

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**VALORACIÓN BIOFÍSICA DEL CARVACROL NANOENCAPSULADO PARA  
SU USO COMO DERMOPROTECTOR**

**POR**

**Q.B.P. NANCY NALLELY ESPINOSA CARRANZA**

**Como requisito para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO  
INTEGRAL DE RECURSOS BIÓTICOS**

**Enero, 2021**



**VALORACIÓN BIOFÍSICA DEL CARVACROL NANOENCAPSULADO PARA  
SU USO COMO DERMOPROTECTOR**

**Comité de Tesis**

---

**Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez**

Presidente

---

**Dra. Catalina Leos Rivas**

Secretaria

---

**Dr. Xristo Zárate Kalfópulos**

1.<sup>er</sup> vocal

---

**Dra. Catalina Rivas Morales**

2.<sup>o</sup> vocal

---

**Dra. María Julia Verde Star**

3.<sup>er</sup> vocal

**Enero, 2021**



**VALORACIÓN BIOFÍSICA DEL CARVACROL NANOENCAPSULADO PARA  
SU USO COMO DERMOPROTECTOR**

**Dirección de Tesis**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'S. Galindo'.

---

**Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez**

Director

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Álvarez Román'.

---

**Dra. Rocío Álvarez Román**

Directora externa

**Enero, 2021**

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y al posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, por las facilidades otorgadas para realizar mi maestría en Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero durante la realización de mis estudios de posgrado (No. CVU 950161).



## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

**Gracias a Dios**, por darme la salud, la fuerza y la paciencia para llegar a estas instancias.

**A mis padres Jaime y Claudia**, les agradezco infinitamente su apoyo en la realización de mis sueños. Gracias por enseñarme a volar, impulsarme a volar, acompañarme en el vuelo y nunca cortarme las alas. La vida me dio los mejores papás del mundo y soy muy afortunada de tenerlos conmigo, de contar con su amor, comprensión y ejemplo. Los amo.

**A mi hermana Verónica**, que me ha brindado su soporte durante todos estos años. Gracias porque ante las situaciones difíciles hemos permanecido unidas y hemos luchado por salir adelante.

**A mi novio Miguel Muro**, por creerme capaz de recorrer caminos que ni siquiera imaginaba. Gracias por ser parte de mi vida y por permitirme ser parte de la tuya. Juntos somos un gran equipo.

**A mi director de tesis el Dr. Sergio Galindo**, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo. Gracias por sus enseñanzas, por su tiempo y por permitirme trabajar en un marco de confianza y libertad. **A mi directora externa la Dra. Rocío Álvarez**, por todo su tiempo dedicado a enseñarme cada una de las técnicas que utilizamos. Gracias por su disposición durante la redacción de esta tesis y por su contribución invaluable para hacer brillar este trabajo. **Muchas gracias Dr. Sergio y Dra. Rocío**, por el apoyo brindado en estos años y por el ejemplo científico que de ahora en adelante llevaré conmigo.

A mi querido NanoTeam, **Natalia, Jesús, Mariela, Miguel, Karina y Michel**, con quienes compartí momentos llenos de risas y conversaciones interesantes. Gracias a todos por hacer más amena la carga de trabajo. De forma muy especial me gustaría agradecer a **Anahí** por su valiosa amistad, su apoyo y las enriquecedoras pláticas con café. A **Mizael** por su bonita compañía durante las largas horas de trabajo, sus aportaciones y por escucharme siempre. A **Andrés** por su disposición para ayudarme a resolver alguna duda

o brindarme un consejo. Gracias por tu tiempo, tus palabras de ánimo y sobretodo por tu amistad.

A **Cynthia**, por enseñarme que un amigo no es cualquiera, sino quien lo demuestra. Gracias por tu cariño y tu apoyo incondicional.

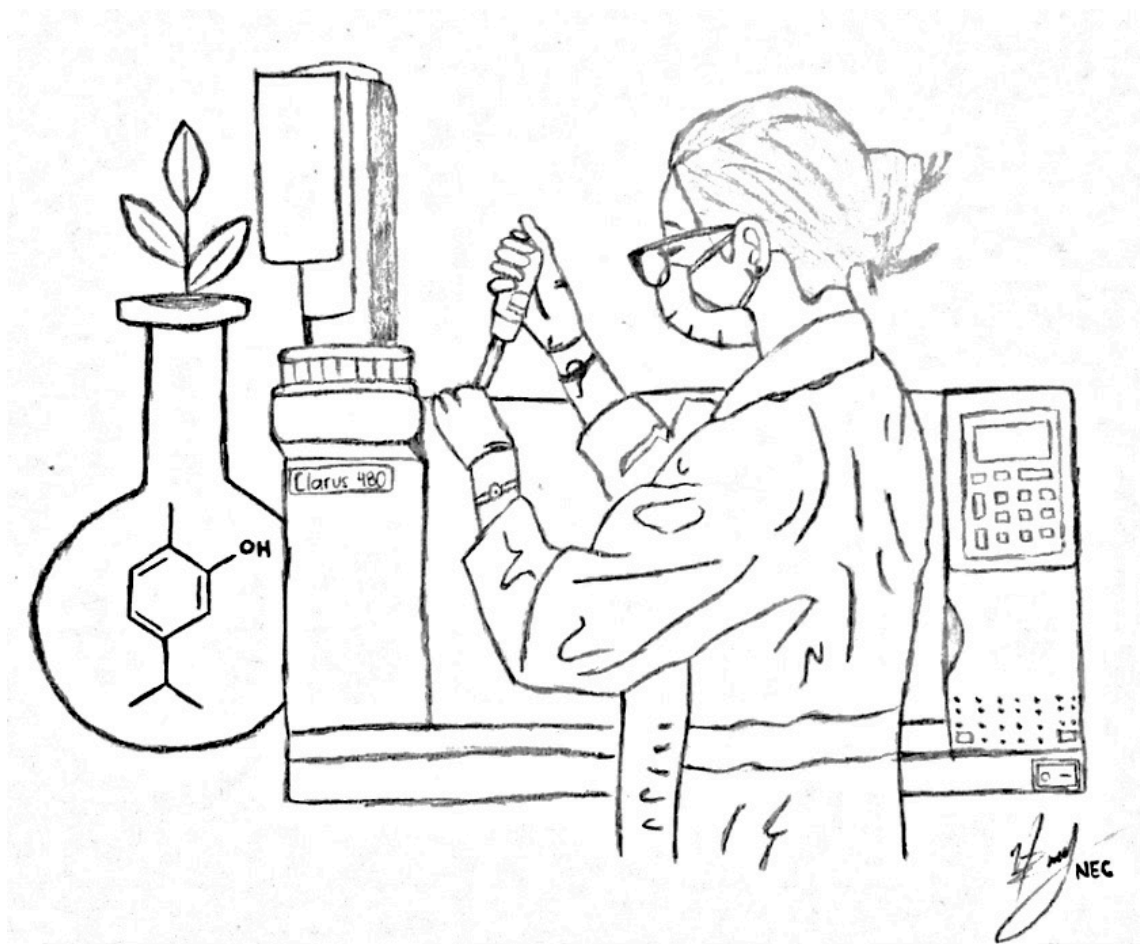
A **Cristian**, por escucharme siempre, por preguntarme como va mi trabajo, por tus palabras alentadoras y por hacerme reír con tus mensajes de voz.

A **Humberto, Alexia y Gis**, mis hermanos de otra sangre. Gracias por esta amistad de tantos años en la que nos hemos convertido en familia. Gracias porque en medio de las dificultades siempre me he sentido acompañada por ustedes.

A todos ustedes que compartieron conmigo la realización de esta tesis, **muchas gracias**.

## DEDICATORIA

A mis padres  
Jaime & Claudia



“Hazte un camino, písalo bien. Sé fiel en lo que crees, en lo que piensas, fortalece tu filosofía de vida, encuentra personas que combinen con tu mente, elige corazones sanos, ve perdonando, no te atores en el lodo, sal rápido, aprovecha tu tiempo, ten paciencia contigo, cuidate, ten metas, muchas metas, porque esas metas son las que te mantendrán siempre viviendo”. Anónimo.

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
4. ANTECEDENTES .....	5
4.1. La piel como sistema de protección .....	5
4.2. Cáncer de piel y factores de riesgo .....	7
4.3. Aceites esenciales .....	10
4.4. Carvacrol como dermoprotector .....	11
4.5. Nanotecnología .....	13
4.6. Valoración biofísica de la piel .....	16
4.6.1. Pérdida de agua transepidérmica cutánea .....	16
4.6.2. Hidratación cutánea .....	17
4.6.3. pH cutáneo .....	18
4.6.4. Contenido de sebo en la piel .....	18
5. JUSTIFICACIÓN .....	19
6. HIPÓTESIS .....	20
7. OBJETIVOS .....	21
8. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
8.1. Obtención y caracterización fisicoquímica de NC con carvacrol .....	22
8.2. Desarrollo y validación de un método analítico por CG-FID para cuantificar el CRV en NC poliméricas .....	24
8.3. Determinación de la capacidad antioxidante del carvacrol .....	27
8.4. Valoración del efecto dermoprotector del carvacrol nanoencapsulado en un modelo de piel porcina por técnicas de bioingeniería y <i>tape stripping</i> .....	29
9. RESULTADOS .....	32
10. DISCUSIÓN .....	44
11. CONCLUSIONES .....	59
12. PERSPECTIVAS .....	60
13. BIBLIOGRAFÍA .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PAG</b>
1	Características fisicoquímicas de N-BCO y NC-CRV obtenidas por la técnica de nanoprecipitación.	32
2	Porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación de carvacrol.	35
3	Optimización del método por CG-FID por inyección directa para cuantificar el carvacrol.	35
4	Parámetros de validación del método para el carvacrol por CG-FID (inyección directa).	38
5	Parámetros biofísicos basales de la piel de cerdo.	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PAG
1	Daños en la piel generados por los radicales libres.	6
2	Penetración de la radiación UV en la piel.	9
3	Estructuras de los componentes de aceites esenciales.	11
4	Estructura química del carvacrol.	12
5	Representación esquemática de una nanocápsula y una nanoesfera	14
6	Preparación de las nanocápsulas con carvacrol por la técnica de nanoprecipitación.	22
7	Evaluación del tamaño de partícula (nm) e IP de las NC-CRV obtenidas por la técnica de nanoprecipitación durante 120 días de almacenamiento a 25 °C.	33
8	Evaluación de la densidad de carga de las NC-CRV obtenidas por la técnica de nanoprecipitación durante 120 días de almacenamiento a 25 °C.	33
9	Espectros de FT-IR del carvacrol (A), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (B), Tween 80 (C) y NC-CRV (D).	34
10	Cromatogramas de los estándares de (a) mentol, (b) eugenol y (c) carvacrol en metanol por CG-FID (inyección directa).	36
11	Cromatogramas de (a) mentol (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y (b) carvacrol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por CG-FID (inyección directa).	36
12	Cromatogramas obtenidos de la curva de calibración del carvacrol (25–400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con adición de estándar interno (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por CG-FID (inyección directa).	37
13	Capacidad antioxidante del estándar de carvacrol por los ensayos de ABTS <sup>+</sup> y DPPH.	38
14	Capacidad antioxidante de NC-CRV y NC-SBR por los ensayos de ABTS <sup>+</sup> y DPPH.	39

15	Valores de pérdida de agua transepidérmica antes y después de la aplicación de NP-BCO y NC-CRV durante 1, 2 y 4 h.	40
16	Valores de pH antes y después de la aplicación de NP-BCO y NC-CRV durante 1, 2 y 4 h.	41
17	Valores del contenido de agua en EC antes y después de la aplicación de NP-BCO y NC-CRV durante 1, 2 y 4 h.	41
18	Optimización de la técnica de <i>tape stripping</i> en piel de cerdo sin tratamiento.	42
19	Pérdida de agua transepidérmica (g/m <sup>2</sup> h) en función de la profundidad de EC acumulada (μm).	42
20	Cantidad de carvacrol en estrato córneo (μg/cm <sup>2</sup> ) en función de la profundidad acumulada después de la aplicación de la NC-CRV durante 4 h.	43
21	Estructura química de poli(ε-caprolactona).	46

## 1. RESUMEN

La piel, es el órgano más externo del cuerpo humano, por lo que está constantemente expuesta al daño ocasionado por la radiación ultravioleta (UV). Los rayos UV son capaces de inducir la generación de radicales libres (RL), los cuales pueden oxidar componentes celulares ocasionando daños en la piel y aumentando el riesgo de padecer enfermedades como el cáncer. No obstante, la piel cuenta con moléculas antioxidantes, pero al estar constantemente expuesta al daño oxidativo, resultan insuficientes por lo que es necesario el empleo de antioxidantes exógenos. De manera importante, se ha destacado el uso del carvacrol (CRV) como agente antioxidante. Sin embargo, su empleo está limitado debido a su volatilidad y susceptibilidad a degradarse por factores ambientales. Por lo tanto, se ha propuesto su nanoencapsulación para brindarle protección, controlar su liberación y mantener su actividad biológica sobre la piel. No obstante, la administración de compuestos activos en la piel requiere de formulaciones que no afecten la integridad de la barrera cutánea. En este contexto, el presente trabajo se orientó a evaluar el efecto de una formulación de nanocápsulas cargadas con CRV (NC-CRV) sobre las propiedades biofísicas de la piel para establecer su uso como dermoprotector. Primero, se obtuvieron NC-CRV mediante la técnica de nanoprecipitación con un tamaño de  $157.4 \pm 1.4$  nm, un índice de polidispersidad de  $0.109 \pm 0.024$  y un potencial zeta ( $\zeta$ ) de  $-8.88 \pm 0.846$  mV. Para cuantificar el CRV encapsulado se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de gases con detector de ionización de flama. Se determinó un porcentaje de eficiencia de encapsulación de  $28.39 \pm 1.70$  % y un porcentaje de encapsulación de  $13.19 \pm 0.85$  % para el CRV. La capacidad antioxidante del CRV, determinada por los métodos DPPH y ABTS<sup>+</sup>, se mantuvo después de su incorporación en las nanocápsulas. Finalmente, se evaluaron los efectos de la NC-CRV sobre la función barrera cutánea, midiendo la pérdida de agua transepidérmica, el pH y el contenido de agua del estrato córneo. Las NC-CRV no solo mantuvieron la integridad de la piel, sino que favorecieron su hidratación. Además, la deposición del agente antioxidante (CRV) en diferentes capas del estrato córneo podría contribuir a la protección de la piel del daño causado por RL. En general, la nanoencapsulación del CRV en las nanopartículas poliméricas permitió obtener una formulación que favoreció su interacción con la piel, además, de mantener íntegra su actividad antioxidante. En conclusión, las NC-CRV presentaron las características y propiedades adecuadas para su uso como agente dermoprotector.

## 2. ABSTRACT

The skin is the outermost organ of the human body, so it is constantly exposed to damage caused by ultraviolet (UV) radiation. The UV rays are capable of inducing the generation of free radicals (RL), which can oxidize cellular components causing damage to the skin and increasing the risk of diseases such as cancer. The skin has its own antioxidant molecules, however, they are insufficient when oxidative damage is continuous, so the administration of exogenous antioxidants is necessary. The use of carvacrol (CRV) as an antioxidant agent has been highlighted. However, its use is limited due to its volatility and susceptibility to degradation by environmental factors. Therefore, its nanoencapsulation has been proposed to provide protection, controlled release and maintain its biological activity on the skin. However, the administration of active compounds to the skin requires formulations that do not affect the integrity of the skin barrier. In this context, the present work was focused on evaluating the effect of a formulation of CRV loaded nanocapsules (NC-CRV) on the biophysical properties of the skin to establish its use as a skin protection agent. First, NC-CRV were obtained by the nanoprecipitation technique and they have a mean size of  $157.4 \pm 1.4$  nm, a polydispersity index of  $0.109 \pm 0.024$  and a zeta potential ( $\zeta$ ) of  $-8.88 \pm 0.846$  mV. Second, an analytical method by gas chromatography with a flame ionization detector was developed and validated to quantify the encapsulated CRV. Then, an encapsulation efficiency percentage of  $28.39 \pm 1.70$  % and an encapsulation percentage of  $13.19 \pm 0.85$  % were determined for the CRV. The antioxidant capacity of CRV, determined by the DPPH and ABTS<sup>+</sup> methods, was maintained after its incorporation into the nanocapsules. Finally, the effects of NC-CRV on skin barrier function were evaluated, measuring transepidermal water loss, pH, and water content of the stratum corneum. The NC-CRV not only maintained the integrity of the skin, but also promoted its hydration. Furthermore, the deposition of the antioxidant agent (CRV) in different layers of the stratum corneum could contribute to the protection of the skin from damage caused by RL. In general, the nanoencapsulation of CRV in the polymeric nanoparticles allowed obtaining a formulation that favored its interaction with the skin, in addition to maintaining its antioxidant activity. In conclusion, the NC-CRV presented the characteristics and properties suitable for use as a skin protection agent.

### 3. INTRODUCCIÓN

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano y uno de los órganos más complejos e importantes, principalmente, debido a su función como barrera biológica entre el organismo y el entorno. Su papel como conservador de la homeostasis interna es resultado directo de su estructura y composición, particularmente, de la parte más superficial de la epidermis, el estrato córneo (EC) (Lin *et al.*, 2018). Esta capa superficial es una estructura especializada compuesta por corneocitos embebidos en una matriz lipídica que mantiene la integridad de la barrera cutánea al retrasar la pérdida de agua transepidérmica (TEWL), impedir el ingreso de microorganismos patógenos o de sustancias tóxicas y ejercer como barrera fotoprotectora en contra de los efectos de la radiación UV (Rawlings & Harding, 2004).

La exposición a la UV es uno de los factores ambientales más importantes que afectan la fisiología de la piel, al ser de los principales responsables de la generación de RL, los cuales son especies altamente reactivas y muy inestables que ponen en peligro componentes celulares como el ADN, proteínas y lípidos, lo que da lugar al envejecimiento prematuro y a patologías como el cáncer (Geerligts, 2009). En particular, el cáncer de piel es una de las neoplasias con mayor importancia debido a que, en los últimos años, su incidencia ha ido en aumento, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial. Según el Observatorio Global de Cáncer (Globocan), en México el no melanoma es el quinto cáncer más frecuente con 8,501 casos, mientras que, el melanoma es el decimoctavo cáncer más común con 3,700 casos (INCan, 2019).

De forma natural, la piel cuenta con un complejo sistema de antioxidantes (e.g. superóxido dismutasa y catalasa) con la capacidad de neutralizar el proceso oxidativo ocasionado por los RL. Sin embargo, cuando éstos se forman de manera excesiva debido a la exposición prolongada a los rayos UV, y el cuerpo es incapaz de gestionarlo, es necesario el empleo de protectores solares, así como de antioxidantes exógenos (Hermund, 2018).

Actualmente, existe un creciente interés en el uso de compuestos de origen natural, como los aceites esenciales (AE), los cuales son mezclas de 20 a 60 componentes, obtenidos de una materia prima vegetal (e.g. flores, semillas, raíces, hojas, ramas). Los AE han presentado una relevante importancia para la industria agroalimentaria, farmacéutica y cosmética, ya que poseen diversas propiedades biológicas benéficas (Preedy, 2016). Entre los compuestos presentes en los AE, se encuentran los derivados de terpeno, generalmente, monoterpenos y sesquiterpenos, que pueden ser hidrocarburos (e.g. trementina, formada por  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno) y compuestos oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos, cetonas, lactonas, fenoles y fenol éteres) (Bilia *et al.*, 2018).

En particular, entre los monoterpenos oxigenados, destaca el CRV, el cual es un compuesto ampliamente estudiado por sus propiedades antibacterianas, antimicótica, antiviral, antiinflamatoria, antiséptica y, sobre todo, por su actividad antioxidante (Gavaric *et al.*, 2015). Químicamente, el CRV es un compuesto hidrofóbico, volátil e inestable ante la exposición al aire, la luz, la humedad y el calor (Asbahani *et al.*, 2015). Debido a estas características químicas, el uso del CRV se encuentra limitado, por lo que es necesario utilizar un vehículo que proteja y facilite su administración y posterior liberación en la piel, sin modificar sus propiedades antioxidantes. De esta manera surge la posibilidad de su incorporación en nanopartículas poliméricas (NP).

Las NP se definen como sólidos de tamaño submicrónico (i.e. 1-400 nm) que pueden ser preparados a partir de materiales macromoleculares sintéticos o naturales. En el caso de aplicaciones dérmica, la incorporación de compuestos biológicamente activos en NP conlleva diferentes ventajas, por ejemplo, incrementa su estabilidad, controla su liberación y mejora su distribución homogénea en la piel (Goik *et al.*, 2019). No obstante, la administración tópica de compuestos activos en NP requiere la evaluación de la integridad de la barrera cutánea mediante la determinación de los parámetros fisiológicos de la piel tras la aplicación de la formulación (Heinrich *et al.*, 2014). En este contexto, en el presente trabajo, se evaluó el efecto de una formulación de nanocápsulas con CRV sobre las propiedades biofísicas de la piel, a fin de establecer su uso potencial como agente dermatoprotector.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. La piel como sistema de protección

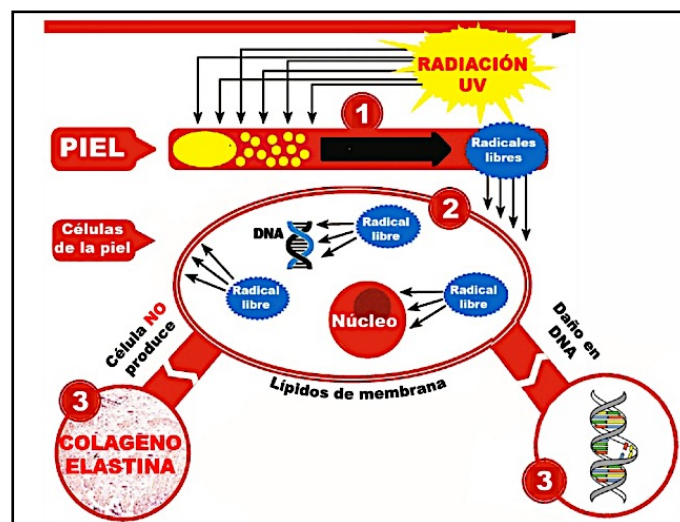
La piel es el órgano que cubre la totalidad de la superficie corporal y, entre sus principales propiedades, funciona como una barrera efectiva contra la radiación UV y contra factores de estrés mecánicos, químicos y microbiológicos. De igual manera, la piel actúa como una capa protectora de los tejidos subyacentes, como los músculos, los ligamentos y los órganos internos. Además, desempeña papeles relevantes en el sistema inmune y el metabolismo, controla la pérdida de agua, sirve como un órgano excretor a través de las glándulas sebáceas y sudoríparas y contiene terminaciones nerviosas sensoriales para la percepción del tacto, el dolor y la presión (Döge, 2018; Samaras, 2012).

La piel está constituida por tres capas, desde el exterior hacia el interior se encuentran: la epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido celular subcutáneo. La epidermis, es un epitelio plano estratificado que se compone de varios tipos de células. Aproximadamente, el 90-95 % son queratinocitos, mientras que en el 5-10 % restante, se incluyen células de Langerhans, melanocitos y células de Merkel. La epidermis está organizada en estratos o capas continuas, que de la profundidad a la superficie incluyen: la capa basal o germinativa, la capa de células malpighianas o espinoso, la capa granular y la capa córnea (Kanitakis, 2002).

La capa más externa de la piel, el EC, está formada por 15-25 capas de corneocitos, que son células planas hexagonales sin núcleo, unidas por lípidos y desmosomas, en lo que comúnmente se conoce como una estructura de ladrillo y cemento (Geerligts, 2009). La membrana lipídica en los espacios intercelulares del EC está compuesta de ceramidas, ácidos grasos libres de cadena larga y colesterol (Fox *et al.*, 2011). En su conjunto, estos proporcionan barreras hidrofóbicas e hidrofílicas alternativas que crean una membrana resistente y flexible que sirve para regular la pérdida de agua y proporcionar permeabilidad selectiva por difusión pasiva de sustancias exógenas y endógenas (Döge, 2018).

En su función como barrera protectora, el EC cuenta con un sistema de antioxidantes enzimáticos, incluyendo a las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), el cual es un mecanismo de defensa contra el daño ocasionado por los RL (Hellemans, 2003). Los RL son especies químicas que se forman de manera natural en el organismo a través de procesos metabólicos oxidativos, tales como la cadena de transporte de electrones, la activación de neutrófilos y en diversos procesos enzimáticos (Aristatile *et al.*, 2015). Sin embargo, la exposición excesiva de la piel a la contaminación ambiental, al estrés físico severo y a la radiación UV, también pueden dar lugar a la formación de RL.

El desequilibrio entre la producción de RL y la capacidad de un sistema biológico de reparar rápidamente el daño resulta en un proceso de deterioro celular que se conoce como estrés oxidativo. Como resultado de esto, se desencadenan cambios en las biomoléculas, como el ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas o lípidos, así como alteraciones de los niveles de enzimas antioxidantes, apoptosis y la muerte celular (Aristatile *et al.*, 2015). Los daños oxidativos a estos componentes celulares conlleva al desarrollo del envejecimiento prematuro en forma de arrugas, al disminuir la producción de colágeno, elastina y ácido hialurónico, así como a patologías como el cáncer de piel (Figura 1) (Alagawany *et al.*, 2015; Silva-Flores *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Daños en la piel generados por los radicales libres (Silva-Flores *et al.*, 2017).

## 4.2. Cáncer de piel y factores de riesgo

Entre las neoplasias con mayor incidencia en el ser humano se encuentra el cáncer de piel, por lo que es importante brindarle atención, ya que en la mayoría de los casos es prevenible y llega a ser controlable cuando es detectado en etapas tempranas, presentando mejores pronósticos (Alfaro-Sánchez *et al.*, 2016).

Existen dos tipos de cáncer de piel: el melanoma y el no melanoma. El primero se origina en los melanocitos, los cuales son células especializadas en la producción de melanina, el principal pigmento responsable de la coloración de la piel, los ojos y el pelo. El segundo, que incluye el carcinoma espinocelular y el carcinoma basocelular, se desarrolla principalmente en los queratinocitos (Lavanderos *et al.*, 2010; Alfaro-Sánchez *et al.*, 2016).

En México, la incidencia del cáncer de piel es difícil de calcular debido a que no siempre se reporta para control epidemiológico; solo casos aislados son reportados y/o los registros de cáncer no melanoma son incompletos, puesto que la mayoría se tratan mediante cirugía o ablación (Alfaro *et al.*, 2010). Según las cifras más recientes reportadas por Globocan, en el país hay cerca de 8,500 casos de cáncer no melanoma, mientras que, la incidencia para el melanoma se encuentra alrededor de los 3,700 casos (INCan, 2019). Cabe señalar que este último es el menos común, pero el más mortal.

Distintas condiciones, como la susceptibilidad genética, los factores ambientales y los carcinógenos químicos, pueden contribuir a la aparición del cáncer de piel (Akdeniz *et al.*, 2019). En particular, se ha reportado que la exposición crónica a los rayos UV es una de sus principales causantes (Aristatile *et al.*, 2015; Poljšak & Dahmane, 2012; Skin Cancer Foundation, 2020). La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) reportó que la alta incidencia en Australia se ha relacionado con su ubicación geográfica, la cual es muy próxima al ecuador (la línea en el globo que recibe la mayor cantidad de sol), por lo que cuanto más cerca del ecuador vive una persona, mayor es la cantidad y la intensidad de la exposición al sol que recibe

(Slevin & Whiteman, 2018). Aunque los casos de cáncer de piel en este país se atribuyen a sus altos niveles de radiación UV, también influye que son una población predominantemente de piel clara, sus cielos están relativamente limpios y sin nubes y su estilo de vida es al aire libre (Gies *et al.*, 2004).

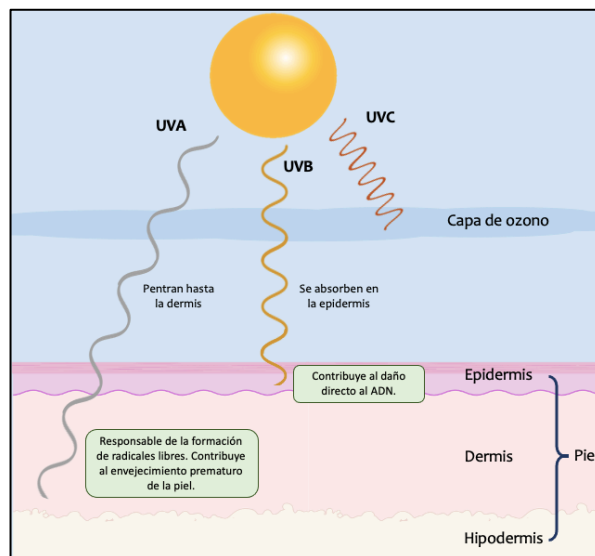
La radiación UV se define como la porción del espectro electromagnético encontrada entre los rayos X y la luz visible, es decir, entre 40 y 400 nm. El espectro UV se divide en secciones, cada una de las cuales tiene efectos biológicos distintos: UV al vacío (40-190 nm), UV lejano (190-220 nm), Ultravioleta C (UVC) (220-290 nm), Ultravioleta B (UVB) (290-320) y Ultravioleta A (UVA) (320-400 nm), subdividiéndose esta última en dos regiones: UVA II (320-340 nm) y UVA I (340-400 nm). La radiación UV es un componente natural de la luz solar, a pesar de ello no todas estas longitudes de onda están presentes en la irradiación que llega a la superficie terrestre, la cual se compone aproximadamente del 95 – 98 % de rayos UVA y del 2 – 5 % de UVB (Mishra *et al.*, 2011). En cuanto a las radiaciones con longitudes de onda por debajo de los 290 nm, como los rayos UVC, son totalmente bloqueados en la parte alta de la atmósfera por el oxígeno y por moléculas de ozono (Svobodová, 2003), lo que representa un beneficio para todas las formas de vida ya que es extremadamente nociva.

Los rayos UVA y UVB están implicados en efectos agudos y crónicos en la piel (Figura 2). Los rayos UVB, los cuales se absorben principalmente en las capas celulares de la epidermis, contribuyen al daño directo al ADN, al crear enlaces covalentes entre las bases de pirimidina, dando lugar a la formación de fotoproductos, como los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) y fotoproductos de pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP) (Khan *et al.*, 2018).

Por otra parte, los rayos UVA penetran profundamente hasta la dermis, y son responsables del daño indirecto al ADN mediante la formación de especies reactivas de oxígeno que ocasionan roturas de una sola cadena y bases oxidadas, entre ellos, la 8-oxoguanina, la cual causa mutaciones que pueden conducir al cáncer. La radiación UVA también ha sido reconocida por sus efectos sobre fotosensibilizadores endógenos, como

la flavina, melanina, riboflavina y porfirinas, lo que genera estados electrónicamente excitados y desencadena reacciones de oxidación que involucran al ADN y otros componentes celulares. Asimismo, se ha reportado que los rayos UVA son la causa fundamental de la inmunosupresión y las lesiones crónicas inducidas por la luz, como el envejecimiento prematuro de la piel (Panich *et al.*, 2016; Sample & He, 2018).

Investigaciones recientes sugieren que los rayos UVA no solo contribuyen al daño indirecto del ADN sino que también impiden la eliminación de los fotoproductos del ADN genómico a través de la oxidación y el daño a las proteínas de reparación del ADN (Khan *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Penetración de la radiación UV en la piel.

En los últimos años, el adelgazamiento de la capa de ozono, como consecuencia de muchas de las emisiones asociadas a actividades humanas, ha resultado en una mayor exposición a los rayos UV, propiciando la formación de RL, además de la alteración directa del ADN.

Por un lado, varios estudios han demostrado que el uso regular de fotoprotectores, es decir, de sustancias químicas capaces de absorber, reflejar o dispersar los rayos solares, puede proteger y reducir el número de incidencias del cáncer de piel no melanoma hasta en un 78 % (Alfaro *et al.*, 2010). Por otro lado, aunque el organismo produce algunos de

los antioxidantes necesarios para neutralizar los RL, incluyendo los generados por los rayos UV, una de las estrategias más importantes para reducir el riesgo de los daños ocasionados por dichas especies reactivas es la utilización de protectores solares. En este contexto, se ha propuesto el uso de antioxidantes exógenos que ayuden a limitar el daño de la piel, ya que pueden alterar la cascada fotoquímica que tiene lugar por la luz solar UV.

Particularmente, debido a su actividad antioxidante y al efecto benéfico que pueden proporcionar a la salud de la piel, en los últimos años se ha incrementado el interés y la demanda de los consumidores por alternativas basadas en productos naturales, como por ejemplo, los extractos vegetales y las resinas, así como los AE y sus componentes individuales (Hermund, 2018; Poljšak & Dahmane, 2012).

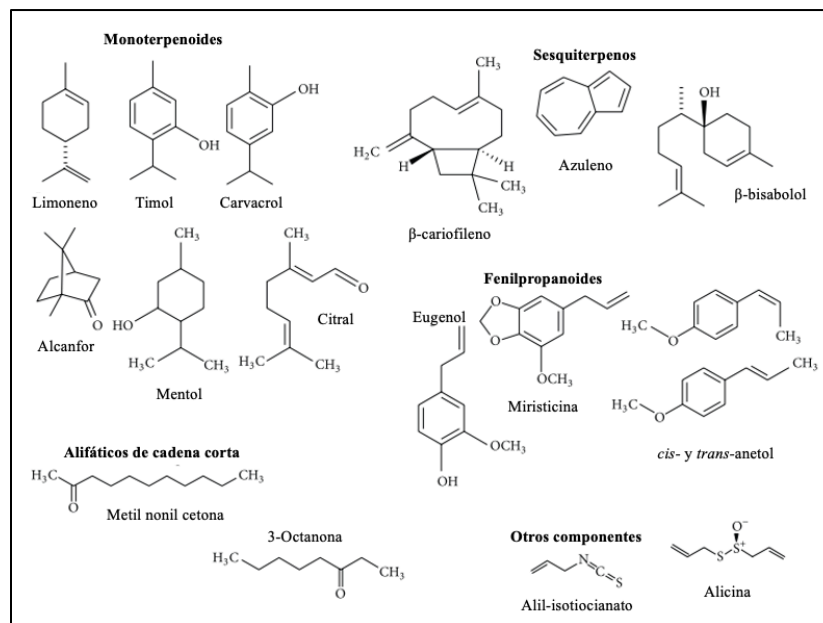
### **4.3. Aceites esenciales**

Los AE son mezclas odíferas, líquidas a temperatura ambiente y altamente volátiles. Se obtienen a partir de una materia prima de origen vegetal como flores, semillas, raíces, hojas y ramas. Son compuestos de naturaleza lipofílica por lo que presentan poca solubilidad en agua, pero son solubles en solventes orgánicos, incluido el etanol y el éter dietílico, mezclándose bien con los aceites vegetales, las grasas y las ceras (Preedy, 2016).

En las últimas décadas, los AE han ganado interés científico en la industria agroalimentaria, química, farmacéutica y cosmética, debido a que sus componentes presentan diversos efectos biológicos tales como antiinflamatorio, bioinsecticida, antiséptico, antivasoconstrictivo, antimicrobiano y antioxidante, entre otros; además, cuentan con una amplia aceptación por parte de los consumidores al ser reconocidos como sustancias generalmente seguras (GRAS) (Bakry *et al.*, 2016).

Los AE son sustancias incoloras, o ligeramente amarillentas, que tienen una composición compleja, presentando de 20 a 60 componentes, clasificados en grupos de

acuerdo con su origen biosintético. El grupo principal está compuesto por terpenos, fenilpropanoides y derivados de hidrocarburos alifáticos de cadena corta, todos caracterizados por su bajo peso molecular (Figura 3) (Preedy, 2016).



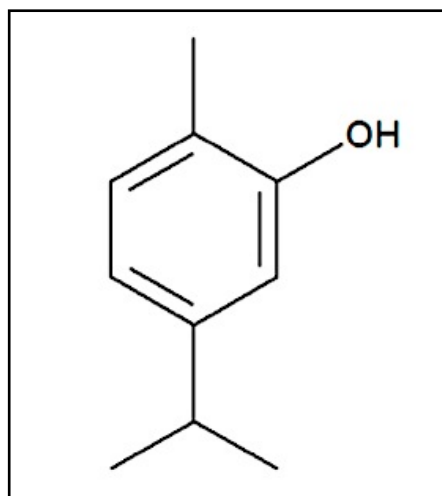
**Figura 3.** Estructuras de los componentes de aceites esenciales.

Los terpenos son sintetizados a partir de unidades de 5 átomos de carbono (C5) llamadas isopreno. Generalmente, están representados por monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15). Los monoterpenos (Figura 3) se forman a partir del acoplamiento de dos unidades de isopreno y son las moléculas más representativas que constituyen el 90 % de los AE (Bilia, 2014). Entre los monoterpenos destaca el CRV, el cual ha sido ampliamente estudiado por sus actividades antioxidantes y antimicrobianas, desde que fue reconocido como seguro (GRAS) por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (Gavaric *et al.*, 2015).

#### 4.4. Carvacrol como dermoprotector

El CRV (5-isopropil-2-metilfenol) es un monoterpenoide fenólico que se encuentra en los AE de las plantas de la familia *Lamiaceae*. Es un compuesto volátil y altamente lipófilo, ebulle a 237 ~ 238 °C, su punto de fusión es 1 °C y su solubilidad es

muy alta en tetracloruro de carbono, etanol, éter dietílico y acetona, aunque es insoluble en agua. La estructura del CRV se muestra en la Figura 4. El CRV ha recibido especial atención de diferentes sectores debido a sus actividades biológicas benéficas, tales como su efecto nutritivo participando en la mejora de la digestión y el metabolismo, su actividad hepatoprotectora, su acción como analgésico, antiinflamatorio, antitumoral, antiviral, antifúngico y, principalmente, antioxidante (Guimarães *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Estructura química del carvacrol (Preedy 2016).

Algunos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos obtenidos de los AE de las plantas, por ejemplo, del género *Origanum*, presentan abundantes antioxidantes, los cuales podrían ser resultado evolutivo en respuesta al estrés al que se somete a la planta, entre ellos la exposición a la radiación UV. Dentro de los compuestos fenólicos, se ha destacado el papel que juega el CRV como antioxidante natural al ofrecer una protección contra la peroxidación lipídica inducida por la radiación UVB, el estrés oxidativo y el daño al ADN (Charles *et al.*, 2017).

En un estudio realizado por Aristatile *et al.* (2015) se evaluó el efecto fotoprotector del CRV en linfocitos de sangre humana *in vitro*. Los resultados de los ensayos realizados sugirieron que el CRV puede funcionar como un potente eliminador del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Asimismo, el CRV exhibió una marcada eliminación de radicales hidroxilo, lo cual según Alagawany *et al.* (2015) podría deberse

a su carácter ácido débil, por lo que dona átomos de hidrógeno a un electrón no apareado. Por otro lado, también fue observada la capacidad del CRV para aumentar la actividad de enzimas endógenas como la glutatión reductasa. En este mismo estudio, se observó una reducción significativa en la rotura de la hebra de ADN ( $P < 0.05$ ) al incubar el CRV con  $H_2O_2$ . Se puso en evidencia que el CRV ofrece una protección contra el estrés oxidativo inducida por la radiación UVB y el daño al ADN.

Sin embargo, aunque el CRV ofrece una importante capacidad antioxidante, debido a sus características químicas, su aplicación se encuentra limitada, ya que es un compuesto volátil, presenta baja solubilidad en agua y es vulnerable a factores externos como el calor, la luz y el oxígeno.

#### **4.5. Nanotecnología**

El desarrollo de la nanotecnología surge como una estrategia para la encapsulación de compuestos activos con características químicas que limitan su aplicación. Dicho proceso se basa en la incorporación de moléculas biológicamente activas (Asbahani *et al.*, 2015) en vectores nanoparticulados para inducir su protección, así como, para retrasar y sostener su liberación en el sitio de acción y durante su almacenamiento. Guterres *et al.* (2007) reportaron que, mediante la encapsulación en diferentes sistemas portadores, incluidos liposomas, dendrímeros, ciclodextrinas, micropartículas, nanopartículas sólidas-lipídicas, micelas, nanopartículas a base de polímeros y otros, se podría controlar la liberación y/o distribución de activos con diferente actividad biológica en distintos tejidos como, por ejemplo, en la piel.

Desde el punto de vista de su formulación, al seleccionar el nanosistema y su técnica de preparación se deben tener en cuenta distintos parámetros, tales como la polaridad del compuesto activo, su solubilidad, su volatilidad y la presencia de solventes orgánicos en la formulación final (Zorzi *et al.*, 2015). Las nanopartículas poliméricas (NP) son sistemas portadores que presentan diámetros generalmente en un rango de 10 a 400 nm. Están constituidas de polímeros naturales, sintéticos o semisintéticos, particularmente

poliésteres biodegradables como ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-*co*-glicólico (PLGA) y poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL). En cuanto al compuesto activo, este puede encontrarse atrapado, disperso, disuelto o adsorbido en las nanopartículas (Asbahani *et al.*, 2015). Pueden denominarse como nanocápsulas (NC) o nanoesferas, según su estructura (Figura 5). Las nanoesferas son esferas hechas de una matriz de polímero que pueden contener moléculas atrapadas o adsorbidas en ellas. Las NC consisten en un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica (Guterres *et al.*, 2007); en este caso, el compuesto activo puede estar adsorbido o disuelto/disperso en el núcleo. El uso de NP se caracteriza por incorporar eficientemente compuestos activos, mejorando su estabilidad y controlando su liberación; además, son biocompatibles debido a que son sintetizados a partir de polímeros biodegradables, permitiendo así una mejor aplicación en el sitio de acción (Asbahani *et al.*, 2015; Döge, 2018; Goik *et al.*, 2019).

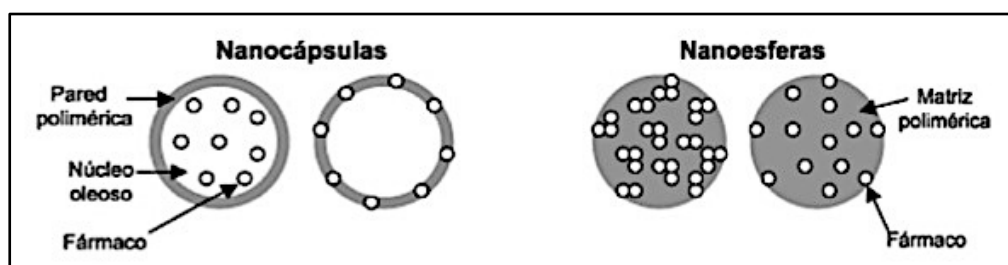


Figura 5. Representación esquemática de una nanocápsula y una nanoesfera (Schaffazick *et al.*, 2003).

Para la preparación de NP, se han utilizado diferentes métodos, por ejemplo, emulsión doble, emulsificación-difusión, recubrimiento de polímeros mediante la absorción de capa por capa (LBL) y nanoprecipitación; este último se utiliza comúnmente para la encapsulación de moléculas hidrofóbicas. Durante la preparación se emplea normalmente las fases solvente y no solvente, denominadas respectivamente fases orgánica y acuosa. La nanoprecipitación es un método bastante simple, rápido, reproducible y económico. Además, requiere equipo modesto, no se necesitan surfactantes para la encapsulación de compuestos hidrófobos y presentan porcentajes de eficiencia de encapsulación aceptables (Asbahani *et al.*, 2015).

Hasta ahora, las NP formuladas mediante el método de nanoprecipitación son el nanosistema más comúnmente utilizado en aplicaciones cutáneas. La incorporación en estos sistemas de los AE y de sus componentes, ofrece varias ventajas, como, su tamaño nanométrico y su amplia área superficial, los cuales permiten la distribución del activo de manera uniforme en la piel, y de esta manera, el número de moléculas de activo biológico presentes en la superficie de las NP se incrementa conforme disminuye el tamaño del sistema. Por otra parte, la pared del polímero de las NP otorga protección a los compuestos activos tanto de factores ambientales (e. g. luz, humedad, temperatura) como del entorno biológico en donde se aplican (e. g. enzimas, pH). Asimismo, la pared polimérica permite controlar la liberación del activo en la superficie del sitio de acción (Armendáriz *et al.*, 2016).

En los últimos años, la aplicación de las NP en el área dermatológica ha tenido un gran impacto debido a que los compuestos presentes en las mismas pueden ser liberados para que tengan un efecto local o sistémico (Armendáriz *et al.*, 2016). En una investigación realizada por Álvarez Román y colaboradores se mostró mediante ensayos de permeación transdérmica que las nanopartículas con un tamaño alrededor de los 200 nm se acumulan principalmente en los folículos pilosos y en los pliegues más profundos del EC, sin penetrarlo, esto disminuye de manera importante los posibles efectos tóxicos y alérgicos de los compuestos encapsulados (Álvarez *et al.*, 2004). En otro trabajo, se realizaron estudios dermatocinéticos de los AE de *Magnolia grandiflora*, *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* incorporados en NC, estableciéndose que propiedades relacionadas con los sistemas nanoparticulados juegan un papel importante en la penetración de compuestos en la piel (Velázquez-Dávila, 2017). Por otra parte, Cavazos-Rodríguez (2011), estandarizó la obtención de formulaciones con CRV en nanopartículas de PCL con un diámetro de  $180 \pm 3$  nm, un porcentaje de encapsulación del  $50.85 \pm 2.40$  % y un porcentaje de eficiencia de encapsulación de  $91.76 \pm 0.27$  %. Mediante ensayos *in vitro* de permeación transdérmica con piel de cerdo y la técnica de *tape stripping*, se determinó que el CRV alcanza las capas más profundas del EC sin penetrar a través de él, lo que sugiere que la utilización de las formulaciones con CRV es segura.

Sin embargo, la administración tópica de activos requiere de evaluaciones que permitan determinar que las formulaciones aplicadas son seguras, ya que no son tóxicas y no causan irritación en la piel. Debido a esto es indispensable valorar la integridad física de la barrera cutánea y establecer que sus características biológicas no han sido alteradas.

#### **4.6. Valoración biofísica de la piel**

La valoración cutánea, particularmente del EC, mediante técnicas de bioingeniería, se ha convertido en una herramienta cada vez más útil, no solo para una mejor comprensión de las propiedades mecánicas y fisiológicas de la piel que permitan el diagnóstico temprano de enfermedades cutáneas, sino también como una herramienta para la investigación y la evaluación de los cambios y de las respuestas a las interacciones de compuestos activos en la piel (Darlenski *et al.*, 2009).

Las técnicas actuales de bioingeniería, *no invasivas*, permiten determinar parámetros cutáneos como la TEWL, el grado de hidratación, el pH, el flujo sanguíneo capilar, el color, la cantidad de sebo y la elasticidad, proporcionando mediciones precisas, reproducibles y objetivas (Chapilliquén & Alvis, 2006). Entre los parámetros fisiológicos de la piel que han sido de relevante importancia en la evaluación de la inocuidad de las formulaciones con aplicación tópica se encuentran: la TEWL, la hidratación, el pH y la cantidad de sebo.

##### **4.6.1. Pérdida de agua transepidérmica cutánea**

La TEWL (TransEpidermal Water Losses, por sus siglas en inglés) es la pérdida del agua libre por evaporación y del agua débilmente enlazada en el EC, la cual es proporcional a la función barrera epidérmica. Los valores de TEWL bajos son una característica básica de la función de la piel intacta *in vivo*. Por el contrario, si la piel se encuentra dañada, irritada o ulcerada el valor de TEWL se incrementará (Carbajo-Espejo, 2017). La TEWL se puede medir con un instrumento Tewameter (Courage + Khasaka Electronic). Este dispositivo de medición está constituido de una sonda que mide el

gradiente de densidad de la presión de evaporación del agua mediante dos pares de sensores (temperatura y humedad relativa) situados en el interior de un cilindro hueco. La medición es analizada por un microprocesador y el software aplica la Ley de difusión de Fick a los datos de evaporación medidos, expresando los resultados en gramos por metro cuadrado por hora ( $\text{g/m}^2/\text{h}$ ) (Chapilliquén & Alvis, 2006).

En una investigación realizada por Hauser en el 2012, se evaluó la TEWL *in vivo* en la piel humana después de aplicar aceite de almendra, aguacate, soya y jojoba así como parafina y vaselina. Los valores de TEWL disminuyeron para todas las sustancias, lo que sugiere una oclusión parcial de la superficie de la piel y retención de humedad. En otro estudio, se evaluó la TEWL *in vivo* en la piel humana después de la aplicación de una formulación rica en cera de bayas (*Rhus verniciflua*), aceite de coco (*Cocos nucifera*) y aceite de oliva (*Olea europaea*). Se observó una disminución en los valores de TEWL después de 2 horas, lo que indica una mejora en la barrera de la piel (Bielfeldt *et al.*, 2019)

#### **4.6.2. Hidratación cutánea**

La hidratación subcutánea es otro parámetro importante que puede vincularse a las funciones epidérmicas. El nivel de hidratación de la superficie de la piel (10-20  $\mu\text{m}$ ) se determina con un instrumento Corneometer (Courage & Khazaka Electronic), el cual mide la capacitancia de la piel, es decir, la capacidad de la piel para almacenar energía en forma de carga eléctrica. El EC seco es un medio dieléctrico que, al hidratarse, produce un cambio significativo en sus propiedades dieléctricas, por lo tanto su constante dieléctrica aumenta, así como, la capacitancia detectada por la sonda que está en contacto con la piel (Zuang *et al.*, 1997).

En el 2006, Dal’Belo y colaboradores evaluaron (Corneometer™ CM 825) el efecto de una formulación de *Aloe vera* en la hidratación *in vivo* de la piel humana, después 1 y 2 semanas de su aplicación. Los autores reportaron que la piel mostró un aumento en el nivel de hidratación después de la administración de la formulación.

### 4.6.3. pH cutáneo

La medición del pH en la piel es un parámetro asociado a la calidad de la capa hidrolipídica. El pH del EC regula tres funciones epidérmicas, que son la barrera antimicrobiana, la homeostasis de la barrera de permeabilidad y la integridad/cohesión de la barrera. Las alteraciones del pH en el EC pueden provocar una función de barrera epidérmica anormal (Mohd & Hasham, 2020). Se utiliza un instrumento Skin-pH-meter (Courage & Khasaka Electronic), el cual es un electrodo de cristal de diseño plano (para mejorar el contacto con la piel) conectado a un voltímetro que está diseñado específicamente para determinar los valores de pH de la piel (Cercós & Rodríguez, 2013).

En una investigación realizada en el 2016, se desarrollaron nanoemulsiones con aditivos de lanolina y evaluaron el pH *in vivo* de la piel (pHmeter Skin® PH 900). Se determinó que las nanoemulsiones mantuvieron los valores del pH cutáneo. Los autores establecieron que las formulaciones no causaron irritación en la superficie de la piel (Pereira *et al.*, 2016).

### 4.6.4. Contenido de sebo en la piel

Los lípidos del sebo en la superficie de la piel tienen un gran impacto en las propiedades mecánicas y protectoras de la barrera epidérmica. El Sebómetro (Courage & Khasaka Electronic) es un dispositivo que se utiliza para cuantificar la producción de sebo en la piel por fotometría. Es decir, una fotocélula medirá la transparencia de la cinta antes y después de ser aplicada en el EC. Los resultados son presentados en la pantalla en  $\mu\text{g}$  de sebo/ $\text{cm}^2$  de piel (Pande & Misri, 2005).

En un estudio, realizado por Álvarez-Román y col., se evaluó el contenido de sebo en piel de cerdo después de la aplicación de NP cargadas con una fracción hidroalcohólica de hojas de *Moringa oleifera*. Los valores obtenidos indican que el contenido de lípidos se vio favorecido después de la aplicación de la formulación (Álvarez-Román *et al.*, 2020).

## 5. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, en México y en todo el mundo, se han incrementado el número de casos reportados de cáncer de piel. Diversos factores pueden contribuir a la aparición del cáncer de piel, aunque, la exposición a la radiación UV es una de las causas principales. En las últimas décadas, la disminución de la capa de ozono ha ocasionado que los rayos UV, en particular los UVB, entren con mayor intensidad a la tierra y generen daños en la piel. El resultado de una mayor exposición a la radiación UV es la formación de RL, los cuales son capaces de oxidar proteínas, lípidos o ADN, provocando daños en la estructura y el funcionamiento de la piel. Como respuesta a la generación de RL, el cuerpo humano cuenta con defensas antioxidantes con la capacidad de neutralizar el proceso oxidativo que estos provocan. Sin embargo, ante el aumento excesivo de estas especies reactivas debido a una exposición prolongada a la radiación UV, una de las estrategias para contrarrestar los daños que causan es el uso de antioxidantes exógenos. Los productos naturales, como los AE, presentan diversas propiedades benéficas para el organismo, como sus efectos antiséptico, analgésico, antitumoral, antimicrobiano, antiinflamatorio y antioxidante, entre otros. En particular, entre los 20 a 60 compuestos presentes en los AE, destaca el CRV por su capacidad antioxidante. No obstante, la capacidad del CRV como un compuesto antioxidante, se ve limitada por su alta volatilidad, escasa solubilidad en agua e inestabilidad en presencia de calor, luz y oxígeno. Por lo tanto, para que su aplicación sea viable, es necesaria la implementación de nuevas estrategias, como las basadas en la nanotecnología, a fin de brindarle protección, lo que permitirá mantener su estabilidad, además de contribuir en la liberación del compuesto activo. No obstante, previo a la administración tópica de compuestos activos, se requiere de la evaluación de sus efectos sobre las propiedades biofísicas de la piel, con el fin de obtener información sobre la seguridad de la formulación. En este contexto, en el presente trabajo, se evaluó el efecto de una formulación de NC con CRV sobre las propiedades biofísicas de la piel, a fin de establecer su uso potencial como agente dermoprotector.

## **6. HIPÓTESIS**

Las nanocápsulas (NC) cargadas con carvacrol (CRV) aumentan su residencia en los estratos de la piel sin alterar sus parámetros funcionales y conservando su actividad antioxidante.

## 7. OBJETIVOS

### GENERAL

Evaluar el efecto de una formulación de nanocápsulas cargadas con carvacrol sobre las propiedades biofísicas de la piel para establecer su uso potencial como dermoprotector.

### ESPECÍFICOS

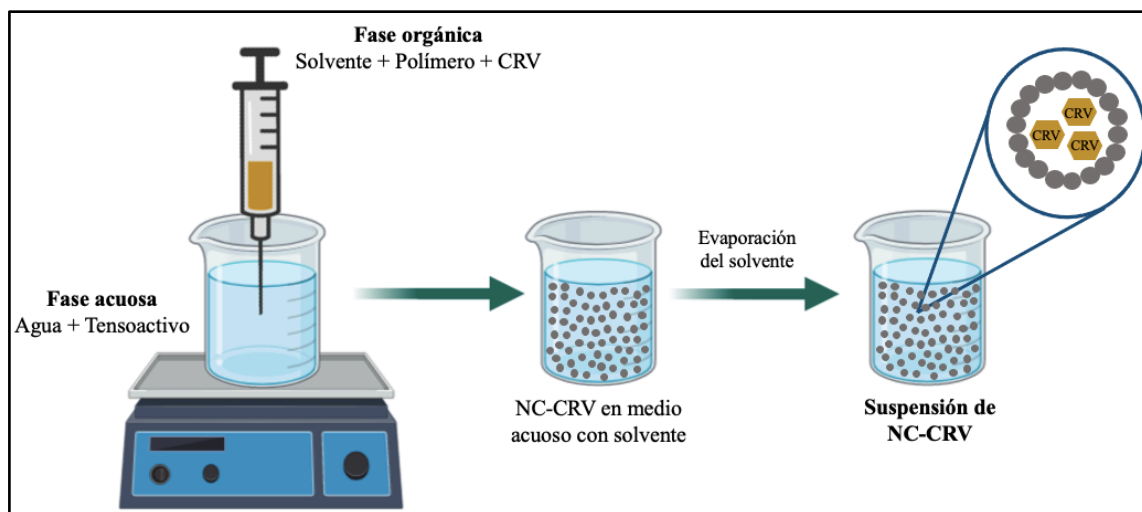
1. Obtener nanocápsulas poliméricas cargadas con carvacrol mediante la técnica de nanoprecipitación y caracterizarlas fisicoquímicamente, en función de su tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial  $\zeta$ , estabilidad y espectro de infrarrojo.
2. Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de gases con detector de ionización de flama para cuantificar el carvacrol en las nanocápsulas poliméricas.
3. Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* del carvacrol libre y nanoencapsulado mediante los métodos de captación de radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) y 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS<sup>+</sup>).
4. Evaluar el efecto dermoprotector del carvacrol nanoencapsulado en un modelo de piel porcina por técnicas de bioingeniería y *tape stripping*.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Obtención y caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas con carvacrol

#### a) Obtención de NC poliméricas

Las NC se prepararon mediante la técnica de nanoprecipitación (Figura 6) descrita por Fessi *et al* (1989). Brevemente, se preparó una fase orgánica (FO) (5 mL) compuesta de acetona, Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (Fluka Analytical) (15 mg) y CRV (PM: 150.22 g/mol, Fluka Analytical) (15 mg). Esta fase se inyectó en una fase acuosa (FA) (15 mL) que contenía 1 % (p/p) de Tween 80 (Sigma-Aldrich) bajo agitación magnética constante a temperatura ambiente (Cavazos-Rodríguez, 2011). Posteriormente, el disolvente se evaporó a presión reducida (Heidolph Instruments, GER). Para la elaboración de las NP blanco (NP-BCO) se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente pero no se adicionó CRV.



**Figura 6.** Preparación de las nanocápsulas con carvacrol por la técnica de nanoprecipitación.

#### b) Caracterización fisicoquímica de nanocápsulas

- *Tamaño, índice de polidispersidad (IP) y potencial zeta*

Se determinó el tamaño medio de partícula y el IP en una suspensión acuosa de NC-CRV y NC-BCO. Se midieron en un ángulo de dispersión de 90 grados utilizando la

dispersión dinámica de la luz, mientras que la medición del potencial  $\zeta$  se realizó mediante microelectroforesis láser Doppler (Zetasizer Nano- ZS90, Malvern Instruments, UK).

- *Estabilidad*

Para evaluar la estabilidad de las NC-CRV se almacenaron triplicados de lotes formulados en frascos ámbar, a 25 °C por 4 meses. Durante este periodo de tiempo se dio seguimiento al tamaño, el IP y el potencial  $\zeta$  de los lotes cada 30 días. Además, se evaluó visualmente la apariencia de las NC-CRV verificando alteraciones físicas tales como precipitados, cambio de color y/o separación en fases de la dispersión de NC.

- *Espectroscopia infrarroja*

Se determinó el espectro infrarrojo (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) de los componentes de la formulación: CRV, PCL y tensoactivo, así como de las NC-CRV, por medio de Espectrofotometría Infrarroja por Transformada de Fourier (Frontier FT-IR, Perkin Elmer, USA) a 64 barridos utilizando un accesorio universal de punta de diamante (UATR, Perkin Elmer, USA). El CRV, el polímero y el tensoactivo se analizaron directamente, mientras que las NC-CRV se sometieron a un proceso de desecación durante 3 días.

- *Contenido de CRV en NC*

Las NC-CRV se centrifugaron (Allegra 64R Centrifuge, Beckman-Coulter), la pastilla obtenida de NC se desecó y se sometió a extracciones sucesivas con metanol (TEDIA). Los sobrenadantes y las extracciones se analizaron con el método de CG-FID previamente validado. Para los porcentajes se utilizaron tres lotes diferentes. Posteriormente, se calcularon los porcentajes de encapsulación (% E) y eficiencia de encapsulación (% EE) con las siguientes fórmulas:

$$\% E = \frac{(\text{mg de carvacrol encapsulado})}{(\text{mg del polímero} + \text{mg totales de carvacrol})} \times 100$$

***Fórmula 1***

$$\% EE = \frac{(\text{mg de carvacrol encapsulado})}{(\text{mg totales de carvacrol})} \times 100$$

***Fórmula 2***

## 8.2. Desarrollo y validación de un método analítico por CG-FID para cuantificar el carvacrol en nanocápsulas poliméricas

El método analítico por CG-FID (inyección directa) para cuantificar el CRV se desarrolló a partir de condiciones cromatográficas descritas por Cavazos-Rodríguez (2011). Se empleó un cromatógrafo de gases con detección de ionización de flama (CG-FID) (Clarus 480 GC, Perkin Elmer, USA) utilizando una columna capilar (Elite-5, Perkin Elmer, USA) (5 % difenil y 95 % dimetilpolisiloxano, 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). El flujo del gas portador helio (99.999 % de pureza, INFRA) fue de 1 mL/min.

La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: se inició a 130 °C, se mantuvo 1 min, se elevó a 30 °C/min hasta 190 °C, posteriormente se incrementó a 10 °C/min hasta 210 °C. Finalmente, se elevó a 30 °C/min hasta 270 °C durante 3 min. La temperatura del inyector fue de 250 °C y del detector de 270 °C. Para la elección del estándar interno, se inyectaron soluciones de estándares de eugenol y mentol.

El método analítico desarrollado y optimizado se validó bajo los criterios establecidos en la Guía para la Validación de Métodos Físicoquímicos de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de la Cobertura de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058, 2011) y por la Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH, por sus siglas en inglés) (ICH, 2005).

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

### a) Validación del sistema

- *Linealidad*

La linealidad se determinó mediante la construcción de una curva de calibración de CRV (grado CG) a cinco niveles de concentración (25, 50, 100, 200 y 400 µg/mL), por

triplicado. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 50 µg/mL. Se realizó un análisis de regresión lineal de las áreas obtenidas en función de concentración. El criterio de evaluación para el parámetro de linealidad fue un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.99 (CCAYAC-P- 058, 2011).

- *Limite de detección*

Se utilizó la pendiente y la ordenada al origen obtenidas del análisis de regresión de linealidad con la Fórmula 3:

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

**Fórmula 3**

Donde:

LDD= límite de detección.

Sa= desviación estándar de la ordenada al origen.

m= pendiente de la curva de calibración.

- *Límite de cuantificación*

Se utilizó la pendiente y la ordenada al origen obtenidas del análisis de regresión de la linealidad con la Fórmula 4:

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

**Fórmula 4**

Donde:

LDC= límite de cuantificación.

Sa= desviación estándar de la ordenada al origen.

m= pendiente de la curva de calibración.

- *Precisión*

Se analizaron tres niveles de concentración de CRV (25, 100 y 400 µg/mL), por sextuplicado y de manera independiente. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 50 µg/mL. Se calcularon los porcentajes de recuperación (% R) con la ecuación de la

recta obtenida por linealidad. Posteriormente, se calculó la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (DER) con la Fórmula 5:

$$\% \text{ DER} = \frac{S}{\bar{x}} 100$$

**Fórmula 5**

Donde:

% DER= desviación estándar relativa en porcentaje.

S= desviación estándar.

$\bar{x}$ = media.

#### b) Validación del método

Para la validación del método se utilizaron NC-CRV, las cuales se sometieron al proceso de extracción. Se utilizaron diferentes niveles de concentración de acuerdo con el parámetro evaluado. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 50 µg/mL.

- *Exactitud*

Se analizaron cinco niveles de concentración de CRV (25, 50, 100, 200 y 400 µg/mL) y se adicionó NC-CRV, por triplicado y de manera independiente. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 50 µg/mL. Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de recuperación (%R) con la Fórmula 6:

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

**Fórmula 6**

Donde:

Ca= concentración medida en la muestra adicionada.

CU= concentración medida en la muestra sin adicionar.

CA= concentración añadida.

- *Precisión*

Se analizaron tres niveles de concentración de CRV (25, 100 y 400  $\mu\text{g/mL}$ ), por sextuplicado y se adicionó a NC-CRV por sextuplicado y de manera independiente, el mismo día y por la misma persona. Se utilizó el estándar interno a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Se calcularon los porcentajes de recuperación (% R) con la ecuación de la recta obtenida por linealidad. Posteriormente, se calculó la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (DER) con la Fórmula 5.

### **8.3. Determinación de la actividad antioxidante del carvacrol**

En el presente estudio se utilizaron los ensayos de DPPH y ABTS para determinar la capacidad antioxidante del estándar de CRV (CRV-STD), la suspensión completa de NC-CRV (NC-CRV), el sobrenadante de la NC-CRV (NC-SBR) y la pastilla de la NC-CRV (NC-PST).

#### *a) Ensayo de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)*

La actividad de eliminación de radicales DPPH del CRV-STD se determinó por el ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, Sigma-Aldrich) descrito por Amiri (2012). A partir de una solución de trabajo de CRV-STD a 8,000  $\mu\text{g/mL}$ , se prepararon soluciones a 20, 25, 50, 100, 150, 250, 400 y 800  $\mu\text{g/mL}$  y se llevaron a un volumen final de 1 mL en metanol. Cada solución se mezcló con 1 mL de DPPH (80  $\mu\text{g/mL}$ ) en metanol. Estos sistemas se dejaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las absorbancias de estas soluciones se midieron a una  $\lambda = 517 \text{ nm}$  (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, USA). La concentración del CRV-STD que proporciona un 50 % de inhibición ( $\text{IC}_{50}$ ) se calculó representando los porcentajes de inhibición obtenidos en función de la concentración evaluada mediante un análisis probit (SPSS Statistics version 25). La prueba se realizó por triplicado en 3 días diferentes.

Posteriormente, se evaluó la actividad de eliminación de radicales DPPH de la NC-CRV y el NC-SBR (CRV no encapsulado). También se evaluó la suspensión completa de

la NP-BCO y su sobrenadante (NP-SBR) como controles. Todas las pruebas se realizaron por sextuplicado.

La NC-PST (CRV encapsulado) se sometió a un proceso de extracción con metanol. La extracción se evaluó mediante el ensayo de DPPH por duplicado.

b) Ensayo de captación de radicales ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>+</sup>)

La actividad antioxidante del CRV-STD se determinó mediante el método del ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, Sigma-Aldrich) propuesto por Benchabane y col. (2015). A partir de una solución de trabajo de CRV-STD a 800 µg/mL se prepararon soluciones a 1.5, 2.5, 5.0, 11.0 y 20.0 µg/mL y se llevaron a un volumen final de 1 mL en metanol. Cada solución se mezcló con 1 mL de ABTS<sup>+</sup> (7 mM) en metanol. Después de 7 min, se midió la absorbancia a una  $\lambda = 734$  nm (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, USA). La concentración del CRV-STD que proporciona un 50 % de inhibición (IC<sub>50</sub>) se calculó representando los porcentajes de inhibición obtenidos en función de las concentraciones probadas mediante un análisis probit (SPSS Statistics version 25). La prueba se realizó por triplicado en 3 días diferentes.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de eliminación del radical ABTS<sup>+</sup> en la NC-CRV y el NC-SBR (CRV no encapsulado). También se evaluó la NP-BCO y el NP-SBR como controles. Todas las pruebas se realizaron por sextuplicado.

En ambos ensayos, el porcentaje de inhibición de los radicales libres (%I) se calculó utilizando la Fórmula 7:

$$\% I = \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \times 100$$

**Fórmula 7**

Donde:

$A_{\text{blanco}}$  = absorbancia del radical (DPPH o ABTS<sup>+</sup>) en metanol.

$A_{\text{muestra}}$  = absorbancia de la muestra con el radical.

#### **8.4. Valoración del efecto dermoprotector del carvacrol nanoencapsulado en un modelo de piel porcina por técnicas de bioingeniería y *tape stripping***

Para el modelo *ex vivo* de piel porcina, se emplearon orejas de cerdo de ambos sexos de raza Large-White recién sacrificados (Rastro municipal, Monterrey, N.L.). Se utilizó la región exterior de la oreja. La piel de cerdo extraída se congeló a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se utilizó durante las siguientes 4 semanas.

La piel de cerdo, previamente acondicionada, se colocó entre los dos compartimentos de las celdas de difusión de Franz modificada. En el compartimento receptor se colocaron 15 mL de solución salina amortiguada de fosfatos (PBS) a pH 7.4, se mantuvo en agitación constante y a temperatura de  $36.0 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En el compartimento donador se colocó 1 mL de las NC-CRV o NP-BCO. Las formulaciones estuvieron en contacto con la piel ( $2.54\text{ cm}^2$ ) durante 1, 2 y 4 h. Al finalizar el tiempo de exposición en la piel, el exceso de las formulaciones fue removido de la superficie y se secó con un algodón. La piel de cerdo fue retirada de la celda y posteriormente se evaluaron de forma independiente los parámetros biofísicos de la piel con técnicas de bioingeniería y la técnica de *tape stripping*.

##### *Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con técnicas de bioingeniería*

Antes y después de la exposición de las NC-CRV y NP-BCO en la piel durante 1, 2 y 4 h, se evaluó la integridad de la barrera cutánea midiendo la TEWL, el pH y el contenido de agua del EC.

##### a) Pérdida de agua transepidérmica

La sonda TEWL TM300 (Courage & Khazaka, modelo MPA5) fue colocada durante 30 s para su equilibrio sobre la superficie de la piel. Los valores de TEWL se registraron después de 2 min de medición. La evaluación se realizó por quintuplicado y el promedio de las mediciones realizadas se expresó en  $\text{g}/\text{m}^2\text{h}$ . Las evaluaciones se realizaron a una temperatura de 24 a  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa entre 28 y 39 %. La sonda fue calibrada antes de cada evaluación.

b) pH superficial

El electrodo de vidrio de la sonda de pH PH905 (Courage & Khazaka, modelo MPA5) fue colocado sobre la superficie de la piel para la medición. La evaluación se realizó por quintuplicado y el promedio de los resultados obtenido se expresó en unidades arbitraria del pHmetro. La sonda fue calibrada con las soluciones calibradoras de pH=4 y pH=7 antes de cada evaluación.

c) Contenido de agua del estrato córneo

La sonda de capacitancia CM825 (Courage & Khazaka, modelo MPA5) fue colocada en la superficie de la piel, cada evaluación representa 60 mediciones del contenido de agua del EC. La evaluación se realizó por quintuplicado. El promedio de las mediciones se expresó en unidades arbitrarias del corneómetro. Las mediciones obtenidas representan el contenido de agua a una profundidad de 10-20  $\mu\text{m}$  de EC.

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

*Técnica de tape stripping*

La técnica de *tape stripping* consistió en colocar una cinta adhesiva (2.1 x 2.1 cm), previamente acondicionada y pesada, en la superficie de la piel, aplicar una ligera presión y realizar el arranque de la cinta adhesiva. Las cintas fueron nuevamente pesadas y por diferencia de peso, se calculó la cantidad de EC removido en cada cinta adhesiva. Posteriormente, se empleó la densidad de la piel para calcular la profundidad del EC removido con la Fórmula 9:

$$\text{Profundidad} = \frac{m}{\rho}$$

**Fórmula 8**

Donde:

m= cantidad en gramos de estrato córneo removido.

$\rho$ = densidad de la piel (1 g/mL).

Durante la optimización de la técnica de *tape stripping*, se aplicaron 5 cintas adhesivas en 5 orejas diferentes. Para establecer el espesor de la piel de cerdo utilizada se midió la TEWL posterior a la aplicación de 17 cintas.

Por otro lado, las formulaciones NC-CRV o NP-BCO estuvieron en contacto con la piel durante 1, 2 y 4 h. Después del tiempo de contacto, la formulación se retiró y se realizó la técnica de *tape stripping*. El CRV presente en cada cinta fue extraído con 1 mL de metanol (TEDIA) en agitación constante durante 30 min. Se realizó la cuantificación del CRV en cada cinta extraída con el método de CG-FID previamente validado.

## 9. RESULTADOS

### Obtención y caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas con carvacrol

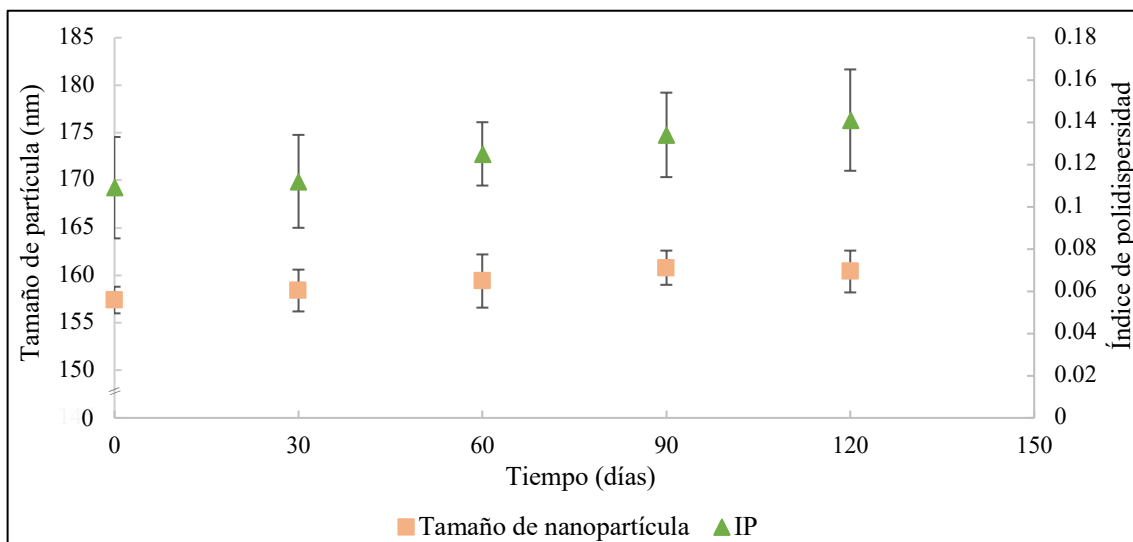
En el presente estudio, se obtuvieron NP-BCO y NC-CRV y se determinó su tamaño de partícula e IP por espectroscopía de correlación fotónica. Asimismo, se evaluó el potencial  $\zeta$  mediante microelectroforesis láser Doppler. En la Tabla 1 se muestran las características fisicoquímicas de las formulaciones obtenidas en este trabajo.

**Tabla 1.-** Características fisicoquímicas de NP-BCO y NC-CRV obtenidas por la técnica de nanoprecipitación.

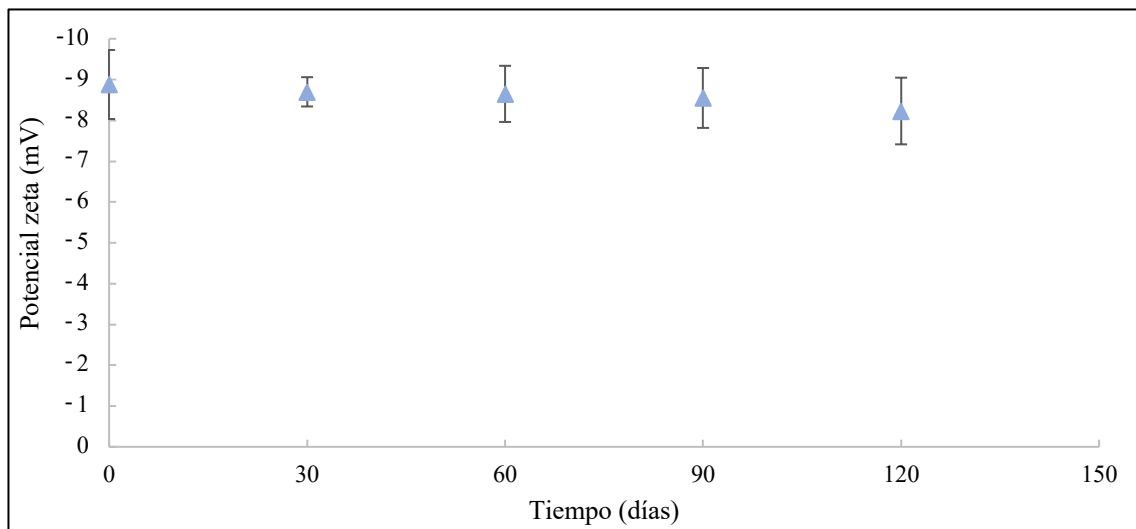
FORMULACIÓN	TAMAÑO (nm)	IP <sup>1</sup>	POTENCIAL $\zeta$ (mV)
NC-BCO <sup>2</sup>	154.8 $\pm$ 3.7	0.124 $\pm$ 0.019	-8.26 $\pm$ 0.971
NC-CRV <sup>3</sup>	157.4 $\pm$ 1.4	0.109 $\pm$ 0.024	-8.88 $\pm$ 0.846

<sup>1</sup>Índice de polidispersidad que varía de 0 a 1, un valor más alto corresponde a una distribución de tamaño de NP menos homogénea.  
<sup>2</sup>Nanopartículas blanco; <sup>3</sup>Nanocápsulas cargadas con CRV; (n= 3;  $\bar{x} \pm DS$ ).

Como parte de la caracterización fisicoquímica de la dispersión de NC-CRV se evaluó su estabilidad durante 120 días. En la Figura 7, se presentan los valores de tamaño de partícula e IP y en la Figura 8 se muestran los valores de potencial  $\zeta$  obtenidos durante el tiempo de almacenamiento.



**Figura 7.** Evaluación del tamaño de partícula (nm) e IP de las NC-CRV obtenidas por la técnica de nanoprecipitación durante 120 días de almacenamiento a 25 °C; (n= 3;  $\bar{x} \pm DS$ ).



**Figura 8.** Evaluación de la densidad de carga de las NC-CRV obtenidas por la técnica de nanoprecipitación durante 120 días de almacenamiento a 25 °C; (n= 3;  $\bar{x} \pm DS$ ).

Para el análisis por FT-IR se utilizaron los componentes de las NC, es decir: CRV, PCL, y Tween 80. En la Figura 9 se muestran los espectros de infrarrojo de los componentes, así como de las NC-CRV.

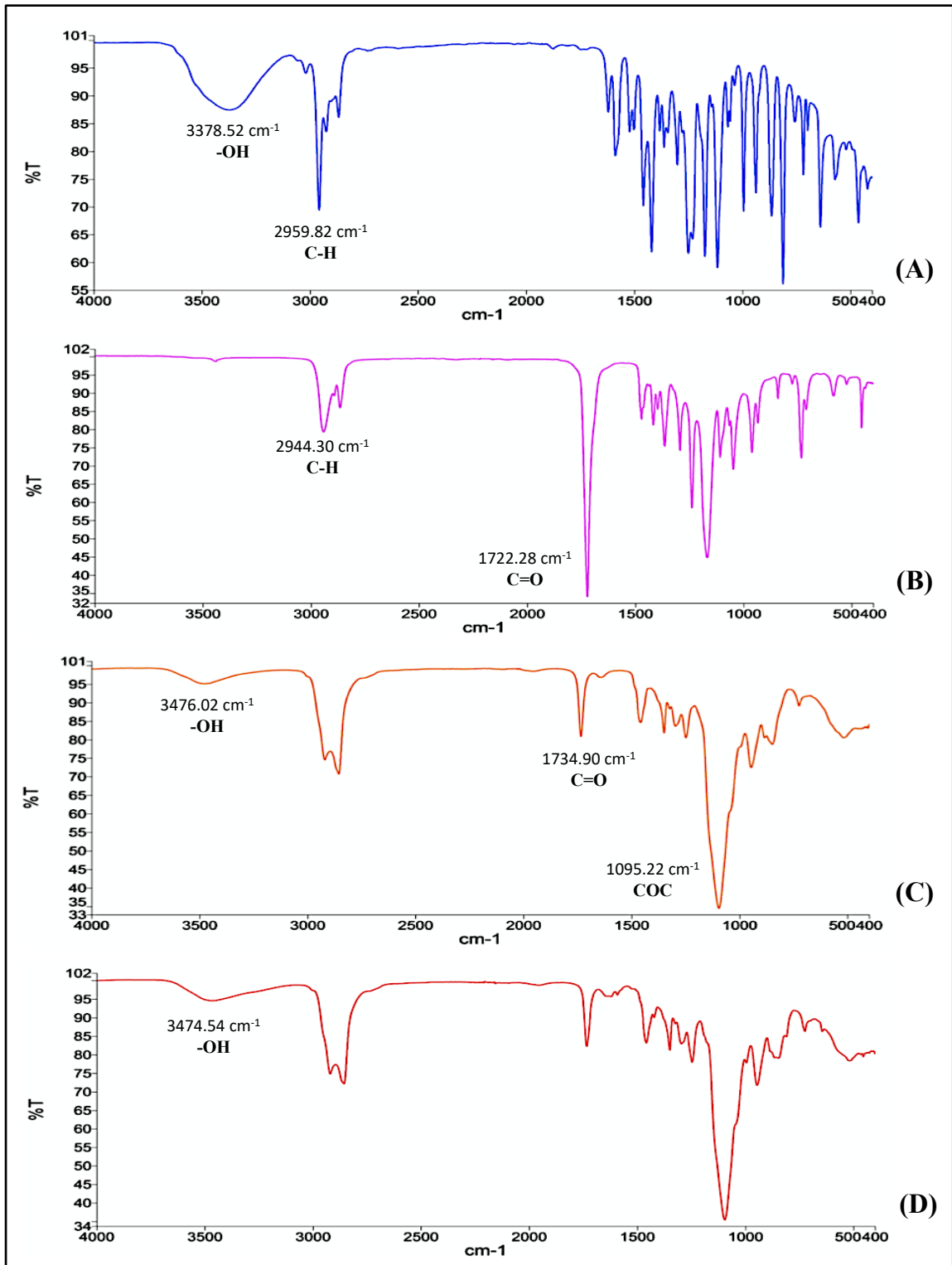


Figura 9. Espectros de FT-IR de carvacrol (A), poli(ε-caprolactona) (B), Tween 80 (C) y NC-CRV (D).

En relación con la caracterización fisicoquímica de las NC-CRV, se cuantificó el CRV presente en las NC mediante el método de CG-FID desarrollado y validado. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la determinación del % E (Fórmula 1) y % EE (Fórmula 2).

**Tabla 2.** Porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación de carvacrol.

DETERMINACIÓN	CARVACROL
Encapsulación (%)	13.19 ± 0.85
Eficiencia de encapsulación (%)	28.39 ± 1.70

(n=3;  $\bar{x} \pm DS$ ).

El contenido de CRV presente en el sobrenadante se cuantificó por el método de CG-FID previamente validado, obteniendo un resultado de  $24.80 \pm 1.39$  % (n=3;  $\bar{x} \pm DS$ ).

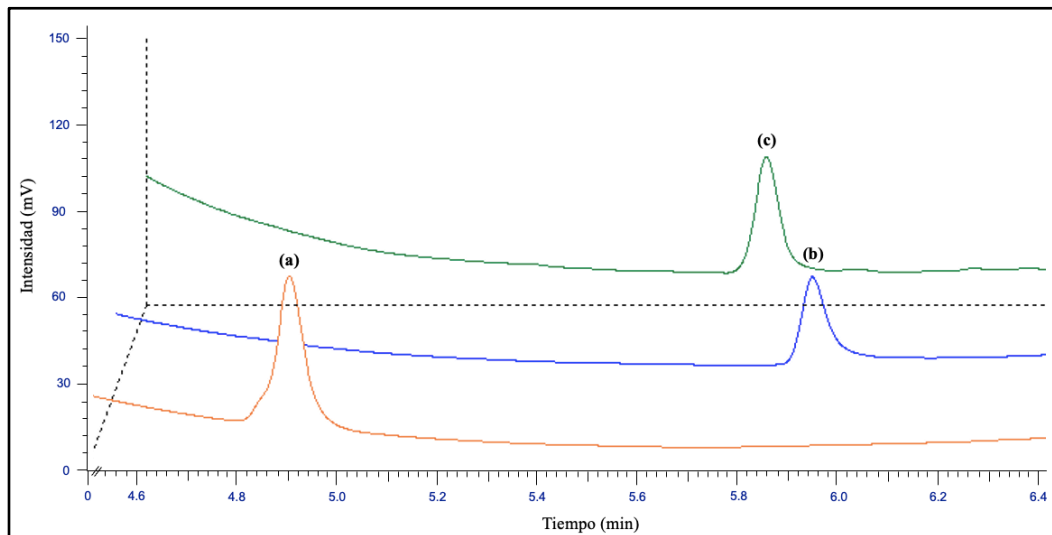
### **Desarrollo y validación de un método analítico por CG-FID para cuantificar el carvacrol en nanocápsulas poliméricas**

El método analítico se desarrolló a partir de las condiciones previamente establecidas por Cavazos-Rodríguez, 2011 (Tabla 3, programa 1). Para la optimización del método fue necesario realizar modificaciones en la rampa de temperaturas en el horno de la columna. En la Tabla 7 se muestran las condiciones utilizadas.

**Tabla 3.-** Optimización del método por CG-FID por inyección directa para cuantificar el carvacrol.

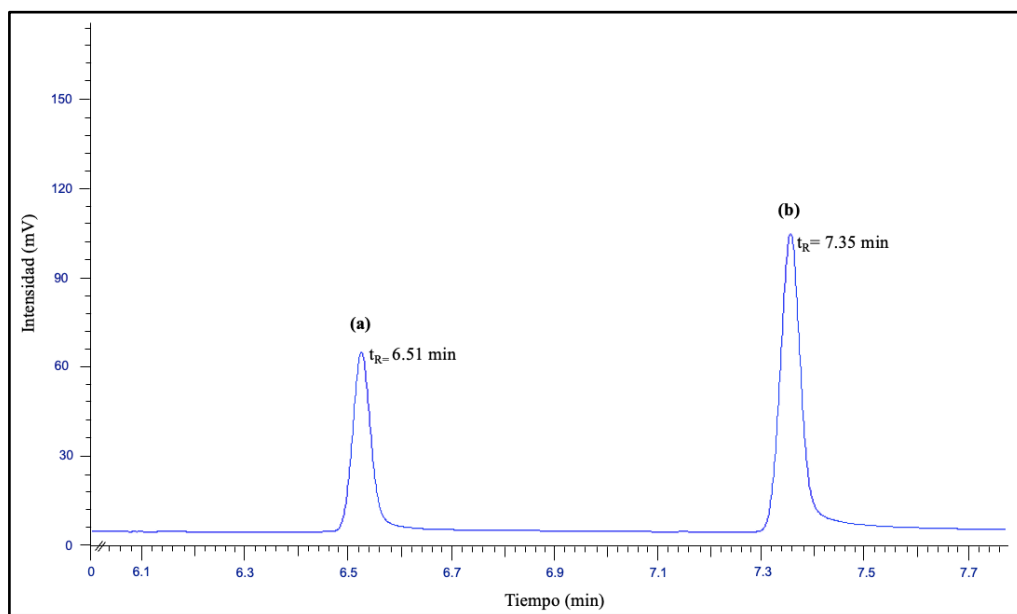
Programa	Condiciones
<b>1</b>	<i>Rampa de temperaturas del horno:</i> Inició a 130 °C, se mantuvo 1 min, se elevó a 30 °C/min hasta 190 °C, posteriormente se incrementó a 10 °C/min hasta 210 °C. Finalmente, se elevó a 30 °C/min hasta 270 °C durante 3 min. <i>Temp. del inyector:</i> 250 °C. <i>Temp. del detector:</i> 270 °C.
<b>4</b>	<i>Rampa de temperaturas del horno:</i> Inició a 70 °C, se mantuvo 1 min, se elevó a 30 °C/min hasta 160 °C, posteriormente se incrementó a 10 °C/min hasta 210 °C. Finalmente, se elevó a 30 °C/min hasta 270 °C durante 3 min. <i>Temp. del inyector:</i> 250 °C. <i>Temp. del detector:</i> 270 °C.

Las condiciones seleccionadas fueron las mostradas en el programa 4. Para establecer el estándar interno, se evaluaron soluciones de dos estándares: mentol y eugenol. Se seleccionó el mentol como estándar interno (Figura 10).



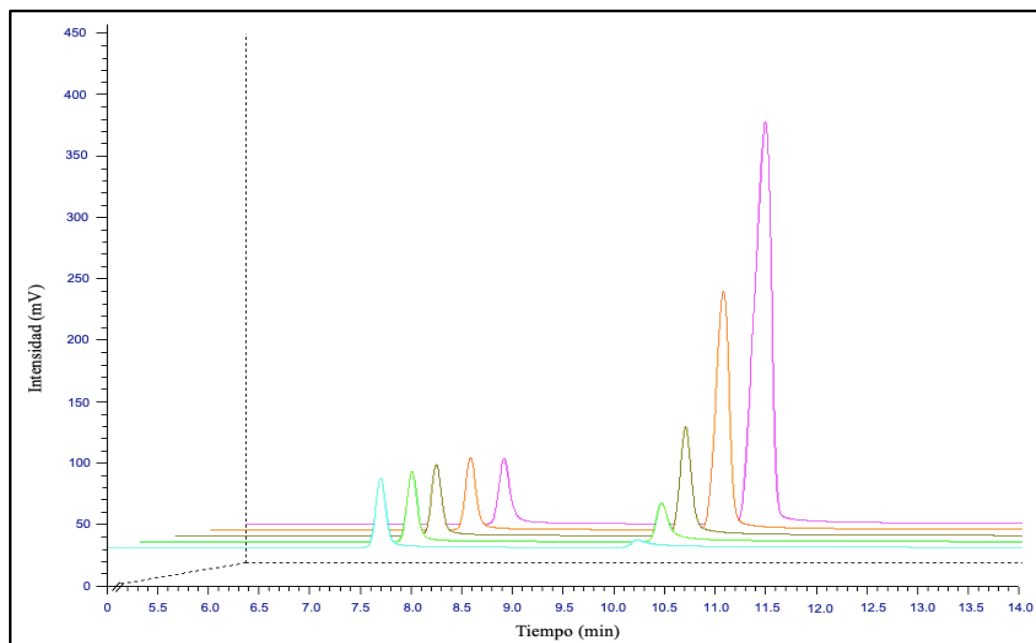
**Figura 10.** Cromatogramas de los estándares de (a) mentol, (b) eugenol y (c) carvacrol en metanol por CG-FID (inyección directa).

En la Figura 11 se muestra el cromatograma del CRV y el mentol bajo las condiciones del programa 4 por inyección directa.



**Figura 11.** Cromatogramas de (a) mentol (50 µg/mL) y (b) carvacrol (100 µg/mL) por CG-FID (inyección directa).

En relación con la validación del método, en una primera etapa se realizó una curva de calibración con cinco niveles de concentración del CRV (25, 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g/mL}$ ) y el mentol como estándar interno a 50  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 12).



**Figura 12.** Cromatogramas obtenidos de la curva de calibración del carvacrol (25–400  $\mu\text{g/mL}$ ) con adición de estándar interno (50  $\mu\text{g/mL}$ ) por CG-FID (inyección directa).

Para la validación del sistema se evaluaron los parámetros analíticos de linealidad, LDD, LDC y precisión, mientras que para la validación del método se determinó la exactitud y precisión (Tabla 4).

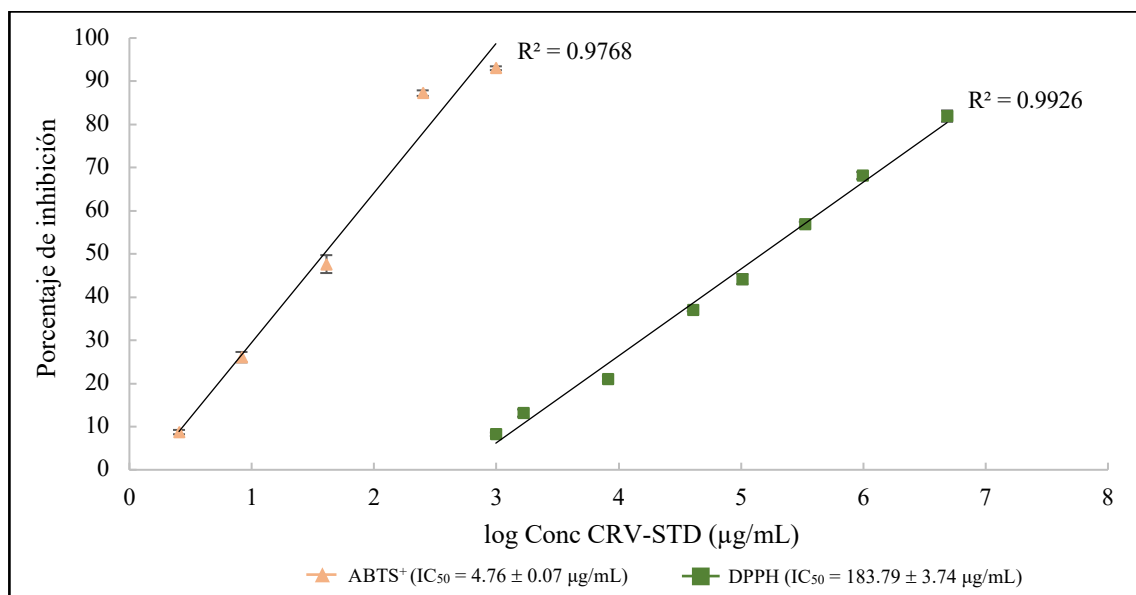
### **Determinación de la capacidad antioxidante del carvacrol**

La actividad antioxidante del CRV se determinó mediante los ensayos de ABTS<sup>+</sup> y DPPH. En la Figura 13 se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones del CRV-STD en ambos ensayos. Asimismo, se muestran las IC<sub>50</sub> del CRV-STD obtenidas mediante el análisis probit.

**Tabla 4.** Parámetros de validación del método para el carvacrol por CG-FID (inyección directa).

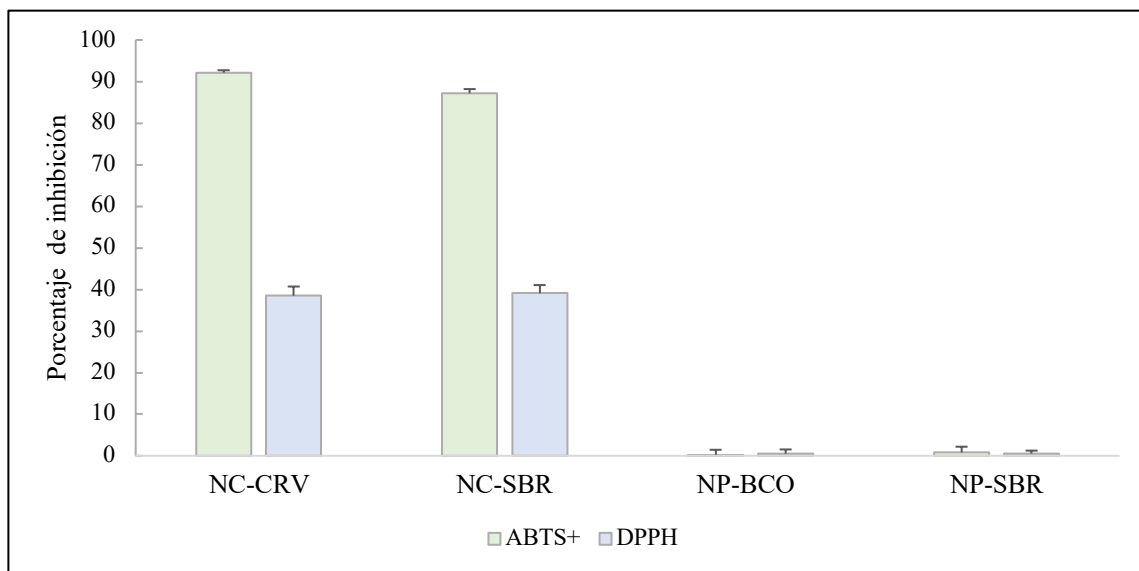
VALIDACIÓN DEL SISTEMA		
PARÁMETRO	CARVACROL	VALOR DE REFERENCIA <sup>1</sup>
Linealidad ( $r^2$ )	0.999	$r^2 \geq 0.99$
Límite de detección ( $\mu\text{g/mL}$ )	3.472	$L \leq$ nivel inferior estimado en la linealidad
Límite de cuantificación ( $\mu\text{g/mL}$ )	10.521	$L \leq$ nivel inferior estimado en la linealidad
Precisión (% DER)	5.53	$< 10^*$
VALIDACIÓN DEL MÉTODO		
PARÁMETRO	CARVACROL	VALOR DE REFERENCIA <sup>1</sup>
Exactitud (% R)	92.82	70-110
Precisión (% DER)	10.69	$< 12^{**}$

<sup>1</sup>Secretaría de Salud, CCAAYAC-P-058, 2011; \*Xavier-Junior *et al.* 2017; \*\*Sousa *et al.* 2011.



**Figura 13.** Capacidad antioxidante del estándar de carvacrol por los ensayos de ABTS<sup>+</sup> y DPPH ( $n=3$ ;  $\bar{x} \pm DS$ ).

En relación con la capacidad antioxidante de la formulación de NC-CRV en la Figura 14 se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos al evaluar NC-CRV y NC-SBR (CRV no encapsulado) por los ensayos de ABTS<sup>+</sup> y DPPH.



**Figura 14.** Capacidad antioxidante de NC-CRV y NC-SBR por los ensayos de ABTS<sup>+</sup> y DPPH ( $n=6$ ;  $\bar{x} \pm DS$ ).

El porcentaje de inhibición de la NC-PST (CRV encapsulado) después del proceso de extracción con metanol por el ensayo de DPPH fue de  $54.46 \pm 2.67$  % ( $n=2$ ;  $\bar{x} \pm DS$ ).

### **Valoración del efecto dermoprotector del carvacrol nanoencapsulado en un modelo de piel porcina por técnicas de bioingeniería y *tape stripping***

Antes de su exposición a las NC-CRV y NP-BCO, se realizó una valoración biofísica de la piel determinando los valores basales de TEWL, pH y contenido de agua del EC. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

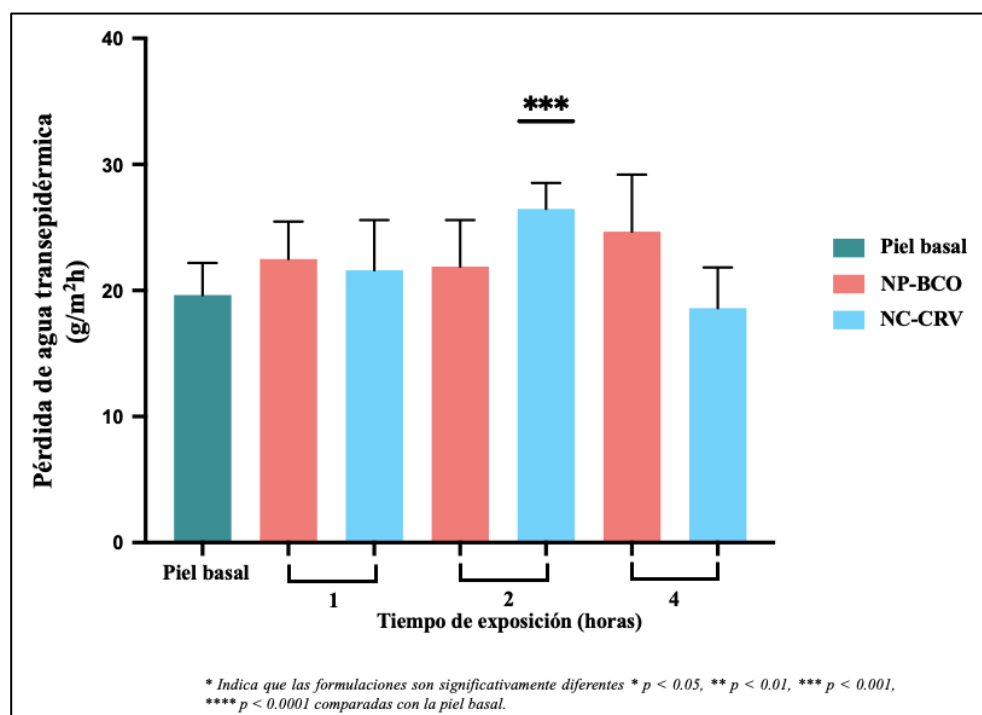
Posterior a la determinación de los valores basales de la piel de oreja de cerdo, se utilizó un modelo *ex vivo* de piel porcina en las celdas de Franz con la aplicación de NC-CRV y NP-BCO durante 1, 2 y 4 h de exposición con la piel.

**Tabla 5.** Parámetros biofísicos basales de la piel de cerdo.

	<b>Pérdida de agua transepidérmica (g/m<sup>2</sup>h)</b>	<b>pH</b>	<b>Contenido de agua del EC (UA)</b>
<b>Piel de oreja de cerdo</b>	19.10 ± 2.31*	6.00 ± 0.55**	35.61 ± 2.78***

\*(n=35;  $\bar{x} \pm DS$ ); \*\*(n=45;  $\bar{x} \pm DS$ ); \*\*\*(n=24;  $\bar{x} \pm DS$ ).

Después del contacto de las formulaciones en la superficie de la piel durante 1, 2 y 4 h, se evaluó la TEWL, pH y contenido de agua del EC. Con los resultados obtenidos se llevó a cabo el análisis estadístico utilizando la prueba ANOVA de un factor (software GraphPad Prism versión 7.0). La prueba de Tukey se utilizó con una  $p < 0.05$  como nivel de significancia. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 15, 16 y 17.



**Figura 15.** Valores de pérdida de agua transepidérmica antes y después de la aplicación de NP-BCO y NC-CRV durante 1, 2 y 4 h.

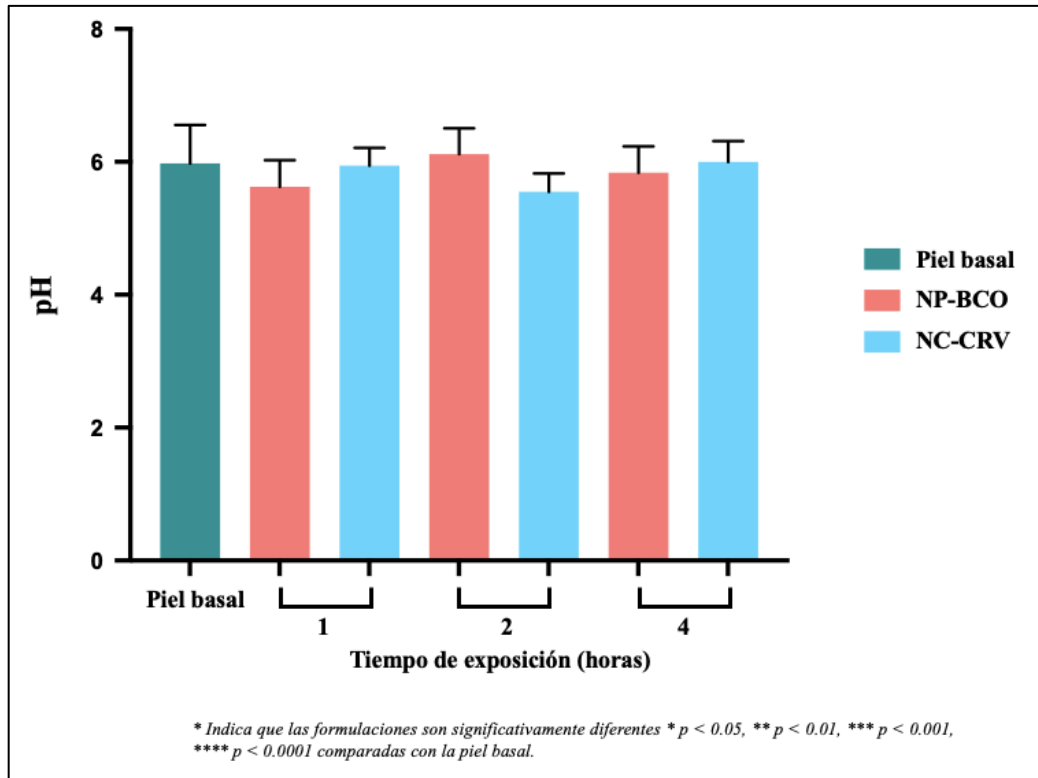


Figura 16. Valores de pH antes y después de la aplicación de NP-BCO y NC-CRV durante 1, 2 y 4 h.

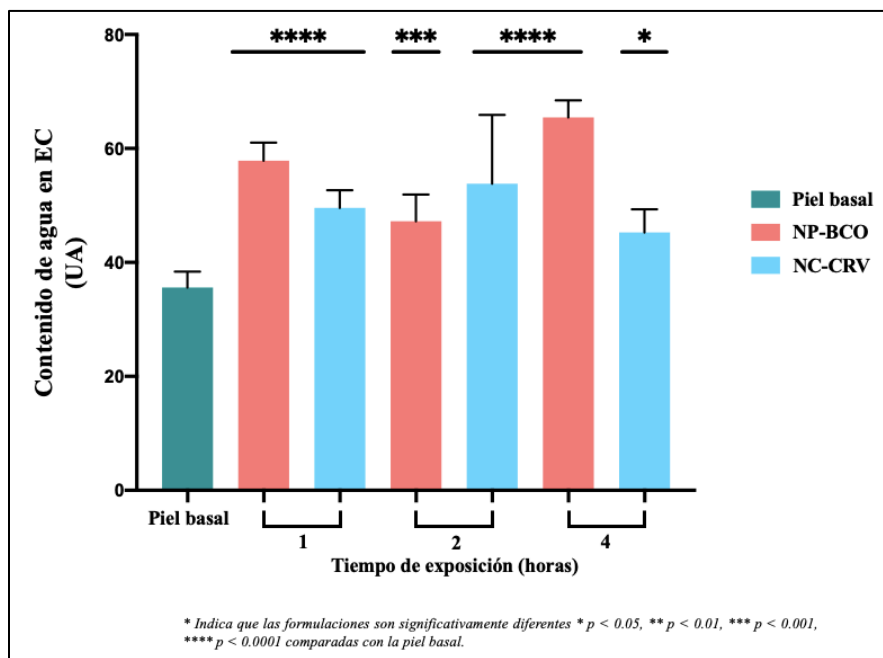
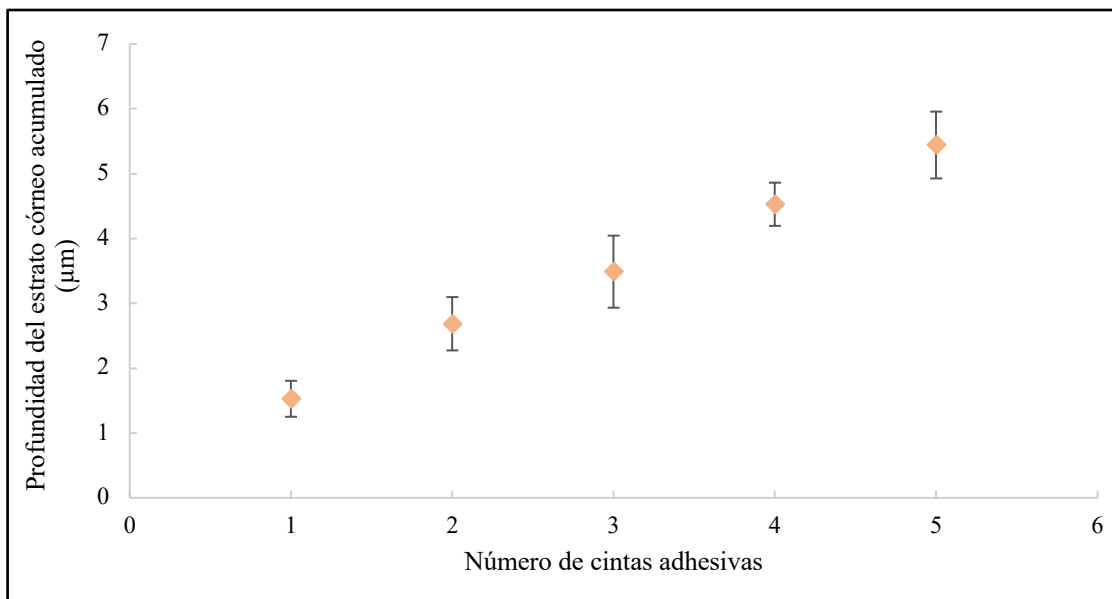


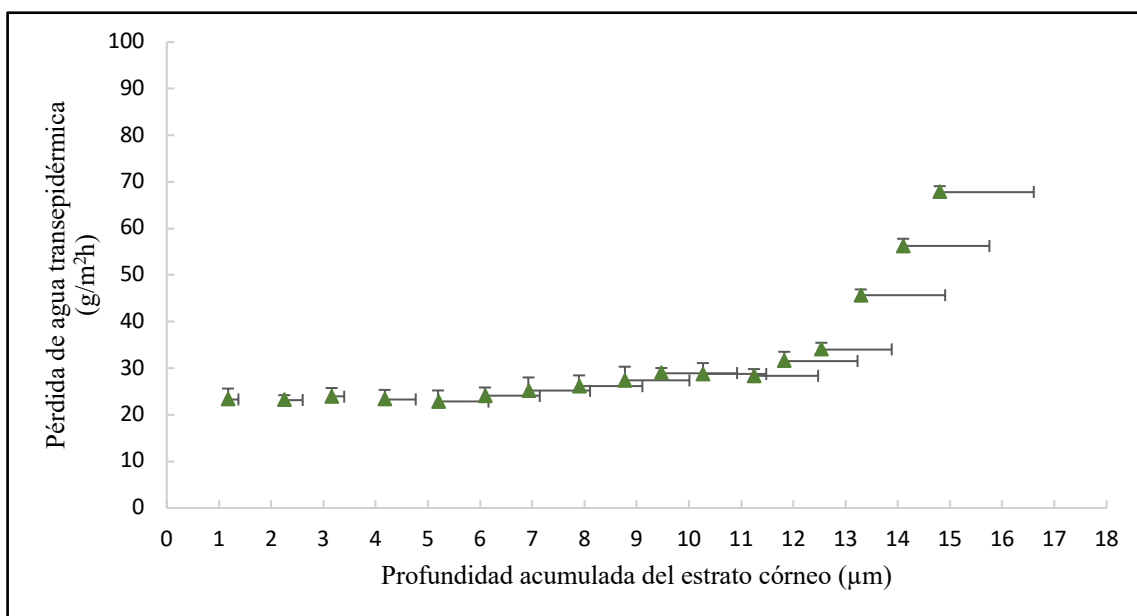
Figura 17. Valores del contenido de agua en EC antes y después de la aplicación de NP-BCO y NC-CRV durante 1, 2 y 4 horas.

Con respecto a la optimización de la técnica de *tape stripping* (Figura 18), se estableció que después de aplicar 5 cintas adhesivas en la oreja de cerdo, se llegó a una profundidad de EC de  $5.44 \pm 0.52 \mu\text{m}$ .



**Figura 18.** Optimización de la técnica de *tape stripping* en piel de cerdo sin tratamiento ( $n=5$ ;  $\bar{x} \pm DS$ ).

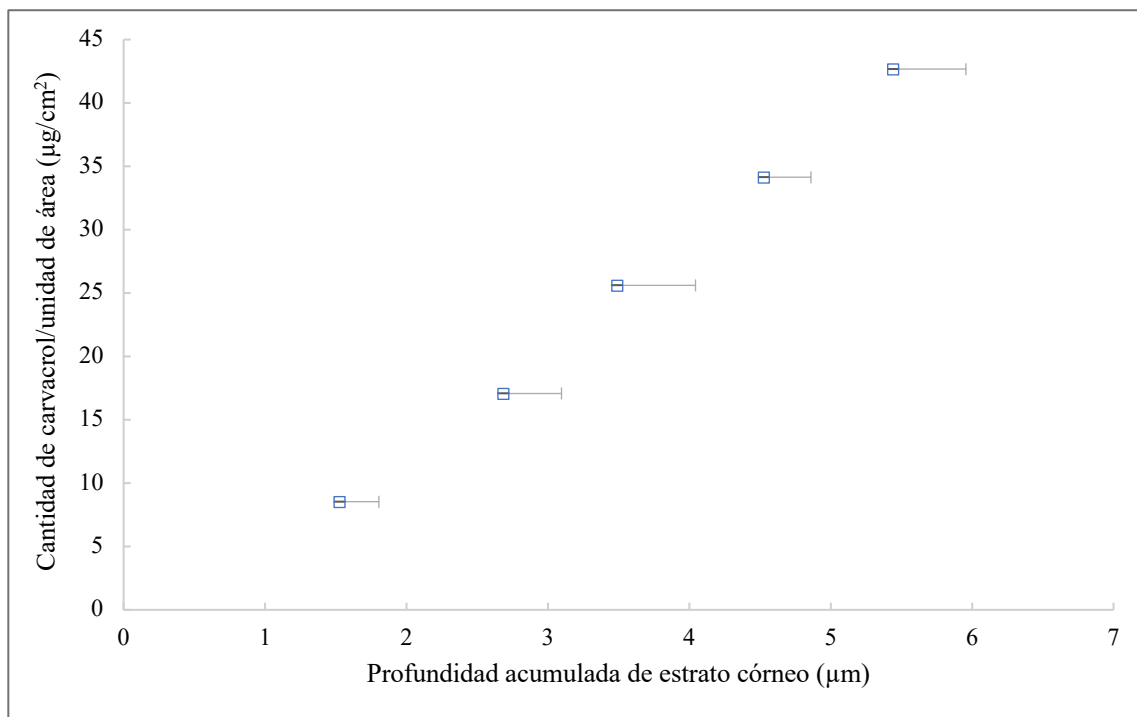
Con la finalidad de conocer la profundidad total del EC de la oreja de cerdo, se evaluó la TEWL ( $\text{g}/\text{m}^2\text{h}$ ) después del arranque de 17 cintas aplicadas en la técnica de *tape stripping* previamente optimizada.



**Figura 19.** Pérdida de agua transepidérmica ( $\text{g}/\text{m}^2\text{h}$ ) en función de la profundidad de EC acumulada ( $\mu\text{m}$ ) ( $n=5$ ;  $\bar{x} \pm DS$ ).

Se estableció que la piel de cerdo utilizada en este estudio presentaba un espesor de  $12.18 \pm 0.50 \mu\text{m}$ . En la Figura 19 se presentan los valores de TEWL ( $\text{g}/\text{m}^2\text{h}$ ) en función de la profundidad del EC acumulado ( $\mu\text{m}$ ).

Después de la aplicación de la NC-CRV en la piel durante 1, 2 y 4 h, se aplicó la técnica de *tape stripping* y se analizó por CG-FID con el método previamente validado. Cabe mencionar que únicamente después de 4 h de aplicación de NC-CRV en piel fue posible cuantificar el CRV en las cintas. En la Figura 20 se muestra la cantidad de CRV en el EC después de 4 h de contacto de las NC-CRV con la piel.



**Figura 20.** Cantidad de carvacrol en estrato córneo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en función de la profundidad acumulada después de la aplicación de la NC-CRV durante 4 h ( $n=5$ ;  $\bar{x} \pm DS$ ).

## 10. DISCUSIÓN

### Obtención y caracterización físicoquímica de las nanocápsulas con carvacrol

Varios estudios *in vivo* e *in vitro* han reportado las diversas propiedades bioactivas del CRV, por ejemplo, antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antisépticas, antiinflamatoria, quimiopreventiva y, principalmente, antioxidante (Da Rosa *et al.*, 2015). Sin embargo, debido a que el CRV es un compuesto altamente lipofílico ( $\log P = 3.52$ ), con baja solubilidad en agua ( $0.11 \text{ g L}^{-1}$ ), muy volátil (6.4 Pa a 25 °C) y sensible a la exposición al medio ambiente (calor, luz, oxígeno) su aplicación biológica está limitada (Ben *et al.*, 2006; Hussein *et al.*, 2017).

La encapsulación de compuestos activos como el CRV, en NP, es una de las alternativas para proteger al compuesto y preservar sus propiedades biológicas (Da Rosa *et al.*, 2015). En el presente estudio, se encapsuló el CRV en NC poliméricas por la técnica de nanoprecipitación. Esta técnica, se basa en la deposición interfacial de un polímero después del desplazamiento de la fase orgánica en una fase acuosa, dando como resultado el atrapamiento del compuesto activo en una matriz o vesícula polimérica (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004).

Dentro de las características físicoquímicas de las NP que tienen efecto sobre su actividad biológica se encuentran el tamaño, la densidad de carga superficial y el tipo de polímero que las conforman. En la Tabla 1 se muestran las características físicoquímicas de las NC-CRV obtenidas en este trabajo. Respecto al tamaño de partícula, la NC-CRV y NP-BCO mostraron un diámetro de  $157.4 \pm 1.4$  y  $154.8 \pm 3.7$  nm, respectivamente. Un resultado similar fue reportado por Cavazos-Rodríguez (2011) quien obtuvo NC cargadas con CRV y NP sin activo con un tamaño de alrededor de 180 nm. Asimismo, Mir y colaboradores (2019), obtuvieron NC cargadas con CRV y NP no cargadas, con tamaños de 190 y 184 nm, respectivamente. El tamaño de partícula es un factor importante para la administración de compuestos activos destinados a actuar sobre las capas superiores de la piel. Se ha establecido como ideal las NP con un tamaño alrededor de los 200 nm, debido a que permiten la distribución del compuesto activo en el EC a través de los folículos

pilosos y las glándulas sudoríparas, sin penetrarlo (Álvarez *et al.*, 2004; Cavazos-Rodríguez, 2011).

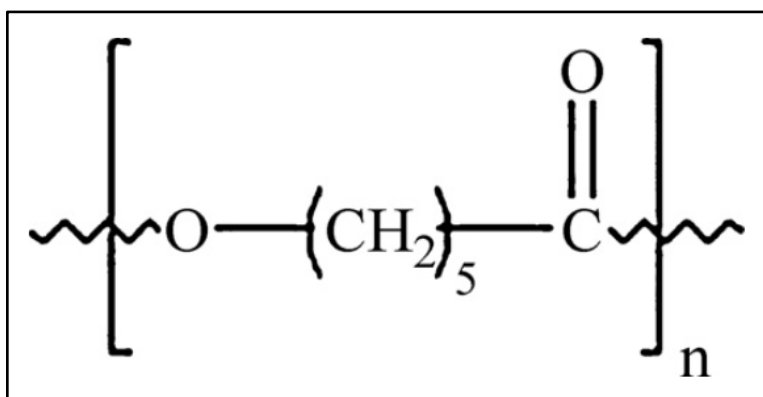
Otra de las características que se evaluaron en las NC fue el IP, el cual es un parámetro asociado a la homogeneidad de la dispersión de las NC, donde un valor inferior a 0.200 indica la presencia de un sistema homogéneo (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004). En este trabajo, el IP para la NC-CRV y NP-BCO fue de  $0.109 \pm 0.024$  y  $0.124 \pm 0.019$ , respectivamente (Tabla 1), lo que indica que la mayoría de las NP presentan tamaños similares. Este resultado coincide con los obtenidos en otras formulaciones elaboradas con el CRV y el mismo polímero (Cavazos-Rodríguez, 2011; Mir *et al.*, 2019). Las distribuciones uniformes de tamaño de partícula ( $IP < 0.200$ ) permitirán que las interacciones individuales de las NC (e. g. bioadhesión, liberación del compuesto) ocurran de manera homogénea en la piel (Guterres *et al.*, 2007).

En cuanto a la estabilidad de la formulación de NC-CRV, en la Figura 7 se puede observar que ni el tamaño de partícula, ni el IP, cambiaron en los 4 meses de estudio. Su distribución con tendencia monomodal ( $IP < 0.200$ ) indica una mejor estabilidad en comparación con aquellas dispersiones con un IP cercanos a 1, donde se podría observar agregación de las NC (Diyanat *et al.*, 2019). Así mismo, cabe mencionar que la dispersión de NC-CRV no mostró modificaciones visuales, como aglomerados, alteración del color o separación de fases durante los 4 meses. En su conjunto, los resultados indican que la formulación conservó sus características iniciales, por lo que, se puede considerar que fue estable en este lapso. La estabilidad de la formulación de NC-CRV está relacionada a un mecanismo estérico otorgado por la presencia del tensoactivo no iónico en el medio (Wu *et al.*, 2011). Según Fraj *et al.* el Tween 80 contribuye en la estabilidad de las NC debido a que está constituido por un segmento de anclaje que interactúa con las partículas dispersas y por grupos de cabeza de polioxietileno hidrofílico, que se extienden hacia la solución reduciendo la tensión interfacial e impidiendo la agregación de las NP.

Otro de los parámetros determinados fue el potencial  $\zeta$ , el cual es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrocinética en sistemas coloidales (Honary & Zahir, 2013). Este valor influye tanto en la estabilidad de las NP, como en su interacción

con el sistema biológico blanco (Kumar, 2019). El potencial  $\zeta$  para las NP-BCO y NC-CRV fue de -8.26 y -8.88 mV, respectivamente (Tabla 1). Estos valores coinciden con aquellos reportados por (Khoobdel *et al.*, 2017) con NC de PCL con un potencial  $\zeta$  de -11 mV. Ellos mencionan que la presencia del compuesto activo no es un factor que influya en los valores del potencial  $\zeta$ . En un trabajo realizado por Shakeri *et al.* también se observó que la incorporación del compuesto activo no influyó en el potencial  $\zeta$ , los valores reportados fueron de -24 y -26 mV para las NP blanco y las NC cargadas con CRV, respectivamente. Por otro lado, en la formulación de las NC-CRV y NP-BCO, se utilizó Tween 80 como agente tensoactivo. Debido a su naturaleza no iónica, presenta poca influencia en el potencial de las NC de acuerdo con lo reportado por Ephrem *et al.* que observaron que la adición del tensoactivo no modificaba los valores del potencial.

En particular, los valores ligeramente negativos del potencial  $\zeta$  que presentan las NC-CRV, se podrían atribuir al polímero formador de las NC: la PCL. En la Figura 21 se observa que la PCL es un polímero con grupos carboxílicos (-COOH) en las extremidades, que al disociarse en agua da lugar al ión carboxilato (COO<sup>-</sup>) que causa que la superficie se cargue negativamente (Fraj *et al.*, 2019).



**Figura 21.** Estructura de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (Bordes *et al.* 2010).

La densidad de carga de las NC es un parámetro que determina su interacción con la piel. Aunque la permeabilidad selectiva de la piel, la cual presenta carga negativa, podría favorecer el cruce de especies catiónicas (Marro *et al.*, 2001), en este trabajo no se vio afectada la penetración de las NC-CRV a pesar de su densidad de carga.

Por otro lado, aunque la magnitud del potencial  $\zeta$  de las NC-CRV (-8.88 mV) no fue elevada, manteniendo ese valor moderado (Figura 8) fue suficiente para proveer de estabilidad a la formulación, impidiendo la agregación de las NP durante al menos 4 meses.

Continuando con la caracterización química de la formulación, las NC-CRV se evaluaron mediante espectroscopia de infrarrojo. Esta técnica se emplea para el análisis y la identificación de la estructura molecular de una sustancia, y se basa en hacer incidir radiación infrarroja sobre una muestra para provocar cambios en los estados vibracionales particulares de las moléculas que la componen (Mesa-Téllez, 2019). La región del infrarrojo medio (MIR):  $4,000-400\text{ cm}^{-1}$  es la zona del espectro con mayor riqueza de información, debido a que en ella se encuentran las bandas de absorción características de casi todos los grupos funcionales (Carranza-Ramírez, 2006).

En este trabajo, se realizó el análisis FT-IR para determinar si existen nuevas interacciones entre los componentes utilizados para la formulación de NP. Los espectros del CRV, el polímero, el tensoactivo y la NC-CRV se muestran en la Figura 9. El espectro del CRV (Figura 9-A) mostró una banda alrededor de  $3378.52\text{ cm}^{-1}$ , perteneciente a las vibraciones de enlaces del grupo hidroxilo (-OH). Otra de las bandas presentes se encuentra alrededor de los  $2959.82\text{ cm}^{-1}$ , las cuales aparecen debido a la presencia de grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) y metileno (-CH<sub>2</sub>-). Estos picos son similares a los informados por otros estudios (Keawchaon & Rangrong, 2011). El espectro de la PLC (Figura 9-B), mostró una banda alrededor de  $2944.30\text{ cm}^{-1}$ , debido a las vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos -CH<sub>2</sub>-. Asimismo, en este espectro fue posible observar un estiramiento fuerte alrededor de  $1722.28\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al grupo carbonilo (C=O). Las bandas encontradas en este espectro son similares a las observadas por Elzein y col. (2004). Por otra parte, en el espectro del tensoactivo (Figura 9-C), se apreció una banda ancha en la región de  $3476.02\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo -OH. Además, se observó un pico alrededor de  $1734.90\text{ cm}^{-1}$ , la cual se debe a las vibraciones del grupo C=O. Igualmente, presentó una banda alrededor de los  $1095.22\text{ cm}^{-1}$  característica de los ésteres (C-O-C). Los grupos funcionales identificados en el espectro del tensoactivo coinciden con los observados por Khan *et al.* (2011). En relación con el

espectro de la NC-CRV (Figura 9-D) se detectaron las bandas de los grupos funcionales observados en los espectros de cada compuesto de la formulación. Además, no se presentaron nuevas bandas correspondientes a la formación de nuevos compuestos, lo que indica que sólo hay interacción química entre los compuestos formadores de las NP. Sin embargo, se destaca una diferencia en cuanto a la intensidad de la banda ancha en la región  $3500-3200\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al grupo  $-\text{OH}$ , representativo de los compuestos fenólicos como el CRV (Figura 4), por lo que puede ser un indicio de la presencia de algunas moléculas de CRV en la superficie de las NC.

Determinar la cantidad de CRV nanoencapsulado es esencial para una adecuada dosificación del activo, lo que está estrechamente relacionado con su efecto antioxidante en la piel y sobre su capacidad antioxidante. Por lo tanto, como parte de la caracterización química se determinaron el % E y el % EE, mediante la cuantificación del CRV presente en las NC empleando el método de CG-FID previamente validado.

En las NC-CRV tuvieron una eficiencia de encapsulación del  $28.39 \pm 1.70$  (Tabla 2), lo que indica que el CRV fue encapsulado al menos en un 28 % con respecto a la cantidad inicial durante el proceso de nanoprecipitación. Este resultado coincide con Mir *et al.* 2019, quienes obtuvieron NC de PCL cargadas con CRV con un % EE entre 27 y 89%.

En relación con la técnica de nanoprecipitación, diferentes publicaciones han hecho mención que los % EE de activos lipofílicos se encuentran alrededor del 80 % (Mora-Huertas *et al.*, 2010). En el caso del CRV, con un coeficiente de partición (octanol/agua) de 3.14, el % EE pudo haber disminuido debido a una migración parcial del CRV hacia el medio acuoso de la formulación. Esto pudo confirmarse al hacer la cuantificación y, posterior determinación, de CRV en el sobrenadante de la formulación de NC-CRV, la cual correspondió a  $24.80 \pm 1.39\%$ .

Por otra parte, el % E obtenido fue de  $13.19 \pm 0.85\%$ , este valor indica que la NC está formada por un 13.19 % de CRV y un 86.81 % por polímero. Este resultado es

semejante a lo reportado por Ramírez-Pérez (2019), con un % E de 8.74 % para eugenol en NC de Eudragit L100-55. Asimismo, en los resultados reportados por Cavazos-Rodríguez (2011) se menciona que NC de PCL con CRV presentaron un % E = 51 %. Cabe mencionar que Cavazos realizó la cuantificación indirecta del CRV (sobrenadante) por CG-FID. En este trabajo se realizó la cuantificación directa del CRV en las NC, posterior a un proceso continuo de extracción. La cuantificación del CRV en el lote de NC-CRV permitió una adecuada dosificación en los ensayos biológicos y de actividad antioxidante que se realizaron posteriormente.

### **Desarrollo y validación de un método analítico por CG-FID para cuantificar el carvacrol en nanocápsulas poliméricas**

La cromatografía de gases es una técnica de separación moderna y sofisticada que se puede utilizar para el análisis cuantitativo de una extensa gama de compuestos orgánicos, como los AE y sus componentes (Ye & Deng, 2009). El detector por ionización por flama (FID), es ampliamente utilizado en CG debido a que ofrece una elevada sensibilidad (detecta a niveles de ppm) y permite un amplio rango de respuesta lineal (Morales-Guevara, 2017).

El análisis por CG requiere el desarrollo de métodos analíticos adaptados que permitan la determinación de la concentración del activo en la muestra. En este trabajo, se optimizó un método analítico por CG-FID por inyección directa para cuantificar el CRV incorporado en las NC. Se partió de condiciones cromatográficas previamente establecidas por Cavazos-Rodríguez (2011) (Tabla 3, programa 1). Se realizaron modificaciones en la temperatura del horno para aumentar el tiempo de retención del CRV y mejorar su resolución. Con las condiciones cromatográficas establecidas en el programa 4 se logró un tiempo de retención de 7.35 min para el CRV así como una buena resolución del pico cromatográfico (Figura 11).

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas óptimas, se evaluaron los estándares de mentol y eugenol para ser utilizados como estándares internos. El uso del

método de estándar interno permite compensar errores aleatorios y sistemáticos presentes en el equipo analítico. En la Figura 10 se muestran los cromatogramas del mentol, eugenol y del CRV con el programa 4. Se seleccionó al mentol como estándar interno ya que tiene propiedades fisicoquímicas similares al CRV y su tiempo de retención no interfiere con su cuantificación (Figura 11).

Las NP están elaboradas con matrices poliméricas y agentes tensoactivos que interfieren con la cuantificación directa del activo incorporado, haciendo indispensable el uso de técnicas cromatográficas validadas, con el propósito de obtener resultados suficientemente fiables. El método de CG-FID por inyección directa para cuantificar el CRV en las NC se validó de acuerdo con los criterios establecidos por la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058) (Secretaría de Salud, 2011) y la ICH (ICH, 2005). Para la validación del sistema se evaluaron los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión, mientras que para la validación del método se evaluó exactitud y precisión. En la Figura 12 se muestran los cromatogramas obtenidos en la validación del sistema. Los parámetros analíticos evaluados se presentan en la Tabla 4.

El método analítico demostró ser lineal con un coeficiente de determinación mayor a 0.99, como lo establece la CCAYAC-P-058. Lo anterior indica que dentro del intervalo de concentraciones de 25 a 400  $\mu\text{g/mL}$  de CRV se obtienen respuestas (área de pico) directamente proporcionales a la concentración (Torralvo-Martínez, 2017).

En cuanto a los LDD y LDC se obtuvieron valores de 3.47 y 10.52  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. El LDD es un parámetro que hace referencia a la mínima concentración del compuesto en estudio que es posible detectar, pero no necesariamente cuantificar bajo las condiciones experimentales establecidas. Por otra parte, el LDC se considera como la mínima concentración del analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones operacionales del método (López-Razo, 2013). De acuerdo con esto, el método desarrollado permite detectar y cuantificar concentraciones por debajo del nivel inferior del intervalo de trabajo (25  $\mu\text{g/mL}$ ). Los resultados de este

estudio son similares a los de Cavazos-Rodríguez (2011) que reportó límites de detección y cuantificación de 3.8 y 9.9 µg/mL, respectivamente.

Por otra parte, el sistema demostró ser preciso con un porcentaje de desviación estándar relativo menor al 10 % (Xavier-Junior, 2017). Lo que indica que el sistema fue preciso tanto en el mismo día como en días no consecutivos. En relación con el método, se determinó su exactitud y precisión mediante la técnica de adición estándar. Para esto, las NC-CRV fueron adicionadas con CRV a una concentración conocida. La exactitud del método se determinó empleando cinco niveles de concentración (25, 50, 100, 200 y 400 µg/mL), mientras que la precisión del método se determinó a tres niveles de concentración (25, 100 y 400 µg/mL).

El método demostró ser exacto con porcentajes de recuperación de 92.82 % y un % DER para repetibilidad y reproducibilidad de 10.69. El % DER obtenido está dentro de los parámetros de aceptación establecidos por Sousa y cols., en la validación del método analítico de aceite de copaiba (Sousa *et al.*, 2011).

### **Determinación de la capacidad antioxidante del carvacrol**

En los últimos años, se ha incrementado el interés en las propiedades biológicas presentes en los compuestos naturales como el CRV, el cual se ha reportado como un agente antioxidante. En un estudio realizado por Alaoui y colaboradores se evaluó la capacidad para neutralizar radicales de los AE obtenidos de siete especies de *Thymus*, mostrando que los aceites que contenían CRV como su componente principal, presentaban las actividades antioxidantes más altas.

La determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos naturales puede realizarse mediante pruebas *in vitro* fundamentadas en el uso de radicales como DPPH y ABTS<sup>+</sup>. En el presente estudio se evaluó la capacidad del CRV para eliminar los radicales anteriormente mencionados.

Los resultados mostraron la capacidad del CRV-STD para eliminar al radical DPPH estable de color púrpura en DPPH-H de color amarillo, alcanzando el 50 % de inhibición con valores de  $IC_{50}=183.79 \pm 3.74 \mu\text{g/mL}$  (Figura 13). Este resultado es similar al reportado por Stoilova y colaboradores que refieren una  $IC_{50}=185 \mu\text{g/mL}$ .

Por otra parte, la capacidad del CRV-STD de reducir en un 50 % la coloración verde/azul del radical ABTS, se obtuvo con valores de  $IC_{50}=4.76 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$  (Figura 13). Este valor es similar a la  $IC_{50}=6.61 \mu\text{g/mL}$  obtenida por Sharopov y colaboradores.

Estos resultados muestran la capacidad antioxidante del CRV, la cual se atribuye a que en su estructura presenta un grupo *o*-hidroxilo que reduce la energía de disociación del enlace O-H incrementando la capacidad de donación de átomos de hidrógeno, los cuales reaccionan con los RL activos como DPPH y  $ABTS^+$ , generando una molécula reducida y un radical fenoxilo (Oroian & Escriche, 2015). Además, Hussein y col. (2017) refieren que los grupos alquilo (como en el CRV), aumentan la densidad electrónica de los radicales fenoxilo, lo que conduce a una mejora de la actividad antioxidante.

En la Figura 14 se muestran los porcentajes de inhibición de NC-CRV y NC-SBR (CRV no nanoencapsulado, pero presente en el sobrenadante de la formulación), por los ensayos de DPPH y  $ABTS^+$ . Respecto a la eliminación del radical  $ABTS^+$ , la NC-CRV mostró un  $92.16 \pm 0.56 \%$  de inhibición, mientras que NC-SBR presentó un  $87.17 \pm 1.02 \%$ . En cuanto a la capacidad de eliminar al radical DPPH, la NC-CRV exhibió un  $38.51 \pm 2.20 \%$  de inhibición, en tanto que el NC-SBR presentó un  $39.09 \pm 1.97 \%$ . La similitud entre los porcentajes de inhibición de NC-CRV y NC-SBR, tanto en la técnica de  $ABTS^+$  como en la de DPPH, plantea la posibilidad de que la actividad antioxidante correspondía mayormente al CRV fuera de las NC, pero presente en el sobrenadante. Lo anterior podría atribuirse a que, en el caso de las NC-CRV, la matriz polimérica de las NC evita la pérdida del CRV por difusión asegurando así su disponibilidad a tiempo prolongado. En el caso del NC-SBR estaría disponible para inhibir al radical DPPH y  $ABTS^+$  de forma rápida, teniendo así un sistema con actividad antioxidante bifásica ideal para una aplicación tópica. Cabe mencionar que ni el polímero, ni el surfactante, presentes en la formulación de NP, mostraron actividad antioxidante en ninguno de los ensayos realizados.

En el caso de NC-PST (CRV encapsulado extraído de las NC-CRV), la capacidad antioxidante a una concentración de 164 µg/mL fue de  $54.46 \pm 2.67$  %, similar a aquella obtenida del CRV-STD a la misma concentración ( $48.28 \pm 1.18$  %). Este dato pone en evidencia que el CRV incorporado en las NC conserva su actividad antioxidante después del proceso de nanoprecipitación. De esta forma, las NC-CRV mantendrían la actividad antioxidante del CRV tras su residencia en el EC.

### **Valoración del efecto dermoprotector del carvacrol nanoencapsulado en un modelo de piel porcina por técnicas de bioingeniería y *tape stripping***

La piel constituye una barrera muy selectiva al paso de sustancias químicas, una función que depende del EC. Debido a esto, la aplicación de compuestos activos destinados a actuar sobre la piel requiere de sistemas que favorezcan su permanencia en las capas superiores. Las NP son sistemas de liberación que permiten transportar y entregar un principio activo en el tejido diana.

En este trabajo, se utilizó un modelo *ex vivo* de piel porcina en celdas de difusión de Franz para evaluar la permanencia del CRV en el EC (capa más superficial de la piel), después de estar en contacto con la formulación de NC-CRV. De igual forma, después de la aplicación de las NC-CRV y las NP-BCO durante 1, 2 y 4 h, se evaluaron sus efectos sobre la función barrera cutánea midiendo la TEWL, el pH y el contenido de agua del EC.

#### *Parámetros biofísicos de la piel de cerdo con técnicas de bioingeniería*

La valoración de la piel mediante técnicas de bioingeniería *no invasivas* permite monitorear las propiedades fisiológicas de la misma para valorar los cambios y las respuestas ante la aplicación de compuestos activos en la piel. En este trabajo se evaluaron diferentes parámetros como la TEWL, el pH y el contenido de agua tras la exposición de una suspensión de NC-CRV y NP-BCO durante 1, 2 y 4 h.

Para evaluar el efecto de la aplicación de compuestos activos a través de la piel, se han utilizado numerosos modelos *in vitro* e *in vivo*, entre ellos la piel humana. Sin embargo, por razones éticas su empleo es limitado, por lo que se han sugerido una amplia gama de modelos animales (e. g. primates, porcinos, ratones, ratas, conejos y serpientes)

como sustitutos de la piel humana (Avoon & Wood, 2005). El Comité Científico de Productos Cosméticos y Productos No Alimentarios (SCCNFP, por sus siglas en inglés) de la Unión Europea ha validado el uso de la piel de oreja de cerdo como modelo *in vitro* para los estudios de absorción percutánea, dado que muestra similitud con la piel humana en distintas características morfofisiológicas como en la organización vascular, la composición de la película lipídica, el espesor de la epidermis y el EC, y la estructura de los folículos pilosos, entre otros (Jacobi *et al.*, 2007; Huong *et al.*, 2009).

En una primera etapa, se establecieron los valores basales de TEWL, pH y contenido de agua de la piel de cerdo utilizada en este estudio. En particular, la TEWL se utiliza para analizar la homeostasis de la barrera cutánea e, indirectamente, para predecir la influencia de compuestos aplicados en la piel. Este parámetro representa el transporte pasivo del agua que difunde, desde los tejidos subyacentes altamente hidratados, a través del EC hacia la superficie de la piel en forma de vapor (Marmolejo & Delgado, 2013; Fluhr & Darlenski *et al.*, 2014). En la piel humana, un valor de TEWL bajo ( $5 \text{ g/m}^2\text{h}$ ) es generalmente un rasgo característico de una función cutánea intacta (Marcano y Gonzalez, 2006). El valor basal de TEWL determinado en este estudio fue de  $19.10 \pm 2.31 \text{ g/m}^2\text{h}$  (Tabla 5). El cual es ligeramente más alto que lo reportado por Engelke y colaboradores (2018), quienes indicaron valores de TEWL en piel de cerdo entre 4 y  $15 \text{ g/m}^2\text{h}$ . Sin embargo, Silva-Flores (2019), reportó valores de  $24.80 \pm 1.80 \text{ g/m}^2\text{h}$  en verano y de  $30.07 \pm 2.20 \text{ g/m}^2\text{h}$ , en invierno. Todas estas variaciones podrían ser atribuidas a factores que afectan la medición de la TEWL, tales como raza del cerdo, edad, sexo, sitio anatómico evaluado, estación en la que se realiza la valoración y factores ambientales como temperatura y humedad relativa, entre otros (Mundlein *et al.*, 2008; Boer *et al.*, 2016).

El manto ácido es la película hidrolipídica que cubre la superficie de la piel y tiene un valor de pH aproximado de 5.5 (Darlenski *et al.*, 2009). Esta medida se obtiene de la disociación, dentro de una ligera capa acuosa sobre la piel, de algunos de los lípidos anfifílicos (i.e. ácido láctico, ácido urocánico, ácidos grasos libres de bajo peso molecular) y aminoácidos dicarboxílicos (i.e., ác. glutámico y ác. aspártico) que componen la capa hidrófoba (Orlandi, 2004). En este trabajo, el valor basal de pH determinado fue de 6.00

$\pm 0.55$  (Tabla 5), el cual coincide con el reportador por Liu *et al.* (2014), quienes determinaron un valor de pH entre 6-7 en piel porcina.

La hidratación subcutánea es otro parámetro indicador de las funciones epidérmicas. Este valor hace referencia al contenido de agua retenida entre las bicapas lipídicas de la piel y en el interior de los corneocitos (Benaiges, 2005). En piel humana, un valor del contenido de agua del EC mayor a 40 UA es característico de la piel hidratada (Lim *et al.*, 2018). El valor basal determinado para el contenido de agua en el EC en este trabajo fue de  $35.61 \pm 2.78$  UA (Tabla 5), el cual es similar a lo reportado por Kanikkannan y cols. (2001), con un valor de  $31.17 \pm 5.12$  UA y a lo establecido por Silva-Flores (2019) de  $36.82 \pm 1.48$  UA.

Respecto a la evaluación de los parámetros biofísicos después de la exposición de las NC-CRV y las NP-BCO durante 1, 2 y 4 h, en las Figuras 15, 16 y 17 se muestran los resultados del análisis estadístico de los valores de TEWL, pH y contenido de agua del EC, respectivamente.

En la Figura 15 se observa que no hubo una diferencia significativa de los valores de TEWL después de la exposición de las NP-BCO durante 1, 2 y 4 h, con respecto al valor basal. Lo que indica que las NP-BCO no perturban la función de la barrera cutánea. Por otro lado, las NC-CRV mostraron una diferencia significativa de los valores de TEWL después de la exposición durante 2 h con respecto al valor basal. Sin embargo, a las 4 h de exposición, la NC-CRV no mostró diferencia significativa de los valores de TEWL con respecto al valor basal. Por lo que se podría suponer que las NC-CRV modifican, momentáneamente, la pérdida de la función de barrera de la piel. Algunos estudios han establecido que los enlaces de hidrógeno entre los terpenos y las ceramidas, presentes en la matriz lipídica que rodea a los corneocitos, ocasionan una disminución entre las estrechas uniones de las capas de lípidos del EC (Herman & Herman, 2015). De esta forma, se podrían formar canales momentáneos que favorecerían el transporte de agua desde los tejidos subyacentes hacia el EC, aumentando la TEWL.

En la Figura 16, se observa que no hubo diferencia significativa en el valor de pH después de la exposición de las NC-CRV y las NP-BCO durante 1, 2 y 4 h, con respecto al valor basal. Lo que significa que ambas formulaciones conservan el pH de la piel de cerdo y no contribuyen a la alteración de la homeostasis de la piel. Esto también fue observado en un trabajo realizado por Silva-Flores (2019), quien estableció que no había cambios en los valores de pH de la piel de cerdo, después del tratamiento con NC cargadas con AE de *Rosmarinus officinalis* y *Lavandula dentata*. Diversas investigaciones han reportado que las alteraciones en el pH tienen un efecto en la integridad, la cohesión y la descamación del EC (Mohd & Hasham, 2020). Asimismo, es importante considerar que el pH también se encuentra involucrado en la defensa antimicrobiana. El crecimiento normal de la microflora de la piel, la cual consta de especies transitorias, residentes temporales y residentes permanentes, incluidos los estafilococos coagulasa negativos, es óptimo a niveles de pH ácido, mientras que las bacterias patógenas, como *S. aureus*, prosperan a niveles de pH neutros (Ali & Yosipovitch, 2013). Así, al mantener el pH sin alteraciones, se descarta que las NC-CRV pudieran tener un efecto negativo sobre el microambiente que permite conservar el componente antimicrobiano de la piel.

En la Figura 17 se observa que, cuando las NC-CRV y las NP-BCO son aplicadas sobre la superficie de la piel durante 1, 2 y 4 h, el contenido de agua del EC presenta un aumento estadísticamente significativo con respecto al valor basal. Esto puede atribuirse a un mecanismo presente en el EC denominado Factor Humectante Natural (FHN). Este factor se compone de elementos de bajo peso molecular y de gran poder osmótico como los aminoácidos, el ácido carboxílico de pirrolidona, urea, azúcares e iones, que por sus características higroscópicas pudieron ser capaces de atraer moléculas de agua (Marcano & González, 2006), presentes en la suspensión acuosa de NP-BCO y NC-CRV contribuyendo a la hidratación de la piel. El nivel de hidratación en la piel es de gran importancia ya que cumple con diversas funciones entre las que se destaca, el mantenimiento de la elasticidad, la flexibilidad, la regulación de las enzimas hidrolíticas, así como proporcionar a la piel una apariencia agradable al tacto y a la vista (Marmolejo & Delgado, 2013).

### *Técnica de tape stripping*

La técnica de *tape stripping* es un procedimiento mínimamente invasivo para la extracción y muestreo de capas microscópicas de EC. Este procedimiento permite cuantificar la profundidad de penetración de un compuesto activo en la piel. En este trabajo, la técnica de *tape stripping* se optimizó aplicando 5 cintas adhesivas en 5 orejas diferentes. La profundidad acumulada del EC a la que se llegó después del arranque de 5 cintas fue de  $5.44 \pm 0.52 \mu\text{m}$  (Figura 18). Esto permitió establecer la cantidad de EC removido por cinta.

Para determinar el espesor del EC de la piel de oreja de cerdo, se evaluó la TEWL después de la remoción sucesiva del EC. En la Figura 19 se observan los valores de TEWL en función de la profundidad del EC. El espesor obtenido fue de  $12.18 \pm 0.52 \mu\text{m}$ . Este valor es similar al reportado por Sekkat quien indicó un espesor del EC de la piel de oreja de cerdo de  $11.8 \pm 4 \mu\text{m}$ . El valor de TEWL inicial fue de  $23.30 \pm 2.33 \text{ g/m}^2\text{h}$ , mientras que el valor final fue de  $67.83 \pm 1.25 \text{ g/m}^2\text{h}$ . Este incremento en los valores de TEWL se debe a una alteración de la barrera cutánea provocado por una remoción significativa del EC (Russell *et al.*, 2008).

En la Figura 20 se muestra la cantidad de CRV en el EC después de 4 h de contacto de las NC-CRV con la piel. Cabe mencionar que a 1 y 2 h de contacto de las NC-CRV con la piel, no fue posible cuantificar el CRV en las cintas por el método analítico desarrollado ya que se encontraba por debajo de los límites de cuantificación. En la Figura 20 se puede observar que después de 4 h de contacto de las NC-CRV con la piel de cerdo, se depositaron  $42.66 \pm 0.02 \mu\text{g}$  de CRV/cm<sup>2</sup> a una profundidad aproximada de 6  $\mu\text{m}$ . Esta deposición del CRV está relacionada con las características fisicoquímicas de las NC, ya que, debido a su tamaño nanométrico, las NC se depositarían en las rugosidades de la piel por efecto mecánico. Además, debido a su estructura polimérica, la NC protegerían al CRV de la evaporación asegurando así su actividad antioxidante.

En su conjunto estos resultados muestran que la formulación de NC-CRV no solo mantiene la integridad de la piel, sino que favorece algunos parámetros fisiológicos como la hidratación. Adicionalmente, la deposición de un agente antioxidante (CRV) en diferentes capas del EC puede contribuir a la protección de la piel del daño causado por RL que se generan por la radiación UV. Lo anterior, se debe en gran medida a que la nanoencapsulación del CRV en las NP permitió obtener una formulación estable y viable que favoreció su deposición en la piel, además, de mantener íntegra su actividad antioxidante. Así, se puede concluir que la formulación de NC-CRV presenta las características y propiedades adecuadas para utilizarse como agente dermoprotector.

## 11. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se obtuvo una formulación de NC-CRV con características fisicoquímicas adecuadas para su aplicación dérmica. Un tamaño de  $157.4 \pm 1.4$  nm, que permite su deposición en el EC de la piel. Un IP de  $0.109 \pm 0.024$  que favorece que las interacciones individuales de las NC ocurran de manera homogénea en el sitio de acción y una densidad de carga superficial de  $-8.88 \pm 0.846$  mV que contribuye en la estabilidad de las NC y en la interacción con la piel. La estabilidad de las NC fue de al menos 120 días de almacenamiento a 25 °C. Además, se determinó un % E de CRV de  $13.19 \pm 0.85$  y se demostró que mantenía su actividad antioxidante después de su extracción de las NC-CRV.

Por otra parte, se desarrolló y validó un método analítico por CG-FID para la cuantificación del CRV en las NC que cumplió con los criterios de linealidad, exactitud y precisión lo que aseguró la obtención de resultados confiables.

Con respecto a la evaluación de los parámetros biofísicos después de la aplicación de las NC-CRV, durante 1, 2 y 4 h de exposición sobre la superficie de la piel de cerdo, se observó que la NC-CRV no modifican la barrera cutánea ya que la TEWL y el pH no presentaron cambios significativos. Además, estas NC podrían favorecer la hidratación del EC al incrementar los valores del contenido de agua.

En general, lo anterior se debió a que la nanoencapsulación del CRV en las NP permitió obtener una formulación estable y viable que favoreció su deposición en la piel, además, de mantener íntegra su actividad antioxidante. Así, se puede concluir que la formulación de NC-CRV presentó las características y propiedades adecuadas para utilizarse como agente dermoprotector.

## 12. PERSPECTIVAS

- Mejorar el % E y el % EE mediante la modificación de diferentes parámetros en la formulación.
- Evaluar la actividad antioxidante del CRV en las NC posterior a los ensayos de permeación para determinar por cuanto tiempo se mantiene la capacidad de eliminación de radicales. Asimismo, realizar otros ensayos de capacidad antioxidante (e.g. lipoperoxidación).
- Determinar la cantidad de sebo en la piel de cerdo mediante espectroscopia infrarroja.
- Determinar la cantidad de melanina después de la aplicación de la formulación mediante la sonda mexameter para ampliar la evaluación de los efectos de las NC-CRV sobre la integridad de la barrera cutánea.
- Evaluar los cambios morfológicos que pudieran ocurrir en el EC debido a la presencia de las NC mediante la realización de cortes histológicos de la piel de cerdo y microscopía óptica.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Akdeniz M, Hahnel E, Ulrich C, Blume-Peytavi U & Kottner J. (2019). Prevalence and associated factors of skin cancer in aged nursing home residents: A multicenter prevalence study. *Plos One*, 14(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215379>
- Alagawany M, El-Hack MEA, Farag MR, Tiwari R, Dhama K. 2015. Biological effects and modes of action of carvacrol in animal and poultry production and health - A Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2):73–84.
- Alaoui C, El Bouzidi L, Jamali C, Bekkouche K, Hassani L, Wohlmuth H, Abbad A. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 450–456. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.063>
- Alfaro-Sánchez A, García-Hidalgo L, Casados-Vergara R, Rodríguez-Cabral R, Piña-Osuna AK, Sánchez-Ramos A. 2016. Cáncer de piel. Epidemiología y variedades histológicas, estudio de cinco años en el noreste de México. *Dermatología Revista Mexicana*, 60(2):106–113.
- Alfaro A, Castrejón L, Rodríguez-Ortiz M. 2010. Cáncer de piel. Estudio epidemiológico a 10 años en derechohabientes del ISSSTE en Nuevo León. *Dermatología Revista Mexicana*, 54(6):321–325.
- Ali S, & Yosipovitch. (2013). Skin pH: From basic science to basic skin care. *Acta Dermato-Venereologica*, 93(3), 261–267. <https://doi.org/10.2340/00015555-1531>
- Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH & Fessi H. (2004). Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 99(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.06.015>
- Álvarez-Román R, Silva-Flores P, Galindo-Rodríguez S, Huerta-Heredia A, Vilegas W, & Paniagua-Vega D. (2020). Moisturizing and antioxidant evaluation of *Moringa oleifera* leaf extract in topical formulations by biophysical techniques. *South African Journal of Botany*, 129, 404–411.
- Amiri H. (2012). Essential oils composition and antioxidant properties of three *Thymus* species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

<https://doi.org/10.1155/2012/728065>

- Aristatile B, Al-Numair KS, Al-Assaf AH, Veeramani C, Viswanathan KP. 2015. Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripheral lymphocytes. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*, 29(11):497–507.
- Armendáriz-Barragán B, Galindo-Rodríguez S & Álvarez-Román R. (2016). Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro- y nanoparticulados. In M. A. Oranday-Cárdenas, M. J. Verde-Star, & C. Rivas-Morales (Eds.), *Investigación en plantas de importancia médica* (pp. 411–436). <https://doi.org/10.3926/oms.338>
- Asbahani A. El, Miladi K, Addi EHA, Bitar A, Casabianca H, Mousadik A. El, Elaissari A. (2015). Antimicrobial Activity of Nano-Encapsulated Essential Oils: Comparison to Non-Encapsulated Essential Oils. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 4(1), 39–48. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2015.1118>.
- Avon, S., & Wood, R. (2005). Porcine skin as an in-vivo model for ageing of human bite marks. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology*, 23(2), 30–39.
- Bakry AM, Abbas S, Ali B, Majeed H, Abouelwafa MY, Mousa A, Liang L. 2016. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1):143–182.
- Ben A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, & Chalier P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149–154. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>
- Benaiges A. (2005). Hidratación corporal. Principales activos cosméticos. *Dermofarmacia*, 24(9).
- Benchabane O, Hazzit M, Baaliouamer A, Mouhouche F. 2015. Analysis and antioxidant activity of the essential oils of *Ferula vesceritensis* coss. et Dur. and *Thymus munbyanus* Desf. *Journal Essential Oil-Bearing Plants*, 15(5):774–781.
- Bielfeldt S, Blaak J, Laing S, Schleißinger M, Theiss C, Wilhelm K & Staib P. (2019). Deposition of plant lipids after single application of a lip care product determined by confocal raman spectroscopy, corneometry and transepidermal water-loss. *International Journal of Cosmetic Science*, 41(3), 281–291.

<https://doi.org/10.1111/ics.12533>.

- Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F & Bergonzi MC (2014). Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for Successful Therapeutic Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, <https://doi.org/10.1155/2014/651593>
- Bilia AR, Piazzini V, Risaliti L, Vanti G, Casamonti M, Wang M & Bergonzi MC (2018). Nanocarriers: A Successful Tool to Increase Solubility, Stability and Optimise Bioefficacy of Natural Constituents. *Current Medicinal Chemistry*, 26(24), 4631–4656. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181101110050>
- Boer M, Duchnik E, Maleszka R & Marchlewicz M. (2016). Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 33(1), 1–5. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48037>
- Bordes C, Fréville V, Ruffin E, Marote P, Gauvrit J, Briançon S & Lantéri P. (2010). Determination of poly( $\epsilon$ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. *International Journal of Pharmaceutics*, 383, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.09.023>
- Carbajo-Espejo JM. 2017. Evaluación de los cambios en la piel tras la aplicación de cosméticos elaborados a partir del sedimento de las aguas minero-medicinales Lanjarón-Capuchina mediante métodos de bioingeniería cutánea (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid.
- Carranza-Ramírez L. (2006). Técnicas analíticas en tiempo real para monitorear reacciones de fotopolimerización. Centro de Investigación en Química Aplicada.
- Cavazos-Rodríguez M. 2011. Encapsulación de moléculas antioxidantes en nanopartículas poliméricas para su aplicación dermatológica (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Cercós R y Rodríguez M. 2013. Análisis capilar. Ediciones Paraninfo: España, pp. 110-112.
- Chapilliquén ML y Alvis RAH. 2006. Aplicación de métodos de bioingeniería cutánea en la evaluación de la eficacia de una formulación dermocosmética elaborada a base del aceite de *Amaranthus Caudatus* L. “Kiwicha.” (Tesis de Maestría). Universidad

Nacional Mayor de San Marcos.

- Charles AI, Amalraj A, Gopi S, Varma K, Anjana SN. 2017. Novel cosmeceuticals from plants - An industry guided review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1–26.
- Da Rosa CG, de Oliveira Brisola Maciel MV, de Carvalho SM, de Melo APZ, Jummes B, da Silva T, Barreto PLM. (2015). Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 481, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.05.019>
- Dal’Belo SE, Rigo Gaspar L & Berardo Goncalves PM. (2006). Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. *Skin Research and Technology*, (12), 241–246. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68617-2\\_88](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68617-2_88)
- Darlenski R, Sassning S, Tsankov N & Fluhr J. (2009). Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.11.013>
- Diyanat M, Saeidian H, Baziar S & Mirjafary Z. (2019). Preparation and characterization of polycaprolactone nanocapsules containing pretilachlor as a herbicide nanocarrier. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(21), 21579–21588. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05257-0>
- Döge N. 2018. Evaluation of *ex vivo* human skin as model for the investigation of nanoparticle-based drug delivery systems for anti-inflammatory topical dermatotherapy (Tesis Doctoral). Freie Universität Berlin.
- Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S & Dumas P. (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273(2), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.001>
- Engelke L, Winter G & Engert J. (2018). Application of water-soluble polyvinyl alcohol-based film patches on laser microporated skin facilitates intradermal macromolecule and nanoparticle delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 128, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.04.008>

- 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(8), 746–753. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.918669>
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55:R1-R4.
- Flur J & Darlenski R. (2014). Transepidermal water loss. In *Non Invasive Diagnostic Techniques in Clinical Dermatology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-32109-2>
- Fox LT, Gerber M, Du Plessis J, Hamman JH. 2011. Transdermal drug delivery enhancement by compounds of natural origin. *Molecules*, 16:10507–10540.
- Fraj A, Jaâfar F, Marti M, Coderch L & Ladhari N. (2019). A comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. *Industrial Crops and Products*, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111669>
- Galindo-Rodriguez S, Allémann E, Fessi H & Doelker E. (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428–1439. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036917.75634>
- Gavaric N, Mozina S, Kladar N & Bozin B. (2015). Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of thyme and oregano essential oils, thymol and carvacrol and their possible synergism. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 18(4), 1013–1021. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.971069>
- Gavaric N, Mozina SS, Kladar N, Bozin B. 2015. Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of thyme and oregano essential oils, thymol and carvacrol and their possible synergism. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 18(4):1013–1021.
- Geerligs M. 2009. Skin layer mechanics (Tesis Doctoral). Universiteitsdrukkerij TU Eindhoven.
- Gies P, Roy C, Javorniczky J, Henderson S, Lemus-Deschamps L & Driscoll C. (2004). Global solar UV index: Australian measurements, forecasts and comparison with the UK. *Photochemistry and Photobiology*, 79(1), 32. <https://doi.org/10.1562/0031->

8655(2004)79<32:gsuiam>2.0.co;2

- Global Cancer Observatory. 2018. Casos de cáncer. Disponible en: <https://gco.iarc.fr>.
- Goik U, Goik T & Załęska I. (2019). The properties and application of argan oil in cosmetology. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(4). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800313>
- Guimarães A, Oliveira M, Don Santos R, Dos Passos P, Russo M, Antunes A, Quintans L. (2015). Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with  $\beta$ -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-Biological Interactions*, 227, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.020>
- Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. 2007. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2:147–157.
- Hauser M. (2012). Penetration and occlusion properties of paraffin oil and vegetable oils - A comparison of cosmetic oils. *Cosma*, 13(1–2), 26–28.
- Heinrich K, Heinrich U & Tronnier H. (2014). Influence of different cosmetic formulations on the human skin barrier. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27(3), 141–147. <https://doi.org/10.1159/000354919>
- Hellemans L, Corstjens H, Neven A, Declercq L, & Maes D. (2003). Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(3), 434–439. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12056.x>
- Herman A & Herman A. (2015). Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: A Review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(4), 473–485. <https://doi.org/10.1111/jphp.12334>
- Hermund DB. (2018). Antioxidant properties of seaweed-derived substances. In bioactive seaweeds for food applications. Elsevier Inc: Denmark, pp. 201-221.
- Honary S & Zahir F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 255–264. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>
- Huong S, Bun H, Fourneron, J., Reynier, J., & Andrieu, V. (2009). Use of various models for in vitro percutaneous absorption studies of ultraviolet filters. *Skin Research and*

- Technology*, 15(3), 253–261. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2009.00368.x>
- Hussein J, El-Banna M, Mahmoud KF, Morsy S, Abdel Latif Y, Medhat D, El-Daly, S. M. (2017). The therapeutic effect of nano-encapsulated and nano-emulsion forms of carvacrol on experimental liver fibrosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 90, 880–887. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.020>
- International Agency for Research on Cancer. 2018. Cáncer de piel en Australia. Disponible en: <https://www.iarc.fr>
- International Conference on Harmonisation. 2005. Validation of analytical procedures: Text and Methodology, ICH-Q2 (R1): Geneva.
- Instituto Nacional de Cancerología. 2019. Estadísticas cáncer de piel, [Online]. Disponible en: <https://www.infocancer.org.mx/?c=investigacion&a=cancer-cifras>
- Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, Lademann J. (2007). Porcine ear skin: An in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology*, 13(1), 19–24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2006.00179.x>
- Kanikkannan N, Patel R, Jackson T, Shaik M & Singh M. (2001). Percutaneous absorption and skin irritation of JP-8 (jet fuel). *Toxicology*, 161, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00402-9](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00402-9)
- Kanitakis J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, 12(4), 390–401.
- Keawchaon L & Yoksan R. (2011). Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.031>
- Khan A, Travers J & Kemp, M. (2018). Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59(5), 438–460. <https://doi.org/10.1002/em.22176>
- Khan Y, Durrani S, Siddique M & Mehmood M. (2011). Hydrothermal synthesis of alpha Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles capped by Tween-80. *Materials Letters*, 65(14), 2224–2227. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.04.068>
- Khoobdel M, Ahsaei SM & Farzaneh M. (2017). Insecticidal activity of polycaprolactone nanocapsules loaded with Rosmarinus officinalis essential oil in *Tribolium castaneum* (Herbst). *Entomological Research*, 47(3), 175–184.

- <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12212>
- Kumar A. (2019). Nanoparticles in medicine. Springer: India, pp. 209-210  
<https://doi.org/10.12775/jehs.2020.10.08.002>
- Lavanderos JF, Perez JAP, Jeria SN, Concha DC. 2010. Actualizaciones en melanoma maligno cutáneo. *Cuadernos de cirugía*, 24:47–56.
- Lim S, Shin J, Cho Y & Kim K. (2019). Dietary patterns associated with sebum content, skin hydration and pH, and their sex-dependent differences in healthy Korean adults. *Nutrients*, 11(619). <https://doi.org/10.3390/nu11030619>
- Lin T, Zhong L & Santiago J. (2018). Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19010070>
- Liu J, Kim D, Brown L, Madsen T & Bouchard G. (2014). Comparison of human, porcine and rodent wound healing with new miniature swine. *Sinclair Research*. Retrieved from [http://pilot.sinclairresearch.com/assets/25\\_Wound-Healing-AALAS-2009.pdf](http://pilot.sinclairresearch.com/assets/25_Wound-Healing-AALAS-2009.pdf)
- López-Razo N. (2013). *Guía para la validación del método “Determinación de proteínas en alimentos para animales.”* Universidad Nacional Autónoma de México.
- Marcano M & González F. (2006). Barrera Cutánea. *Dermatología Venezolana*, 44(2).
- Marro D, Kalia Y, Charro M & Guy R. (2001). *Delivery: Identification and distribution of the charge-carrying species*. 18(12).
- Marmolejo-Hidalgo MF, Delgado-Hernández T. 2013. Estandarización de una metodología para evaluación del efecto hidratante de una matriz cosmética. Universidad ICESI.
- Mesa-Téllez C. (2019). *Aplicaciones de la espectroscopía infrarroja en el análisis de alimentos*. Universidad de Sevilla.
- Mir M, Ahmed N, Permana AD, Rodgers AM, Donnelly RF & Rehman AU (2019). Enhancement in site-specific delivery of carvacrol against methicillin resistant *staphylococcus aureus* induced skin infections using enzyme responsive nanoparticles: A proof of concept study. *Pharmaceutics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110606>
- Mishra A, Mishra A, & Chattopadhyay P. (2011). Herbal cosmeceuticals for photoprotection from ultraviolet B radiation: A Review. *Tropical Journal of*

- Pharmaceutical Research*, 10(3), 351–360. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i3.7>
- Mohd AN & Hasham R. (2020). Assessment of non-invasive techniques and herbal-based products on dermatological physiology and intercellular lipid properties. *Heliyon*, 6(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03955>
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 2010;385(1–2):113–42.
- Morales-Guevara. 2017. *Desarrollo y validación de una técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0*. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas
- Mundlein M, Valentin B, Chabicovsky R, Nicolies J, Weremczuk J, Tarapata G & Jachowicz R. (2008). Transepidermal water loss (TEWL) measurements with two novel sensors based on different sensing principles. *Sensors and Actuators a Physical*, 142(1). <https://doi.org/10.1016/j.sna.2007.04.012>
- Orlandi, MC. 2004. Piel sana y manto ácido. *Dermatología cosmética*, 15 (2): 121-124.
- Oroian M & Escriche I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>
- Pande SY y Misri R. 2005. Sebumeter. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 71(6):444–446.
- Panich U, Sittithumcharee G, Rathviboon N & Jirawatnotai S. (2016). Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2016/7370642>
- Pereira T, Guerreiro C, Maruno M, Ferrari M & Rocha-Filho P. (2016). Exotic vegetable oils for cosmetic O/W nanoemulsions: In vivo evaluation. *Molecules*, 21(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules21030248>
- Poljšak B & Dahmane R. (2012). Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatology Research and Practice*. <https://doi.org/10.1155/2012/135206>
- Preedy VR. 2016. *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Elsevier: Londres, pp. 3-36.

- Ramirez-Pérez. 2019. Efecto conservador de eugenol nanoencapsulado en la vida de anaquel de jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rawlings A & Harding C. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy*, 17, 43–48. <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04s1005.x>
- Russell L, Wiedersberg S & Begoña Delgado-Charro M. (2008). The determination of stratum corneum thickness An alternative approach. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(3), 861–870. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.02.002>
- Samaras EG. 2012. Effect of formulation factors on the skin penetration of drugs. (Tesis Doctoral). Universities of Kent and Greenwich.
- Sample A & He Y. (2018). Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 34(1), 13–24. <https://doi.org/10.1111/phpp.12329>
- Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. 2003. Characterization and physical-chemical stability of polymer nanoparticulate systems for drug administration. *Química Nova*, 26(5):726–737.
- Secretaria de Salud. 2011. Criterios para la Validacion de Metodos Fisicoquimicos , [Online]. Disponible: <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/cvfvq032011.pdf>
- Sekkat N, Kalia Y & Guy R. (2002). Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(11), 2376–2381. <https://doi.org/10.1002/jps.10220>
- Shakeri F, Shakeri S & Hojjatoleslami M. (2014). Preparation and characterization of carvacrol loaded polyhydroxybutyrate nanoparticles by nanoprecipitation and dialysis methods. *Journal of Food Science*, 79(4). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12406>
- Sharopov F, Wink M & Setzer W. (2015). Radical scavenging and antioxidant activities of essential oil components - An experimental and computational investigation. *Natural Product Communications*, 10(1), 153–156. <https://doi.org/10.1177/1934578x1501000135>

- Silva Flores PG, Galindo Rodríguez SA, Pérez López LA, Álvarez Román R. (2017). Aceites esenciales libres y encapsulados como potenciales antioxidantes en piel. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(2), 7–15.
- Silva-Florez. 2019. Desarrollo y evaluación dermatocinética de nanopartículas con aceites esenciales para su aplicación en piel. (Tesis de Doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Skin cancer foundation. 2020. Cáncer de piel y color de piel. Disponible en: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/skin-cancer-skin-of-color/>
- Slevin T y Whiteman D. 2018. Australia skin cancer. The conversation, [Online]. Disponible en: <https://theconversation.com/why-does-australia-have-so-much-skin-cancer-hint-its-not-because-of-an-ozone-hole-91850>
- Sousa J, Brancalion A, Souza A, Turatti I, Ambrósio S, Furtado N, Bastos J. (2011). Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in Copaiba oils. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(4), 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.10.006>
- Stoilova I, Stefanie B, Buchbauer G, Stoyanova A, Schmidt E & Jirovetz L. (2008). Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of an essential oil of *Thymus vulgaris* L. from Germany. *Natural Product Communications*, 3(7), 1–4.
- Svobodová A, Psotová J & Walterová D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A Review. *Biomedical Papers*, 147(2), 137–145. <https://doi.org/10.5507/bp.2003.019>
- Torralvo-Martínez J. (2017). *Validación de un método químico analítico de HPLC en R*. Fundación Universitaria Los Libertadores.
- Velázquez-Dávila. 2017. Evaluaciones dermatocinéticas y antimicóticas de productos naturales incorporados en nanocápsulas biodegradables. (Tesis de Doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Wu L, Zhang J & Watanabe W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 456–469. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.001>
- Xavier-Junior F, Maciuk A, Rochelle Do Vale Morais A, Alencar E, Garcia V, Tabosa Do

- Egito E & Vauthier C. (2017). Development of a gas chromatography method for the analysis of *Copaiba Oil*. *Journal of Chromatographic Science*, 55(10), 969–978.  
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx065>
- Ye Q & Deng C. (2009). Determination of camphor and borneol in Flos Chrysanthemi Indici by UAE and GC-FID. *Journal of Chromatographic Science*, 47(4), 287–290.  
<https://doi.org/10.1093/chromsci/47.4.287>
- Zorzi G, Carvalho E, Von Poser G & Teixeira H. (2015). On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25(4), 426–436.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.015>
- Zuang V, Rona C, Distanto F & Berardesca E. (1997). The use of a capacitance device to evaluate the hydration of human skin. *Journal of Applied Cosmetology*, 15(3), 95–102.