NC-Ov	
	Concentración ppm			
	175	350	125	250
<i>Microsporum canis</i>	IT	IT	IT	IT
<i>Microsporum gypseum</i>	IT	IT	IT	IT
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	IT	IT	IT	IT
<i>Trichophyton tonsurans</i>	IN	IN	IN	IN
<i>Trichophyton rubrum</i>	IT	IT	IT	IT
<i>Epidermophyton floccosum</i>	IN	IN	IN	IN

IN, inhibición negativa; IT, inhibición total

La inhibición negativa se establece cuando el hongo es capaz de crecer radialmente sobre la superficie de la placa, mientras que la inhibición total es la ausencia de crecimiento radial del hongo sobre la superficie de la placa.

En la Figura 1 se muestra la inhibición de los crecimientos. En la Figura 1a, se observa el control negativo, en donde el crecimiento radial de los seis dermatofitos empleados es tomado como referencia para interpretar la magnitud del efecto antifúngico observado por cada uno de los tratamientos.

En la Figura 1b se observa el crecimiento de los seis dermatofitos cuando es aplicada una formulación de NP blanco, mostrando que las NP sin compuestos activos no son

capaces de inhibir a ninguno de los seis dermatofitos probados: *M. canis* (1), *M. gypseum* (2), *T. mentagrophytes* (3), *T. tonsurans* (4), *T. rubrum* (5) y *E. floccosum* (6). En las Figuras 1c y 1d, se observa la inhibición de los crecimientos de los cinco dermatofitos a la CMI de AE-Ov (125 µg/mL) y AE-Tv (175 µg/mL).

En el caso de las NC-Ov, a una concentración de 250 µg/mL, se observó una completa inhibición de cuatro dermatofitos: *M. canis* (1), *M. gypseum* (2), *T. mentagrophytes* (3) y *T. rubrum* (5). Los otros dos dermatofitos: *T. tonsurans* (4) y *E. floccosum* (6) presentaron una inhibición negativa (Figura 1e). Cuando las NC-Ov se encontraban a una concentración de 125 µg/mL (CMI del OE-Ov) (Figura 1f) se observa la misma inhibición completa de los cuatro dermatofitos anteriormente mencionados. Este comportamiento también es observado para las NC-Tv, es decir a las concentraciones de 350 y 175 µg/mL (Figura 1g y 1h) se genera una inhibición total de cuatro de los dermatofitos estudiados (*M. canis* (1), *M. gypseum* (2), *T. mentagrophytes* (3) y *T. rubrum* (5)), mientras que los hongos *T. tonsurans* (4) y *E. floccosum* (6) nuevamente, presentaron, una inhibición negativa.

Pinto *et al* mencionan que es difícil atribuir la actividad biológica a una mezcla compleja de constituyentes particulares como los son los aceites esenciales. Sin embargo, propone que la actividad del aceite esencial está relacionada con la presencia de timol (terpeno hidroxilado) (Pinto *et al.* 2006); este compuesto se encuentra presente en ambos AE, además de ser uno de los componentes mayoritarios en el AE-Tv (43.7%) y en el AE-Ov (79.2%). Es importante mencionar que ambos aceites siguen conservando su actividad antifúngica después del proceso de nanoencapsulación. Nuestros resultados coinciden con aquellos reportados por Lima *et al.* quienes mencionan que el timol presenta actividad antifúngica contra los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* (Lima *et al.* 2011).

El mecanismo de acción del timol aún no está totalmente elucidado, sin embargo se cree que los terpenos hidroxilados generan una lesión primaria en la membrana celular fúngica. Al mismo tiempo Šegvić Klarić *et al.* han propuesto que a bajas

concentraciones los compuestos fenólicos lipofílicos, como el timol, alteran la permeabilidad de la célula microbiana permitiendo la pérdida de macromoléculas (i.e. carbohidratos, lípidos) y terminando en la muerte celular. Además, también se menciona que los fenoles podrían inactivar enzimas esenciales involucradas con las proteínas de membrana o con la funcionalidad del material genético (Šegvić Klarić *et al.* 2007).

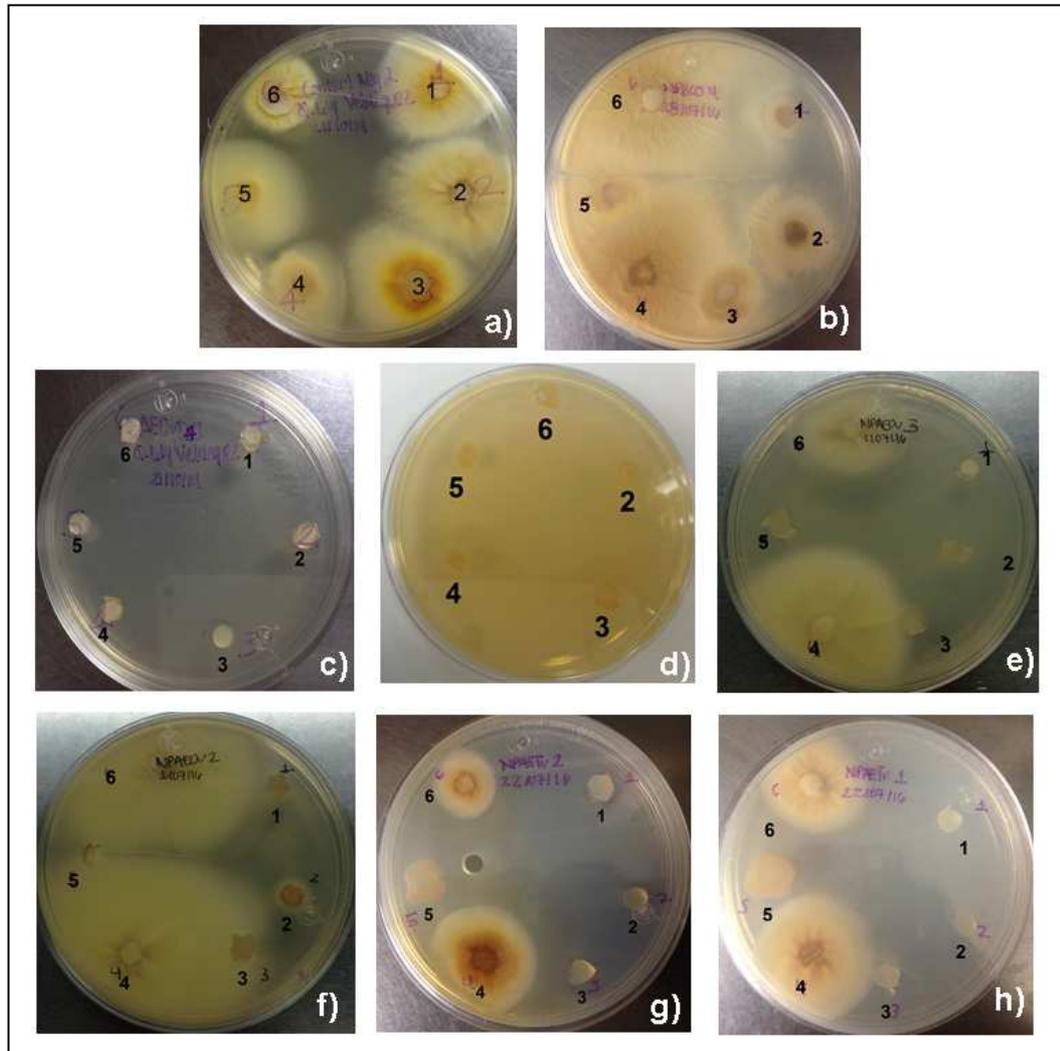


Figura 1. Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales libres y nanoencapsulados. (a) Control de crecimiento, (b) NP-control (sin AE), (c) AE-Ov 125 µg/mL, (d) AE-Tv 175 µg/mL, (e) NC-Ov 250 µg/mL, (f) NC-Ov 125 µg/mL, (g) NC-Tv 350 µg/mL y (h) NC-Tv 175 µg/mL. *M. canis* (1), *M. gypseum* (2), *T. mentagrophytes* (3), *T. tonsurans* (4), *T. rubrum* (5) y *E. floccosum* (6).

En relación a las NC, se ha mencionado que estos sistemas acarreadores potencian la actividad antifúngica de compuestos activos, reduciendo el número de células fúngicas

(Flores *et al.* 2013). Por su parte, Singh *et al.* desarrollaron una formulación de nanopartículas lipídicas (NL) cargadas de miconazol para evaluar su actividad antifúngica contra *T. mentagrophytes* mediante la técnica de difusión en pozo. Se propuso que el pequeño tamaño de las NL permite la difusión de las mismas a través del agar o medio de cultivo presente en la placa, permitiendo así la liberación del principio activo. Además, se estableció que las NL presentan una liberación inicial *burst*, seguida de una liberación prolongada, la cual provee una acción biológica por un periodo extendido de tiempo (Singh *et al.* 2016).

Permeación transdérmica. En la Figura 2 se presenta la cantidad de γ -terpineno y timol presente en el estrato córneo después de estar en contacto con los aceites libres (AE-Tv y AE-Ov) y con las NC-Ov y NC-Tv durante 2, 4, 6 y 24 h. Para todas las formulaciones de NC se estableció el comportamiento de dos moléculas presentes en los aceites: γ -terpineno y timol debido a su actividad biológica y abundancia en cada uno de los aceites (Velázquez-Dávila *et al.* 2017b).

Cuando se aplican ambos AE libres (AE-Tv y AE-Ov) sobre la superficie de la piel de cerdo, se observa que el γ -terpineno se encuentra en menor cantidad en la piel, en comparación al timol. Se puede observar que después de 6 h de contacto del AE-Tv con la superficie de la piel, la cantidad de γ -terpineno es 103 veces menos que la del timol al mismo tiempo. En el caso del AE-Ov, se observa el mismo comportamiento, la cantidad de γ -terpineno es 758 veces menos que la del timol.

Existen diversos factores que intervienen en la penetración/permeación de compuestos en las diferentes capas de la piel, entre los que destacan, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, como por ejemplo, el peso molecular y el coeficiente de partición ($\log P_{o/w}$) (Förster *et al.* 2009). En el caso de los aceites esenciales también se debe considerar la volatilidad de las moléculas. Se ha observado que moléculas con una mayor presión de vapor, se evaporan en la superficie de la piel, más rápidamente que otras con menor presión de vapor (Guy 2010). Esto coincide con nuestros resultados ya

que el γ -terpineno presenta una presión de vapor de 1.075 mm Hg a 25°C, comparada con la del timol 0.038 mm Hg a 25°C.

Cuando el γ -terpineno está en las NC, se observa una mayor cantidad del mismo depositado en la superficie de la piel con respecto a la cantidad de γ -terpineno depositada en la piel proveniente del AE libre (Figuras 2a y 2c). Este comportamiento es observado desde las primeras dos horas, siendo más evidente a las 6 horas. El γ -terpineno se encuentra depositado en el estrato córneo entre 4 y 2 veces más cuando está encapsulado (NC-Tv y NC-Ov), comparado con su forma libre (AE-Tv y AE-Ov). Cabe mencionar que después de 24 horas, el γ -terpineno depositado en la piel a partir del AE-Ov, está por debajo de los límites de cuantificación y detección del método analítico. Este comportamiento, pone en evidencia que la nanoencapsulación protege a principios activos de una pérdida física o química (Contri *et al.* 2016). En nuestro caso, específicamente, fue un componente altamente volátil, el γ -terpineno presente en ambos aceites esenciales.

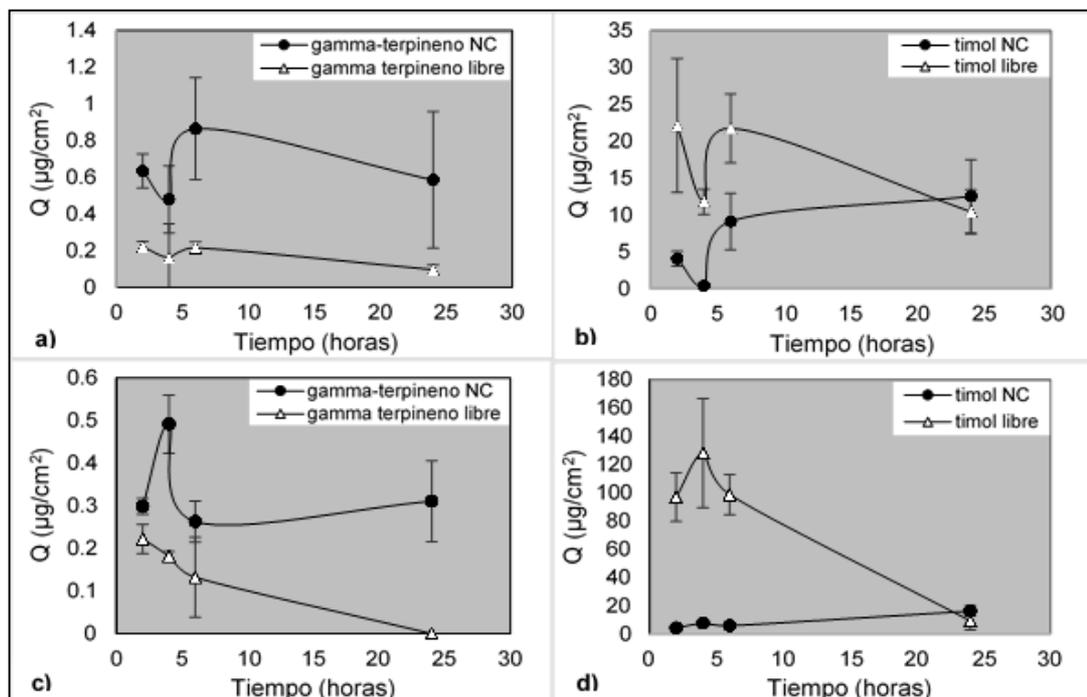


Figura 2. Cantidad de γ -terpineno y timol en el estrato corneo después de 2, 4, 6 y 24 h de contacto con a) AE-Tv, b) NC-Tv, c) AE-Ov y d) NC-Ov.

Con respecto al timol, se debe considerar que moléculas como los terpenos presentan diferentes características de penetración/permeación en la piel debido a su coeficiente de partición (Cal y Sznitowska 2003). Como se esperaba, el timol ($\log P_{o/w} \cong 3.3$) se encuentra en mayor cantidad en el estrato córneo que el γ -terpineno ($\log P_{o/w} \cong 4.7$) (Lucia *et al.* 2013; El-Kattan *et al.* 2001), previamente, se ha reportado la baja penetración de compuestos altamente lipofílicos ($\log P_{o/w} >4$), mientras que compuestos menos lipofílicos penetran en la piel fácilmente (Cal 2006).

Cuando el timol se encuentra incorporado en las nanopartículas NC-Tv y NC-Ov (Figuras 1b y 1d), después de 2, 4 y 6 h de contacto con la piel, se observa una menor cantidad depositado en la superficie de la piel ($\approx 4 - 9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), comparado con el timol libre AE-Tv y AE-Ov ($\approx 20 - 130 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Sin embargo, a las 24 h de contacto con las NC se observa un incremento en la cantidad de timol presente en la superficie de la piel ($\approx 12 - 16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Esto pudiera estar relacionado con la propiedad que poseen los sistemas nanoparticulados de controlar la liberación de los activos encapsulados. Esmaeili *et al.* sugieren que las NP pueden ser un vehículo adecuado para controlar la difusión de aceites esenciales (Esmaeili y Asgari 2015).

Por su parte, Karami *et al.* desarrollaron nanofibras de poly(ϵ -caprolactona), las cuales contenían timol incorporado. Durante los estudios de liberación se observó que durante las primeras 12 h la liberación del activo estaba relacionada con el timol adsorbido en la superficie de las nanofibras. Sin embargo, después de las 12 h se observó que presentaba una suave pendiente y una liberación gradual del timol hasta por 48 h (Karami *et al.* 2013). Este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos para la dermatocinética obtenida específicamente, para el timol incorporado en las nanopartículas en ambas formulaciones (NC-Tv y NC-Ov).

CONCLUSIÓN

Se demostró la actividad antifúngica de dos formulaciones cargadas con AE de *T. vulgaris* y *O. vulgare* contra al menos cuatro de las seis cepas de hongos dermatofitos.

Esta actividad se mantuvo después de los procesos de encapsulación y purificación. Además, se realizaron estudios dermatocinéticos hasta por 24 h de los AE libres e incorporados en nanopartículas sobre la piel de cerdo. En estos estudios, se estableció que propiedades fisicoquímicas de los compuestos presentes en los AE, así como, propiedades relacionadas con los sistemas nanoparticulados juegan un papel importante en la penetración de compuestos en la piel en función del tiempo. Esta investigación pone en evidencia el uso potencial de AE nanoencapsulados como alternativa en el tratamiento de infecciones en la piel causadas por dermatofitos. Sin embargo, es necesario realizar estudios más profundos de la actividad antifúngica.

CAPÍTULO 3. DESARROLLO Y APLICACIÓN TÓPICA DE FORMULACIONES DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON CLOTRIMAZOL

RESUMEN

Las micosis superficiales son infecciones tópicas en las cuales el hongo invade las capas externas de la epidermis. El tratamiento convencional de este padecimiento consiste en el uso de los azoles (i.e. clotrimazol). Sin embargo, este fármaco presenta una limitante con respecto a su aplicación tópica, tiene una pobre penetración en las lesiones. Para superar esta limitante, las nanopartículas poliméricas han sido propuestas como vectores farmacéuticos para mejorar la residencia de fármacos en la piel. En el presente estudio se desarrollaron tres formulaciones de nanopartículas cargadas con clotrimazol, utilizando un polímero distinto en cada caso (Eudragit RL100, Eudragit E100 y Eudragit L100-55). Las tres formulaciones tuvieron un tamaño promedio entre 136 y 200 nm. Además, presentaron una densidad de carga superficial neutra (RL100), positiva (E100) y negativa (L100-55) y porcentajes de eficiencia de encapsulación de 76.3, 47.9 y 49.6 %, respectivamente. En cuanto a los perfiles de concentración del clotrimazol sobre la piel, las nanopartículas con carga positiva mostraron mayor atracción por la superficie de la piel. En consecuencia, se favoreció la liberación del clotrimazol en este tejido y se evidenció que la densidad de carga superficial de las partículas favorece el depósito y liberación de principios activos sobre la piel.

INTRODUCCIÓN

Las micosis superficiales son también conocidas como dermatomicosis superficiales y se caracterizan en que el hongo solo invade las capas externas de la epidermis, el pelo y las uñas. Se estima que este tipo de padecimientos afectan del 20-25% de la población mundial y esta incidencia continúa creciendo constantemente (Vena *et al.* 2012).

Los tratamientos de las micosis superficiales pueden ser locales o sistémicos con antifúngicos de mayor o menor intensidad. El tratamiento convencional de las micosis superficiales consiste en el uso de los azoles, los cuales son compuestos químicos que se caracterizan por la presencia en su estructura química de un anillo azólico de 5 átomos (Vilata 2006; Romero *et al.* 2004). El tratamiento tópico del clotrimazol (CLT), con frecuencia es el más recurrido comparado con la administración oral de fármacos en el tratamiento de infección micóticas cutáneas debido a que, el CLT es prácticamente insoluble en agua y sus niveles de absorción son bajos cuando este es administrado vía oral (Paradkar *et al.* 2015). Sin embargo, este fármaco presenta una limitante con respecto a su aplicación tópica, tiene una pobre penetración en las lesiones, lo cual está relacionado con su coeficiente de partición ($\text{Log } K_{ow} = 4.1$) (Marwah *et al.* 2016). Esta última propiedad es uno de los factores determinantes de la magnitud de las concentraciones de fármaco sobre la superficie de la piel.

En los últimos años las nanopartículas poliméricas (NP) han sido propuestas como vectores farmacéuticos de activos antimicrobianos. Bhatta *et al.* desarrollaron una formulación de nanopartículas de 213 nm, a base de los polímeros lecitina/quitosano, cargadas con natamicina. Al evaluar la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus fumigates*, la formulación de NP mostró zonas de inhibición similares o mayores al ser comparada con natamicina libre y una formulación comercial de natamicina. Se concluyó que a pesar de que la formulación de NP tiene la capacidad de liberar la natamicina de forma controlada, además de ser de fácil administración, es necesario realizar estudios requeridos para evaluar su eficacia clínica (Bhatta *et al.* 2012). Por otra parte, Essa *et al.* desarrollaron una formulación de NP cargadas con itraconazol a base de los polímeros poli(etilen glicol)/ácido poliláctico de 185-285 nm. Durante la evaluación antifúngica se determinó que las formulaciones NP mostraron mayor inhibición al ser comparadas con una formulación de itraconazol-agua, observando el mismo efecto en los dos microorganismos evaluados (*C. albicans* y *A. fumigates*). Finalmente, se propuso llevar a cabo una mayor investigación biológica (evaluaciones *in vivo*), la cual es necesaria para ampliar la información de este efecto antifúngico que poseen las formulaciones de NP (Essa *et al.* 2013).

Específicamente, las ventajas conferidas por estos coloides en su aplicación como sistemas de liberación se deben a sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo su tamaño submicrónico, su amplia área superficial específica, sus versátiles propiedades de superficie y su composición polimérica variable (Álvarez-Román *et al.* 2012). En gran medida, dichas propiedades se deben a los múltiples materiales empleados para la preparación de las NP (i.e. polímeros y agentes tensoactivos), que pueden facilitar la interacción con la compleja composición de la piel (i.e. estrato córneo). El objetivo del presente estudio fue desarrollar formulaciones de NP cargadas con CLT y observar la influencia de los polímeros empleados para la preparación de las mismas sobre la deposición del fármaco en la superficie de la piel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cuantificación del clotrimazol por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos con detección de arreglo de diodos (Varian 9065, 9012 y ProStar 410, California, USA), con una columna Hypersyl BDS C18 Supelco (25 cm x 3 mm, 5 μ m) y una fase móvil acetonitrilo:agua (70:30) con un flujo de 0.3 mL/min a 30°C, a una longitud de onda a 220 nm. Se realizó la validación parcial del método basado en el documento Q2 (R1) de la ICH (ICH, Q2(R1) 2016), en función de los siguientes parámetros: coeficiente de correlación lineal (en cinco niveles de concentración en un rango de 5-25 μ g/mL por triplicado), precisión (desviación estándar relativa DER), límite de detección y límite de cuantificación fueron determinados de acuerdo a la curva de calibración.

Obtención y caracterización de las nanopartículas. Para la obtención de las NP cargadas con el CLT se utilizó la técnica de nanoprecipitación propuesta por Fessi *et al.* (1989), la cual consiste en incorporar, en agitación constante, una fase orgánica que contiene el polímero formador de NP (Eudragit ® E100, RL100 y L100-55) y el CLT a una fase acuosa con un agente tensoactivo (Lutrol F127 NF 1% p/v). La suspensión de NP con CLT incorporado se sometió a destilación a presión reducida (Rotavapor Heidolph Instruments) durante 30 min, 100 rpm a 25°C, a fin de obtener una suspensión acuosa de

NP purificadas. Una vez obtenidas las NP-CLT se caracterizaron en función de su tamaño e índice de polidispersidad (IP) por espectroscopía de correlación fotónica (Zeta Nano ZS90, Malvern Instruments).

El porcentaje de eficiencia de encapsulación del CLT incorporado en las NP se determinó con el método de CLAR validado previamente. Para la cuantificación, las NP fueron centrifugadas a 25000 rpm durante 2.5 h a 5°C (Allegra 64R Centrifuge, Beckman-Coulter, USA), obteniéndose una pastilla y un sobrenadante. La pastilla obtenida fue liofilizada a -48°C, 120 mBar durante 24 h (Liofilizadora FreeZone 2.5 Labconco, USA). La cuantificación de las NP se realizó de manera directa, en donde una cantidad de pastilla de NP es solubilizada en metanol para su posterior cuantificación en base a las ecuaciones 1 y 2.

$$\% \text{ encapsulación} = \frac{\text{clotrimazol en fase orgánica (mg)} - \text{clotrimazol no encapsulado (mg)}}{\text{nanopartículas con clotrimazol incorporado (mg)}} \times 100$$

ecuación 1

$$\% \text{ eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{clotrimazol en fase orgánica (mg)} - \text{clotrimazol encapsulado (mg)}}{\text{clotrimazol en fase orgánica (mg)}} \times 100$$

ecuación 2

- **Clotrimazol en fase orgánica:** cantidad inicial de fármaco en la fase orgánica.
- **Clotrimazol no encapsulado:** clotrimazol no incorporado en las nanopartículas.
- **Clotrimazol encapsulado:** clotrimazol incorporado en las nanopartículas.
- **Nanopartículas con clotrimazol incorporado:** peso de la pastilla liofilizada obtenida en la centrifugación de la suspensión de nanopartículas purificadas.

Permeación transdérmica. Se realizó el montaje de celdas de Franz modificadas, las cuales constan de un compartimento donador y un compartimento receptor entre los cuales se colocó la piel de cerdo previamente acondicionada. El compartimento receptor contenía la solución amortiguadora de fosfatos salina con un pH de 7.4, mientras que el

compartimento donador contenía la suspensión de NP con CLT incorporado (NP-E100, NP-RL100 y NP-L10055). Cada una de las formulaciones de NP estuvo en contacto con la piel de cerdo durante 1 h y posteriormente se retiró la piel para realizar la técnica de *tape stripping*.

Tape stripping. Empleando esta técnica se eliminaron, sucesivamente, las capas que forman el estrato córneo. Brevemente, se colocó una cinta adhesiva en la superficie de la piel, posteriormente, se desprendió la cinta. Este procedimiento se repitió en la misma muestra de piel de cerdo, con 15 cintas adhesivas diferentes. Se registró el peso de cada cinta adhesiva antes y después de estar en contacto con el estrato córneo (Micro Balanza SM Series (0.01mg), Scientech, USA). A cada cinta se le realizó una extracción con metanol para cuantificar el fármaco retenido en la piel por CLAR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización de las NP. En la Tabla 1 se muestran los parámetros de validación determinados por CLAR. La curva de calibración presentó un comportamiento lineal por encima de 0.99 con los cinco niveles de concentración ensayados. Así mismo el método fue preciso al presentar una %DER de 2.12, la cual está por debajo del valor de referencia <5% (ICH, Q2(R1) 2016). Con respecto al límite de detección y cuantificación se determinaron valores de 0.171 y 0.520 µg/mL, respectivamente. Estos valores fueron menores al nivel inferior de la curva de calibración, lo cual es un parámetro aceptable. Kumawat *et al.* desarrollaron y validaron un método para la cuantificación de CLT en comprimidos. En ese estudio se obtuvieron los siguientes resultados de los parámetros de validación: coeficiente de correlación de 0.999, precisión de 0.1 % y límites de detección y cuantificación de 0.0451 y 0.1368 µg/mL, respectivamente. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que las condiciones de análisis son distintas tanto en la fase móvil empleada, como en el flujo, la temperatura y la columna (Kumawat *et al.* 2014).

Tabla 1. Parámetros de validación parcial determinados por CLAR.

Estándar	Coefficiente de correlación lineal	Precisión (DER, %)	LDD $\mu\text{g/mL}$	LDC $\mu\text{g/mL}$
Clotrimazol	0.99	2.12	0.171	0.520

Los parámetros fisicoquímicos obtenidos para cada una de las formulaciones de NP con CLT incorporado se muestran en la Tabla 2. Se observa un diámetro de partícula ≈ 200 nm, con un IP menor a 0.16 lo que indica una distribución homogénea de las poblaciones de NP presentes en cada una de las formulaciones. Con respecto a su porcentaje de encapsulación, se ha reportado que el método de nanoprecipitación es un método de preparación de NP el cual posee los mejores resultados de encapsulación de principios activos de naturaleza no polar, logrando eficiencias de encapsulación superiores al 80% (Mora-Huertas *et al.* 2010). Este comportamiento, coincide con la formulación obtenida con el polímero de carga neutra (NP-RL100), la cual presentó una eficiencia de encapsulación del 76%.

En el caso de las formulaciones NP-E100 y NP-L100-55, la eficiencia de encapsulación fue mucho menor, de 47 y 49%, respectivamente. Esta diferencia puede estar relacionada con una variable la cual es considerada como fundamental en la encapsulación de principios activos: la naturaleza del polímero formador de las NP (Mora-Huertas *et al.* 2011). Dos de los polímeros utilizados para formar las NP, presentan carga, el polímero E100 se caracterizan por ser de naturaleza catiónica y el L100-55 aniónica. Nuestros resultados concuerdan con aquellos observados por Tang *et al.* quienes desarrollaron una formulación de NP a base del polímero Eudragit® E100 cargadas con genisteína también por la técnica de nanoprecipitación. Esta formulación presentó una eficiencia de encapsulación de $50.6 \pm 0.41\%$ y un porcentaje de encapsulación de $5.2 \pm 0.04\%$ (Tang *et al.* 2011). Con respecto al polímero aniónico, Galindo-Rodríguez *et al.* obtuvieron una formulación de NP a base del polímero Eudragit® L100-55 con ibuprofeno también por la técnica de nanoprecipitación, con una eficiencia y porcentaje de encapsulación de 50 y 4.5, respectivamente (Galindo-Rodríguez *et al.* 2005).

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de las formulaciones de NP con CLT incorporado.

Determinación	NP-E100	NP-RL100	NP-L100-55
Diámetro de Partícula (nm)	200.9 ± 3.8	136.1 ± 1.0	179.9 ± 4.1
Índice de polidispersidad (IP)	0.126 ± 0.01	0.159 ± 0.0	0.117 ± 0.0
Eficiencia de encapsulación (%)	47.9 ± 3.5	76.3 ± 3.6	49.6 ± 2.1
Encapsulación del fármaco (%)	4.3 ± 0.32	6.8 ± 0.33	4.4 ± 0.19
Potencial Z (mV)	50.1 ± 0.38	36.9 ± 1.37	-13.0 ± 0.55

Permeación transdérmica y tape stripping. Los perfiles de concentración de CLT después de 1 h de aplicación de las tres formulaciones de NP son mostrados en la Figura 1.

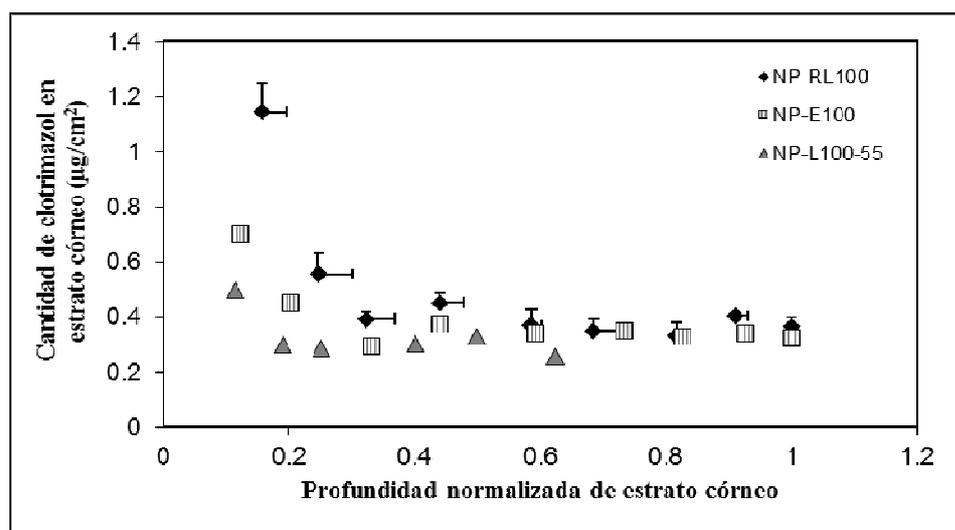


Figura 1. Perfiles de concentración de CLT en el estrato córneo después de 1 h de contacto con las formulaciones de NP. (Media±DE n=4).

Se observa en el primer punto de la gráfica que la formulación NP-E100 (catiónica) presentó mayor deposición de CLT ($\approx 1.2 \mu\text{g}$ de clotrimazol / cm^2 de estrato córneo), seguida de la formulación de NP-RL100 con carga neutra y por último la formulación de NP-L100-55 (aniónica). Estos resultados estarían relacionados con la carga negativa que presenta la piel de mamíferos en condiciones fisiológicas normales (punto isoeléctrico $\approx 4-5$) (Luzardo-Alvarez *et al.* 1998). Entonces, las NP que poseen un carácter catiónico,

podrían interactuar más fácilmente con la superficie de la piel. Nuestros resultados coinciden con aquellos observados por Wu *et al.* quienes ponen en contacto NP de poliestireno amino-funcionalizado (PS-NH₃⁺) con piel de cerdo durante 6 h. Se sugirió, en base a sus resultados de permeación y microscopía, que existe una atracción electrostática entre la carga positiva de las NP y la carga negativa de la piel, lo que favorece la transferencia del compuesto activo de la formulación de NP al estrato córneo (Wu *et al.* 2010).

Tomando en cuenta lo anterior, la carga negativa de la piel a un pH fisiológico normal, permitiría una mayor retención y penetración de partículas de naturaleza catiónica (Abdel-Mottaleb *et al.* 2012). Jung *et al.* evaluaron las diferencias en la penetración en piel de cerdo de formulaciones de liposomas en función de su carga de superficie. Establecieron que la mayor penetración de colorante hidrofílico (carboxifluoresceína) alcanzada fue por la naturaleza catiónica de la formulación de liposomas. Además, la formulación de liposomas con carga negativa alcanzó la penetración más baja con respecto a la profundidad máxima. Finalmente, se concluyó que la carga de superficie juega un papel importante en el comportamiento de penetración de un tipo de liposoma dado (Jung *et al.* 2006).

En la Figura 2 se muestra la cantidad total acumulada de CLT en el estrato córneo después de 1 h de contacto con las tres formulaciones de CLT. Si se comparan las NP-RL100 (carácter neutro) con las NP-E100 (carácter catiónico), se observa que las cantidades acumuladas de CLT en la piel fueron significativamente las mismas ($P < 0.05$) correspondiendo a 35.89 ± 2.9 y 32.44 ± 1.0 μg de CLT, respectivamente. Cabe mencionar que para este estudio de permeación, se aplicó 5.38×10^{10} NP-RL100 / cm^2 de piel, cada una de ellas con un 6.8% de encapsulación y 2.49×10^{10} NP-E100 / cm^2 de piel con una tasa menor de encapsulación de 4.3%, lo cual representa 2.1 veces más de NP neutras que las cargadas positivamente (Smith *et al.* 2012).

Por otra parte, cuando se comparan las NP con carácter catiónico y aniónico, se observa que la cantidad de CLT acumulada en la piel después de la aplicación de NP catiónicas

fue 2.05 veces más importante que cuando se aplican las NP aniónicas, aunque el porcentaje de encapsulación fue el mismo en las dos formulaciones de NP (Figura 2).

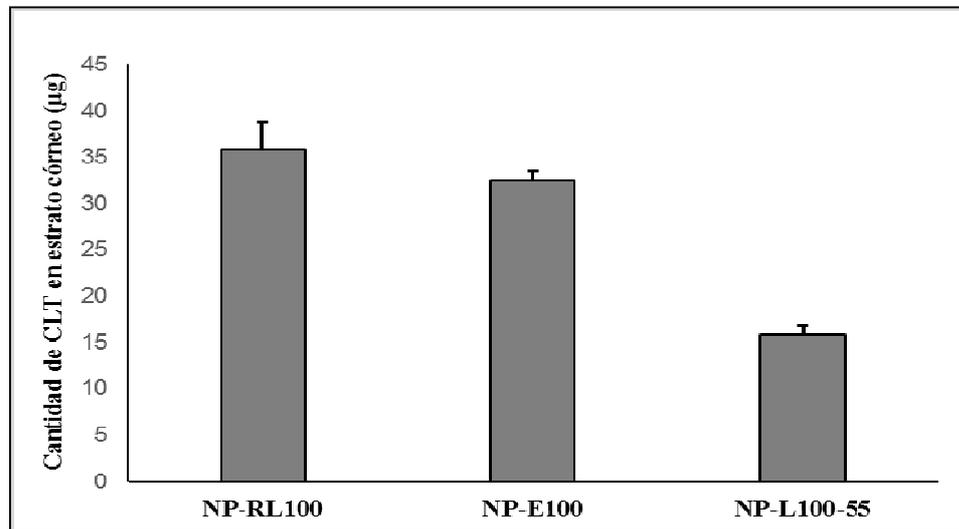


Figura 2. Cantidad acumulada del CLT en el estrato córneo después de la aplicación de tres formulaciones de NP durante 1 hora. (Media±DE n=4).

CONCLUSIÓN

Tomando en cuenta la carga negativa que posee la superficie de la piel, se prepararon tres formulaciones de NP con diferente densidad de carga superficial NP-E100 (carga positiva), NP-L100-55 (carga negativa) y NP-RL100 (carga neutra). Se observó que las partículas con carga positiva mostraron una atracción por la superficie de la piel, lo que les permitió favorecer la liberación del CLT sobre la superficie del estrato córneo de la piel. Confirmando que la densidad de carga superficial de las partículas favorece el depósito y liberación de principios activos sobre la piel.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Inicialmente, se obtuvieron los aceites esenciales de *Magnolia grandiflora*, *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* y se caracterizaron físicamente (i.e. densidad, índice de refracción y actividad óptica), estos parámetros permitieron definir que los aceites esenciales cumplían con las evaluaciones rutinarias de control de calidad empleadas comúnmente. En cuanto a la caracterización química, mediante CG-EM y CG-FID, se estableció la presencia de 31, 32 y 22 compuestos para los aceites esenciales de *M.grandiflora*, *T.vulgaris* y *O.vulgare*, respectivamente. La presencia de compuestos oxigenados permitió inferir sobre el potencial biológico de los aceites para ser empleados en una aplicación dérmica.

Posteriormente, se obtuvieron formulaciones de nanocápsulas que contenían a los aceites de manera individual. Estas presentaron diámetros óptimos (136-200 nm) los cuales aseguran la deposición de las nanocápsulas en la superficie de la piel. Así mismo, el potencial zeta que presentaron dichas formulaciones favoreció la interacción nanocápsula con la superficie y, en consecuencia, facilitó la deposición del principio activo en la superficie de la piel. Además, las formulaciones fueron físicamente estables al menos por tres meses.

Con respecto a los ensayos biológicos, en los estudios toxicológicos se estableció que la nanoencapsulación de aceites esenciales disminuye su efecto citotóxico, particularmente, se determinó que no son capaces de inducir un efecto fototóxico en la línea celular HaCaT. Con esto se evidenció que las formulaciones de nanocápsulas eran seguras para ser administradas de forma tópica como una alternativa en el tratamiento de las micosis superficiales.

En cuanto a la actividad antifúngica, se determinó que los aceites esenciales de *T. vulgaris* y *O. vulgare*, presentaban actividad antidermatofítica a 175 y 125 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, contra *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T.*

rubrum y *E. floccosum*. Además, el proceso de nanoencapsulación no afectó la actividad antidermatofítica de los dos aceites contra al menos cuatro de los seis dermatofitos.

Se estableció que la nanoencapsulación de los aceites esenciales favorece la deposición de los componentes más volátiles en la superficie de la piel, en las primeras 6 h; además, la deposición de los componentes menos volátiles fue favorecida en la piel, después de 24 h. De esta forma se evidenció la propiedad protectora de los sistemas nanoparticulados, así mismo, se expuso la capacidad de liberar de forma controlada los aceites esenciales contenidos en dichas formulaciones de nanocápsulas.

Finalmente, se estableció que en las nanopartículas cargadas con clotrimazol, la tasa de encapsulación y el número de partículas en contacto con la piel, influyen directamente en la acumulación del CLT en la superficie de la piel. Sin embargo, la densidad de carga superficial de las nanopartículas es un factor clave en la interacción con la piel favoreciendo la deposición de las nanopartículas con carga positiva en la superficie de la piel asegurando su efecto antimicótico.

En conclusión, las formulaciones de nanocápsulas cargadas con los aceites esenciales fueron capaces de inhibir el crecimiento de cepas de dermatofitos, así como, favorecer la deposición de los aceites sobre las diferentes capas de la piel y, adicional a esto, no fueron capaces de inducir ni efecto citotóxico, ni fototóxico. De esta forma, las formulaciones de nanocápsulas desarrolladas en el presente trabajo son una alternativa con un elevado potencial para ser empleadas como coadyuvantes para mejorar el tratamiento de las micosis superficiales

IX. PERSPECTIVAS

Esta investigación pone en evidencia el uso potencial de nanopartículas como alternativa en el tratamiento de infecciones en la piel causadas por dermatofitos. Ya que, se obtuvieron formulaciones de NC con un elevado potencial para ser administradas de forma segura, además de conservar su efecto antifúngico a pesar de los procesos de manipulación durante su formulación. Por último, estas formulaciones fueron capaces de penetrar y depositarse en la superficie de la piel. Aunque es necesario realizar estudios más profundos sobre las formulaciones de NC en función de su actividad *in vivo*, actividad antifúngica, citotoxicidad y liberación. Este proyecto permitió dar la pauta para entender ciertos rasgos y características que poseen este tipo de formulaciones como potenciales vehículos acarreadores de productos naturales biológicamente activos.

X. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA - ANTECEDENTES

- Álvarez M, Isaza G, Acosta S, Yepes A. 2005. Actividad antimicótica de *Phenax rugosus* (lam) pers y *Baccharis trinervis* (sw) wedd. Biosalud 14:38 – 45.
- Beck R, Guterres S, Pohlmann A. 2011. Transport of Substances and Nanoparticles across the Skin and *in vitro* Models to Evaluate Skin Permeation and/or Penetration In: Nanocosmetics and Nanomedicines: Approaches for Skin Care. Springer Science Business Media. Berlín, pp. 3-35.
- Benson H, Watkinson A. 2011. Skin Structure, Function, and Permeation. In: Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice. John Wiley & Sons, Inc. Nueva Jersey, pp. 3-22.
- Borgers M, Degreef H, Cauwenbergh G. 2005. Fungal infections of the skin: infection process and antimycotic therapy. Current Drug Targets 6(8):849-862.
- Brown M, Traynor M, Martin G, Akomeah F. 2008. Transdermal drug delivery systems: skin perturbation devices. Methods in Molecular Biology 437:119-139.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology 94(3):223-253.
- Das K, Tiwari R, Shrivastava D. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research 4:104-111.
- Ehrhardt C, Kim KJ. 2008. Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing. In: Drug Absorption Studies: *In Situ*, *In Vitro* and *Silico Models*. Springer Science. New York, pp. 3-33.
- Esposito E, Ravani L, Contado C, Costenaro A, Drechsler M, Rossi D, Menegatti E, Grandini A, Cortesi R. 2013. Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration. Materials Science Engineering C 33(1):411-48.

- Faulí T.C. 1995. Sistemas terapéuticos de administración transdérmica. En: Tratado de Farmacia Galénica. Ed. Luzan 5. Madrid, pp. 649-665.
- Fernández Alonso R, González García ME, Fernández García J, Cepeda Piorno FJ. 2005. Anti-fungal drugs. Current status and guidelines for their administration. *Clinical and Translational Oncology* 7(9):377-388.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *International Journal Pharmaceutics* 55:R1-R4.
- Flores FC, de Lima JA, Ribeiro RF, Alves SH, Rolim CM, Beck RC, da Silva CB. 2013. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia* 175(3-4):281-286.
- Grumezescu A. 2016. Nanoencapsulation of Essential Oils for Sustained Release: Application as Therapeutics and Antimicrobials. In: Encapsulations, Nanotechnology in the Agry-Food Industry Volume 2. Academic Press. London, pp 641-672.
- Gupta AK, Einarson TR, Summerbell RC, Shear NH. 1998. An overview of topical antifungal therapy in dermatomycoses. A North American perspective. *Drugs* 55(5):645-674.
- Hadgraft J, Guy R.H. 1989. The *in vitro* Evaluation of Transdermal Delivery. In: *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*. Marcel Dekker, inc. Mishigan, pp.177-193
- Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F. 2013. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers* 95(1):50-56.
- Kayser O, Lemke A, Hernández-Trejo N. 2005. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 6:3-5.
- Kim S.H, Cho S.H, Youn S.K, Park J.S, Choi J.T, Bak Y.S, Yu Y.B, Kim Y.K. 2015. Epidemiological Characterization of Skin Fungal Infections Between the Years 2006 and 2010 in Korea. *Osong. Public Health and Research Perspectives* 6(6):341-345.

- Kumari B, Kesavan K. 2017. Effect of chitosan coating on microemulsion for effective dermal clotrimazole delivery. *Pharmaceutical Development Technology* 22(4):617-626.
- Maheshwari RG, Tekade RK, Sharma PA, Darwhekar G, Tyagi A, Patel RP, Jain DK. 2012. Ethosomes and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of clotrimazole: A comparative assessment. *Saudi Pharmaceutical Journal* 20(2):161-170.
- Maibach H, Honari G. 2014. Skin Structure and Function. In: *Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects*. Academic Press. San Diego, pp 1-14.
- Manzano-Gayosso P. 2008. Las micosis superficiales: su relevancia médica y socioeconómica. *Gaceta Médica Mexicana* 144(2):123-124.
- Marwah H, Garg T, Goyal AK, Rath G. 2016. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Delivery* 23(2):564-578.
- Marwah R., Fatope M, Deadman M, Ochei J, Al-Saidi S. 2007. Antimicrobial activity and the major components of the essential oil of *Plectranthus cylindraceus*. *Journal of Applied Microbiology* 103:1220-1226.
- Mohanraj V. J, Chen Y. 2006. Nanoparticles – A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5(1):561-573.
- Molina de Diego A. 2011. Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of dermatophytosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29 Suppl 3:33-39.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385(1-2):113-42.
- Paradkar M, Thakkar V, Soni T, Gandhi T, Gohel M. 2015. Formulation and evaluation of clotrimazole transdermal spray. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 41(10):1718-1725.
- Pareja B. 2004. Aspectos biofarmacéuticos de las preparaciones dermatológicas. *Folia Dermatológica Peruana* 15(1):49-52.
- Pengelly A. 2004. Essential Oils and Resins. In: *The Constituents of Medicinal Plants. An Introduction to the Chemistry and Therapeutics of Herbal Medicine*. Allen & Unwin. Australia, pp. 85-109.

- Ponce A, Buera M, Elizalde B. 2010. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering* 99(1):70–75.
- Raut J.S, Karuppayil S.M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62: 250–264.
- Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. 2001. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics* 215(1-2):51-56.
- Singla R, Choe E, Lee C. 2002. Effects of calcium modulation on percutaneous absorption of a model drug. *Pharmaceutical Research* 19 (9):1381-1386.
- Solich P, Hájková R, Pospíšilová M, Šícha J. 2002. Determination of methylparaben, propylparaben, clotrimazole and its degradation products in topical cream by RP-HPLC. *Chromatographia* 56(1):S181–S184.
- Takahashi M. 2002. Recent progress in skin bioengineering and its application to evaluation of skin care cosmetics. *Journal of Society of Cosmetic Chemists of Japan* 36(2):93-101.
- Thormar H. 2011. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In: *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 204-223.
- Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. 2016. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 107:163-175.
- Vena GA, Chieco P, Posa F, Garofalo A, Bosco A, Cassano N. 2012. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. *New Microbiologica* 35(2):207-213.
- Vilata J.J. 2006a. Concepto y Clasificación. En: *Micosis Cutáneas*, Ed. Médica Panamericana. Madrid, pp. 29-35.
- Vilata J.J. 2006b. Farmacología de los antifúngicos Imidazólicos. En: *Micosis Cutáneas*, Ed. Médica Panamericana. Madrid, pp. 163-172.

- Villarino N, Landoni M. 2006. Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. *Analecta Veterinaria* 26(1):28-37.
- Wattanasatcha A, Rengpipat S, Wanichwecharungruang S. 2012. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics* 434:360-365.

BIBLIOGRAFÍA – CAPÍTULO 1

- Aazza S, Lyoussi B, Megías C, Cortés-Giraldo I, Vioque J, Figueiredo A.C, Miguel M.G 2014. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of Moroccan commercial essential oils. *Natural Product Communications* 9:587-594.
- Abu-Darwish M.S, Cabral C, Ferreira I.V, Goncalves M.K, Cavaleiro C, Cruz M.T, Al-bdour T.H, Salgueiro L. 2013. Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *BioMed Research International* 538940.
- Adams R.P. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Fourth ed., Allured, Publishing Corporation. Illinois.
- Alvarez-Román R, Naik A, Kalia N.Y, Guy R.H, Fessi H. 2010. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles *Journal of Controlled Release* 99:53-62.
- Amaral L.F, Moriel P, Foglio M.A, Mazzola P.G. 2014. Evaluation of the cytotoxicity and phototoxicity of *Caryocar brasiliense* supercritical carbon dioxide extract. *BMC Complementary & Alternative Medicine* 14:2-6.
- Balzus B, Sahle F.F, Hönzke S, Gerecke C, Schumacher F, Hedtrich S, Kleuser B, Bodmeier R. 2017. Formulation and *ex vivo* evaluation of polymeric nanoparticles for controlled delivery of corticosteroids to the skin and the corneal epithelium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 115:122-130.

- Borenfreund E, Puerner J.A. 1985. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 24:119–124.
- Boukamp P, Petrussevska R.T, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig N.E. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* 106:761-71.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:1822-1828.
- Cabral C, Francisco V, Cavaleiro C, Gonçalves M.J, Cruz M.T, Sales F, Batista M.T, Salgueiro L. 2012. Essential oil of *Juniperus communis* subsp. *alpina* (Suter) Čelak needles: chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Phytotherapy Research* 26:1352-1357.
- Casas J.W, Lewerenz G.M, Rankin E.A, Willoughby Sr J.A, Blakeman L.C, McKim Jr M.J, Coleman K.P. 2013. *In vitro* human skin irritation test for evaluation of medical device extracts. *Toxicology In Vitro* 27:2175-2183.
- De Oliveira E.F, Paula H.C, de Paula R.C. 2014. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113:146-151.
- Dorman H.J, Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:308-316.
- Ephrem E, Greige-Gerges H, Fessi H, Charcosset C. 2014. Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *Journal of Microencapsulation* 31:746-753.
- Ermolli M, Menné C, Pozzi G, Serra M.A, Clerici L.A. 2001. Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human hacat keratinocytes. *Toxicology*. 159:23-31.
- Facchi S.P, Scariot D.B, Bueno P.V, Souza P.R, Figueiredo L.C, Follmann H.D, Nunes C.S, Monteiro J.P, Bonafé E.G, Nakamura C.V, Muniz E.C, Martins A.F. 2016 Preparation and cytotoxicity of N-modified chitosan nanoparticles applied

in curcumin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 87:237-245.

- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J.Ph, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55:R1-R4.
- Grecco Sdos S, Martins E.G, Girola N, de Figueiredo C.R, Matsuo A.L, Soares M.G, Bertoldo Bde C, Sartorelli P, Lago J.H. 2014. Chemical composition and in vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Nectandra leucantha* leaves. *Pharmaceutical Biology* 53:133-137.
- Guerra-Boone L, Alvarez-Román R, Salazar-Aranda R, Torres-Cirio A, Rivas-Galindo V.M, Waksman de Torres N, González G.M, Pérez-López L.A. 2013. Chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils from *Magnolia grandiflora*, *Chrysactinia mexicana*, and *Schinus molle* found in northeast Mexico. *Natural Product Communications* 8:135-138.
- Hosseini S.F, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F. 2013. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers* 95:50-56.
- Kucekova Z, Humpolicek P, Kasparikova V, Perecko T, Lehocký M, Hauerlandová I, Sába P, Stejskal J. 2014. Colloidal polyaniline dispersions: antibacterial activity, cytotoxicity and neutrophil oxidative burst. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 116:411-417.
- Kuskov A.N, Kulikov P.P, Shtilman M.I, Rakitskii V.N, Tsatsakis A.M. 2016. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles: Cytotoxicity and acute toxicity study. *Food and Chemical Toxicology* 96:273-279.
- Lemoine D, Francois C, Kedzierewicz F, Preat V, Hoffman M, Maincent P. 1996. Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 17: 2191-2197.
- Marcato P.D, Caverzan J, Rossi-Bergmann B, Pinto E.F, Machado D, Silva R.A, Justo G.Z, Ferreira C.V, Durán N. 2011. Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 11:1880-1886.

- Marquis B.J, Love S.A, Braun K L, Haynes C.L. 2009. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* 134:425–439.
- Mattu C, Pabari R.M, Boffito M, Sartori S, Ciardelli G, Ramtoola Z. 2013. Comparative evaluation of novel biodegradable nanoparticles for the drug targeting to breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85:463-472.
- Mora-Huertas C.E, Fessi H, Elaissari A. 2011. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science* 163:90-122.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.
- Nogueira D.R, Morán M.C, Mitjans M, Martínez V, Pérez L, Vinardell M.P. 2013. New cationic nanovesicular systems containing lysine-based surfactants for topical administration: Toxicity assessment using representative skin cell lines. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 83:33-43.
- OECD, Test No. 432: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Publishing, Paris, 2004. [Online]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071162-en>
- Özkan A, Erdoğan A. 2011. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turkish Journal of Biology* 35:735-742.
- Park J, Lee J, Jung E, Park Y, Kim K, Park B, Jung K, Park E, Kim L, Park D. 2004. *In vitro* antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium sp.* *European Journal of Pharmacology* 496:189-195.
- Rajnochová Svobodová A, Zálešák B, Biedermann D, Ulrichová J, Vostálová J. 2016. Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 156:61-68.

- Robbens J, Vanparys C, Nobels I, Blust R, Van Hoecke K, Janssen C, De Schamphelaere K, Roland K, Blanchard G, Silvestre F, Gillardin V, Kestemont P, Anthonissen R, Toussaint O, Vankoningsloo S, Saout C, Alfaro-Moreno E, Hoet P, Gonzalez L, Dubruel P, Troisfontaines P. 2010. Eco-, geno- and human toxicology of bio-active nanoparticles for biomedical applications. *Toxicology*. 269:170-181.
- Ryle C.M, Breitzkreutz D, Stark H.J, Leigh I.M, Steinert P.M, Roop D, Fusenig N.E. 1989. Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation* 40:42-54.
- Sahle F.F, Gerecke C, Kleuser B, Bodmeier R. 2017. Formulation and comparative *in vitro* evaluation of various dexamethasone-loaded pH-sensitive polymeric nanoparticles intended for dermal applications. *International Journal of Pharmaceutics* 516:21-31.
- Sanchez L, Mitjans M, Infante M.R, Vinardell M.P 2004. Assessment of the potential skin irritation of lysine-derivative anionic surfactants using mouse fibroblasts and human keratinocytes as an alternative to animal testing. *Pharmaceutical Research* 21:1637-1641.
- Sanchez L, Mitjans M, Infante M.R, Vinardell M.P. 2006a. Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability. *Toxicology Letters* 161:53-60.
- Sanchez L, Mitjans M, Infante M.R, Vinardell M.P. 2006b. Determination of interleukin-1alpha in human NCTC 2544 keratinocyte cells as a predictor of skin irritation from lysine-based surfactants. *Toxicology Letters* 167:40-46.
- Sertel S, Eichhorn T, Plinkert P.K, Efferth T. 2011. Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer Research* 31:81-87.
- Shim J, Seok Kang H, Park W.S, Han S.H, Kim J, Chang I.S. 2004. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 97:477-484.

- Vági E, imáncsi B, Suhajda Á, Héthelyi É. 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International* 38:51-57.
- Vaughn A.R, Sivamani R.K, Sivamani M.D. 2015. Effects of Fermented Dairy Products on Skin: A Systematic Review, *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 21:380-385.
- Velázquez-Dávila L.A, Galindo-Rodríguez S.A, González-González M.G, Pérez-López L.A, Álvarez-Román R. 2017. Modificación de la técnica *poisoned food technique* para el uso de aceites esenciales en la evaluación de la susceptibilidad a los dermatofitos. *Journal of Essential Oil Research (to be submitted)*.
- Vinardell M.P, Mitjans M. 2008. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:46-59.
- Wattanasatcha A, Rengpipat S, Wanichwecharungruang S. 2012. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics* 434:360-365.
- Williams A.C, Barry B.W. 1989 Essential oils as novel human skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* 57:R7-R9.
- Wu X, Landfester K, Musyanovych A, Guy R.H. 2010. Disposition of charged nanoparticles after their topical application to the skin. *Skin Pharmacology and Physiology* 23:117-123.
- Zanatta C.F, Mitjans M, Urgatondo V, Rocha-Filho P.A, Vinardell M.P. 2010. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. *Food and Chemical Toxicology* 48:70-75.

BIBLIOGRAFÍA – CAPÍTULO 2

- Borgers M, Degreef H, Cauwenbergh G. 2005. Fungal infections of the skin: infection process and antimycotic therapy. *Current Drug Targets* 6(8):849-862.
- Cal K, Sznitowska M. 2003. Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes-*in vitro* studies. *Journal of Controlled Release* 93(3):369-76.

- Cal K. 2006. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta Medica* 72(4):311-316.
- Contri R.V, Kulkamp-Guerreiro I.C, da Silva S.J, Frank L.A, Pohlmann A.R, Guterres S.S. 2016. Nanoencapsulation of rose-hip oil prevents oil oxidation and allows obtainment of gel and film topical formulations. *AAPS PharmSciTech* 17(4):863-871.
- De Oliveira EF, Paula HC, de Paula RC. 2014. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113:146-151.
- El-Kattan A.F, Asbill C.S, Kim N, Michniak B.B. 2001. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. *International Journal of Pharmaceutics* 215(1-2):229-240.
- Esmaeili A, Asgari A. 2015. *In vitro* release and biological activities of *Carum copticum* essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 81:283-290.
- Fernández Alonso R, González García M.E, Fernández García J, Cepeda Piorno FJ. 2005. Anti-fungal drugs. Current status and guidelines for their administration. *Clinical & Translational Oncology* 7(9):377-388.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J.Ph, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55:R1-R4.
- Flores F.C, de Lima J.A, Ribeiro R.F, Alves S.H, Rolim C.M, Beck R.C, da Silva C.B. 2013. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia* 175(3-4):281-286.
- Förster M, Bolzinger M.A, Fessi H, Briançon S. 2009. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. *European Journal of Dermatology* 19(4):309-323.
- Guerra-Boone L, Álvarez-Román R, Salazar-Aranda R, Torres-Cirio A, Rivas-Galindo V, Waksman-de Torres N, González-González G, Pérez-López L. 2015. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* and *Origanum*

majorana from northeastern México. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 28:363-369.

- Guy R.H. 2010. Predicting the rate and extent of fragrance chemical absorption into and through the skin. Chemical Research in Toxicology 23(5):864-870.
- Karami Z, Rezaeian I, Zahedi P, Abdollahi M. 2013. Preparation and performance evaluations of electrospun poly(ϵ -caprolactone), poly(lactic acid), and their hybrid (50/50) nanofibrous mats containing thymol as an herbal drug for effective wound healing. Journal of Applied Polymer Science 129, 756-766.
- Lima B, López S, Luna L, Agüero MB, Aragón L, Tapia A, Zacchino S, López ML, Zygadlo J, Feresin GE. 2011. Essential oils of medicinal plants from the central andes of Argentina: chemical composition, and antifungal, antibacterial, and insect-repellent activities. Chemistry & Biodiversity 8(5):924-936.
- Lucia A, Zerba E, Masuh H. 2013. Knockdown and larvicidal activity of six monoterpenes against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their structure-activity relationships. Parasitology Research 112(12):4267-4272.
- Molina de Diego A. 2011. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 29(3):33-39.
- Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves M.J, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Journal of Medical Microbiology 55(Pt 10):1367-1373.
- Šegvić Klarić M, Kosalec I, Mastelić J, Piecková E, Pepeljak S. 2007. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. Letters in Applied Microbiology 44(1):36-42.
- Singh S, Singh M, Tripathi C.B, Arya M, Saraf S.A. 2016. Development and evaluation of ultra-small nanostructured lipid carriers: novel topical delivery system for athlete's foot. Drug Delivery and Translational Research 6(1):38-47.
- Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. 2016. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. Advanced Drug Delivery Reviews 107:163-175.

- Velázquez-Dávila L.A, Galindo-Rodríguez S.A, González-González M.G, Álvarez-Román R. 2017. Evaluación de susceptibilidad de dermatofitos con aceites esenciales por la técnica *poisoned food technique* modificada. *Journal of Essential Oil Research (to be submitted)*.
- Velázquez-Dávila L.A, Galindo-Rodríguez S.A, Mitjans M, Vinardell M.P, Álvarez-Román R. 2017. Mejoramiento de la seguridad de aceites esenciales para su aplicación tópica mediante el uso de nanotecnología. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (to be submitted)*.
- Vena GA, Chieco P, Posa F, Garofalo A, Bosco A, Cassano N. 2012. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. *New Microbiologica* 35(2):207-213.
- Wattanasatcha A, Rengpipat S, Wanichwecharungruang S. 2012. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics* 434:360-365.

• **BIBLIOGRAFÍA – CAPÍTULO 3**

- Abdel-Mottaleb MM, Moulari B, Beduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. 2012. Surface-charge-dependent nanoparticles accumulation in inflamed skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101(11):4231-4239.
- Álvarez-Román R, Cavazos-Rodríguez M.R, Chávez-Montes A, Castro-Ríos R, Waksman-de-Torres N, Salazar-Cavazos M.L, Galindo-Rodríguez S.A. 2012. Formulación y caracterización de nanocápsulas con un antioxidante natural para su aplicación cutánea. *Química Hoy Chemistry Sciences* 4:29-35.
- Bhatta RS, Chandasana H, Chhonker YS, Rathi C, Kumar D, Mitra K, Shukla PK. 2012. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: *In vitro* and pharmacokinetics studies. *International Journal of Pharmaceutics* 432(1-2):105-112.
- Essa S, Louhichi F, Raymond M, Hildgen P. 2013. Improved antifungal activity of itraconazole-loaded PEG/PLA nanoparticles. *Journal of Microencapsulation* 30(3):205-217.

- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J.Ph, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55:R1-R4.
- Galindo-Rodríguez S.A, Puel F, Briançon S, Allémann E, Doelker E, Fessi H. 2005. Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 25(4-5):357-67.
- International Conference on Harmonization (ICH), Q2(R1): validation of analytical procedures: text and methodology, 2016. [Online]. Disponible en:http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelins/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.
- Jung S, Otberg N, Thiede G, Richter H, Sterry W, Panzner S, Lademann J. 2006. Innovative liposomes as a transfollicular drug delivery system: penetration into porcine hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology* 126(8):1728-32.
- Kumawat P, Jagadish PC, Muddukrishna, Bhat K. 2014. Development and validation of stability indicating hplc method for clotrimazole lozenges formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(1): 126-129.
- Luzardo-Alvarez A, Rodríguez-Fernández M, Blanco-Méndez J, Guy RH, Delgado-Charro MB. 1998. Iontophoretic permselectivity of mammalian skin: characterization of hairless mouse and porcine membrane models. *Pharmaceutical Research* 15(7):984-7.
- Marwah H, Garg T, Goyal AK, Rath G. 2016. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Delivery* 23(2):564-578.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385(1-2):113-42.
- Mora-Huertas C.E, Fessi H, Elaissari A. 2011. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science* 163:90-122.

- Paradkar M, Thakkar V, Soni T, Gandhi T, Gohel M. 2015. Formulation and evaluation of clotrimazole transdermal spray. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 41(10):1718-25.
- Romero M, Cantón E, Pemán J, Gobernado M. 2004. Estudio de la actividad *in vitro* de caspofungina sobre especies de levaduras diferentes de *Candida albicans*, determinada por dos métodos: M27-A2 y EUCAST. *Revista Española de Quimioterapia* 17(3):257-262.
- Smith PJ, Giroud M, Wiggins HL, Gower F, Thorley JA, Stolpe B, Mazzolini J, Dyson RJ, Rappoport JZ. 2012. Cellular entry of nanoparticles via serum sensitive clathrin-mediated endocytosis, and plasma membrane permeabilization. *International Journal of Nanomedicine*. 7:2045-2055.
- Tang J, Xu N, Ji H, Liu H, Wang Z, Wu L. 2011. Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment. *International Journal of Nanomedicine* 6:2429-35.
- Vena GA, Chieco P, Posa F, Garofalo A, Bosco A, Cassano N. 2012. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. *New Microbiologica* 35(2):207-213.
- Vilata J.J. 2006. Farmacología de los Antifúngicos Imidazólicos. En: *Micosis Cutáneas*, Ed. Médica Panamericana. Madrid, pp. 163-172.
- Wu X, Landfester K, Musyanovych A, Guy R.H. 2010. Disposition of charged nanoparticles after their topical application to the skin. *Skin Pharmacology and Physiology* 23:117-123.

ANEXO II

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

- Velázquez-Dávila L.A, Galindo-Rodríguez S.A, Pérez-López L.A, González-González G.M, Rivas-Morales C, Waksman-de Torres N, Álvarez-Román R. **“Cuantificación de un agente antimicótico en estudios transdérmicos por cromatografía de líquidos de alta resolución”**. XXVIII Congreso Nacional de Química Analítica. Ixtapa, Guerrero, México. Junio 2015. Cartel.
- Velázquez-Dávila L.A, Galindo-Rodríguez S.A, Pérez-López L.A, Rivas-Morales C, Waksman-de Torres N, Álvarez-Román R. **“Factibilidad de un método por CG-FID con extracción en fase sólida para cuantificar el aceite esencial de *Thymus vulgaris* en nanocápsulas biodegradables”**. XXVII Congreso Nacional de Química Analítica. Puebla, México. Junio 2014. Cartel.
- Velázquez-Dávila L.A, Galindo-Rodríguez S.A, Pérez-López L.A, Rivas-Morales C, Waksman-de Torres N, Álvarez-Román R. **“Determinación del grado de penetración del aceite esencial de *Thymus vulgaris* nanoencapsulado para el tratamiento de micosis tópica”**. 10ª. Reunión Internacional en Investigación de Productos Naturales. Yucatán, México. Mayo 2014. Cartel.
- Velázquez Dávila L.A, Colin Oviedo Á, Chávez Montes A, Álvarez Román R, Galindo Rodríguez S.A. **“*In vitro* evaluation of the antifungal activity and skin penetration through pig skin of clotrimazole-loaded polymeric nanoparticles”**. 9th International Topical Meeting on Nanostructured Materials and Nanotechnology, NANOTECH2012. San Luis Potosí, México. Mayo 2013. Cartel.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Lily Adriana Velázquez Dávila

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: EVALUACIONES DERMATOCINÉTICAS Y ANTIMICÓTICAS
DE PRODUCTOS NATURALES INCORPORADOS EN
NANOCÁPSULAS BIODEGRADABLES

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 25 de noviembre de 1988, hija de Emiliano Velázquez Saucedo y María Teresa Dávila Carrizales.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2009.

Experiencia Profesional: Maestra de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2017.