

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ENCAPSULACIÓN DE MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS  
PARA SU APLICACIÓN DERMATOLÓGICA**

Por

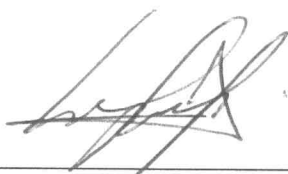
**Q.C.B. MARTHA REBECA CAVAZOS RODRÍGUEZ**

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

Enero 2011

# ENCAPSULACIÓN DE MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA SU APLICACIÓN DERMATOLÓGICA

Aprobación de Tesis:



---

DRA. ROCÍO ÁLVAREZ ROMÁN

Director de Tesis



---

DR. SERGIO ARTURO GALINDO RODRÍGUEZ


Co- Director de Tesis



---

DRA. ROCÍO CASTRO RÍOS

Comisión de Tesis



---

DR.MED. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

# ENCAPSULACIÓN DE MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA SU APLICACIÓN DERMATOLÓGICA

Presentado por:

**Q.C.B. MARTHA REBECA CAVAZOS RODRÍGUEZ**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la asesoría de la Dra. Rocío Álvarez Román y en el Departamento de Química en el Laboratorio de Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la co-asesoría del Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez.

FIRMAS

DIRECTOR



---

Dra. Rocío Álvarez Román

CO-DIRECTOR



---

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

## RESUMEN

QCB Martha Rebeca Cavazos Rodríguez

Fecha de presentación: Enero 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del estudio: **ENCAPSULACIÓN DE MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES EN NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS PARA SU APLICACIÓN DERMATOLÓGICA**

Número de páginas: 83

Candidato a obtener el título de Maestro en Ciencias con  
Especialidad en Química Biomédica

Área de estudio: Química Analítica

**Propósito y Método de Estudio:** El cáncer de piel es una de las enfermedades que ha irrumpido con mayor ímpetu en el panorama epidemiológico del país desde finales del siglo XX convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial. Afortunadamente, este tipo de cáncer es altamente prevenible y tratable. Una alternativa es la utilización de moléculas antioxidantes como agentes preventivos del daño celular. Además, entre los esfuerzos para combatir esta problemática se encuentra el desarrollo de nuevos sistemas de liberación particulados, entre los que destacan las nanopartículas poliméricas (NPs), las cuales han recibido considerable atención como coloide reservorio de principios activos, principalmente por brindarle protección y liberación prolongada. En base a lo anterior, la aplicación de un agente antioxidante (carvacrol) encapsulado en NPs, ofrece una posibilidad innovadora en la prevención del cáncer de piel.

Este trabajo consta de tres etapas: i) obtención, optimización y caracterización de NPs cargadas con carvacrol, ii) desarrollo y validación de dos métodos de cromatografía de gases (CG): por inyección directa y con microextracción en fase sólida por *headspace* (SPME-HS) y iii) ensayos biológicos en la piel de cerdo. En la primera etapa, las NPs cargadas con carvacrol fueron obtenidas por la técnica de nanoprecipitación y caracterizadas por su tamaño, potencial  $\zeta$ , índice de polidispersidad, morfología, estabilidad y porcentaje y eficiencia de encapsulación. En la segunda etapa, se evaluó el comportamiento de los procedimientos cromatográficos por su linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación. Finalmente, las NPs cargadas con carvacrol se aplicaron en estudios *in vitro* de permeación transdérmica y en la técnica de *tape stripping*.

**Conclusiones y Contribuciones:** La técnica de nanoprecipitación permite obtener una formulación de NPs cargadas con carvacrol estables para su uso en la prevención del cancer de piel. Los métodos cromatográficos desarrollados permitieron obtener una respuesta lineal, precisa y exacta del carvacrol en NP y en las muestras biológicas. Cabe mencionar que, por primera vez la CG-SPME fue aplica en el análisis de moléculas volátiles encapsuladas en NPs.

Director de Tesis



---

Dra. Rocío Álvarez Román

## ÍNDICE

<b>Capítulo</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
I	INTRODUCCIÓN	1
I.1	La Piel	1
I.1.1.	Estructura de la piel	1
I.1.2.	Funciones de la piel	4
I.1.3.	Cáncer de Piel	4
I.2	Formulación de agentes antioxidantes	6
I.2.1.	Micropartículas	7
I.2.2.	Liposomas	8
I.2.3.	Dendrímeros	8
I.2.4.	Nanopartículas poliméricas	9
I.3	Posible mecanismo de la penetración de las nanopartículas poliméricas en piel	12
I.4	Cuantificación de moléculas activas encapsuladas en nanopartículas poliméricas	14
I.5	Justificación	15
I.6	Objetivo General	16
I.7	Objetivos Específicos	16
II	MATERIAL Y MÉTODOS	17
II.1	Material, Equipos y Reactivos	17
II.2	Obtención y caracterización de las nanopartículas poliméricas	19
II.3	Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con detector de ionización de flama	21

II.4	Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por <i>headspace</i>	22
II.5	Validación de los métodos cromatográficos	24
II.6	Ensayos biológicos con la piel de cerdo	29
II.7	Preparación y caracterización de una emulsión con carvacrol libre	31
III	RESULTADOS	33
III.1	Obtención y caracterización de las nanopartículas poliméricas (NPs)	33
III.2	Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID)	35
III.3	Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por <i>headspace</i>	38
III.4	Ensayos biológicos con la piel de cerdo	39
III.5	Preparación y caracterización de una emulsión con carvacrol libre	41
IV	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
IV.1	Obtención, optimización y caracterización de las nanopartículas poliméricas (NPs)	42
IV.2	Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID)	44
IV.3	Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por <i>headspace</i>	45
IV.4	Ensayos biológicos con la piel de cerdo	46
V	CONCLUSIONES	48
VI	PERSPECTIVAS	49
VII	BIBLIOGRAFÍA	50
VIII	ANEXOS	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Tabla I.1	Antioxidantes y su presentación cosmética en el mercado.	6
Tabla I.2	Ventajas de las nanopartículas poliméricas frente a otras formas farmacéuticas innovadoras.	10
Tabla I.3	Antioxidantes encapsulados en nanopartículas poliméricas.	11
Tabla 1.4	Analitos encapsulados en nanopartículas poliméricas y su técnica de cuantificación.	14
Tabla II.1	Optimización de las condiciones cromatográficas.	21
Tabla II.2	Rango de concentraciones de carvacrol y mentol utilizadas en la curva de calibración por inyección directa.	22
Tabla II.3	Condiciones utilizadas en la HS-SPME.	23
Tabla II.4	Rango de carvacrol y mentol utilizado en la curva de calibración por HS-SPME.	24
Tabla II.5	Muestras analizadas por los métodos analíticos de cromatografía de gases.	24
Tabla II.6	Criterios de aceptación para evaluar la precisión de un método analítico.	26
Tabla II.7	Curva con adición de estándar para determinar exactitud en CG por inyección directa.	26
Tabla II.8	Curva con adición de estándar para el método de HS-SPME.	27
Tabla II.9.	Muestras analizadas como controles experimentales.	31
Tabla III.1	Cantidad de polímero utilizada y tamaño de NPs obtenido.	31
Tabla III.2	Cantidad de carvacrol utilizado y el tamaño de NPs obtenido.	31
Tabla III.3	Porcentaje de encapsulación y porcentaje de eficiencia de encapsulación.	34
Tabla III.4	Condiciones cromatográficas finales para el análisis.	35
Tabla III.5	Parámetros de validación del método de cromatografía de gases por inyección directa.	38
Tabla III.6.	Parámetros de validación del método de cromatografía de gases por HS-SPME.	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura I.1	Esquema de la piel con sus principales componentes.	1
Figura I.2	Esquema de los estratos de la epidermis.	2
Figura I.3	Esquema del modelo “cemento-ladrillo” de corneocitos y lípidos.	3
Figura I.4	Estructura química del carvacrol.	7
Figura I.5	Principales tipos de sistemas de liberación controlada.	7
Figura I.6	Esquema de A) una nanocápsula y B) una nanoesfera.	9
Figura I.7	Vías de permeación: intercelular e intracelular	13
Figura II.1.	Procedimiento base de la técnica de nanoprecipitación y purificación de las nanopartículas poliméricas	19
Figura II.2	Esquema de los experimentos de HS-SPME.	23
Figura II.3	Esquema de una celda de Franz modificada verticalmente.	30
Figura III.1	Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas poliméricas cargadas con carvacrol.	32
Figura III.2	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el tamaño de las nanopartículas poliméricas.	34
Figura III.3	Cromatograma de una solución control de carvacrol (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en solución metanólica con el programa de temperatura inicial.	34
Figura III.4	Cromatograma de una solución control de carvacrol (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en solución metanólica con el programa de temperatura optimizado.	35
Figura III.5	Cromatograma de una solución control de mentol (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en solución metanólica con el programa de temperatura optimizado.	36
Figura III.6	Cromatograma de una solución control de mentol (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y carvacrol (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con el programa de temperatura optimizado.	37
Figura III.7	Curva de calibración del método de cromatografía de gases por inyección directa.	37
Figura III.8	Efecto del tiempo de extracción del carvacrol sobre la señal obtenida por HS-SPME.	38

Figura III.9	Curva de calibración del método de cromatografía de gases por HS-SPME.	39
Figura III.10	Curva de la profundidad de estrato córneo acumulada en función del número de tape desprendido, (n= 5).	40
Figura III.11	Cantidad de carvacrol en función de la profundidad acumulada del estrato córneo.	40
Figura III.12	Cantidad de carvacrol en función de la profundidad normalizada del estrato córneo.	41
Figura III.13	a) Imagen de la emulsión de carvacrol durante los primeros 10 días posteriores a su formulación; b) Imagen de la emulsión de carvacrol al día 11 de su formulación; c) Imagen de la emulsión de carvacrol después del día 12 de formulado.	41

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
A	Estructuras químicas y generalidades de los materiales utilizados	55
	A.1    Carvacrol	55
	A.2    Mentol	56
	A.3    Poli ε-caprolactona	57
	A.4    Tween 80	58
B	Curvas de calibración	59
	B.1    Cromatografía de gases con Inyección directa	59
	B.2    Cromatografía de gases con HS-SPME	59
C	Validación de los métodos analíticos	60
	C.1    Cromatografía de gases con Inyección directa	61
	C.2    Cromatografía de gases con HS-SPME	65
D	Porcentaje de recuperación del carvacrol en diferentes matrices	69
	D.1    Porcentaje de recuperación del carvacrol adicionado en una solución de polímero	69
	D.2    Porcentaje de recuperación del carvacrol adicionado en el sobrenadante de NPs blanco	71
	D.3    Porcentaje de recuperación del carvacrol en NPs	72
	D.4    Porcentajes de recuperación del carvacrol libre en las cintas adhesivas con estrato córneo	73
	D.5    Porcentajes de recuperación del carvacrol en NPs en las cintas adhesivas con estrato córneo	74
E	Ensayos previos de permeación transdérmica	75
F	Resultados obtenidos en los estudios <i>in vitro</i> de permeación transdérmica	77
G	Cuantificación del carvacrol no unido a nanopartículas poliméricas	82

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje
%R	Porcentaje de recuperación
(p/v)	Peso/volumen
®	Marca Registrada
°C	Grados Centígrados
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALG	Alginato
Cant.	Cantidad
CG	Cromatografía de Gases
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
CS	Quitosán
d. i.	Diámetro Interno
DE	Desviación estándar de los valores
DER	Desviación Estándar Relativa
EC	Estrato Córneo
EGCG	Epigallocatequina-3-O-indol-3-carbinol
FID	Detector de Ionización de Flama
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HS	<i>Headspace</i>
ICH	Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano
ID	Inyección Directa
IP	Índice de Polidispersidad
LDC	Límite de Cuantificación
LDD	Límite de Detección
m	Masa
m <sup>2</sup>	Metros cuadrados
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mV	Milivolts
nm	Nanómetros
NPs	Nanopartículas Poliméricas
OMC	Octil Metoxicinamato
PCL	Poli caprolactona, Poli ε-caprolactona

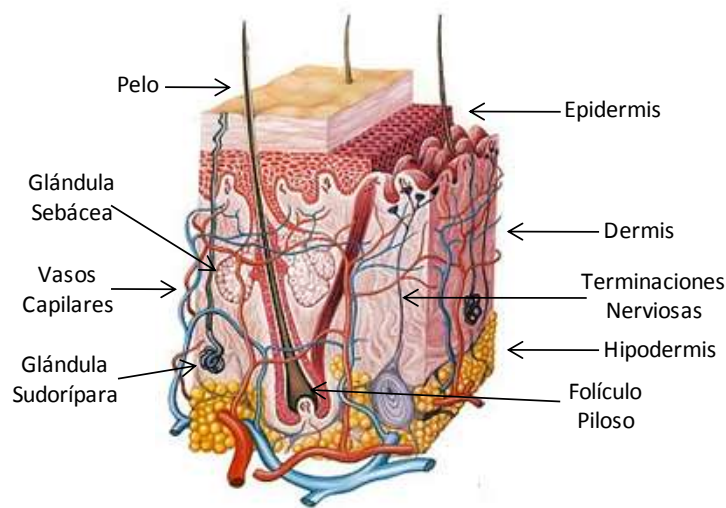
PEG	Polietilen glicol
pH	Potencial de Hidrógeno
PLA	Ácido Poliláctico
PM	Peso Molecular
PTFE	Politetrafluoretileno
Q	Cantidad de fármaco por unidad de área
$R^2$	Coefficiente de correlación
RHNM	Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas
rpm	Revoluciones por minuto
SAFS	Solución Amortiguadora de Fosfatos-Salina
SPME	Microextracción en Fase Sólida
$s_{y/x}$	Desviación estándar del blanco
$t_R$	Tiempo de Retención
UV	Ultravioleta
UV-A	Ultravioleta-A
UV-B	Ultravioleta-B
UV-C	Ultravioleta-C
$\zeta$	Zeta
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{m}$	Micrómetros
$n$	Número de experimentos
$\rho$	Densidad
$\sigma$	Desviación Estándar
$R$	Coefficiente de correlación múltiple
$S$	Desviación estándar de los valores
$S_B$	Desviación estándar del blanco
$\bar{X}$	Media de los valores
$Y_B$	Intercepto de la recta en el eje de las Y
$y_i$	Valores de y en la recta
$\hat{y}_i$	Valores de y ajustados
$v$	Volumen

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

#### I.1 La Piel

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano y animal, ocupa aproximadamente 2 m<sup>2</sup> de superficie, su espesor varía de entre los 0.5 mm (en los párpados) hasta los 4 mm (en palmas de las manos y plantas de los pies) y representa alrededor del 16% del peso corporal. La complejidad única de la piel radica en su elevada organización: 6 cm<sup>2</sup> de piel contienen aproximadamente 500 glándulas sudoríparas, más de 1,000 terminaciones nerviosas, casi 100 glándulas sebáceas, 150 sensores de presión, 75 de calor y 10 de frío, metros de diminutos vasos sanguíneos y millones de células (Thibodeau, Patton, & Karen, 2007). En la figura I.1 se muestra un esquema de la piel con sus componentes principales.

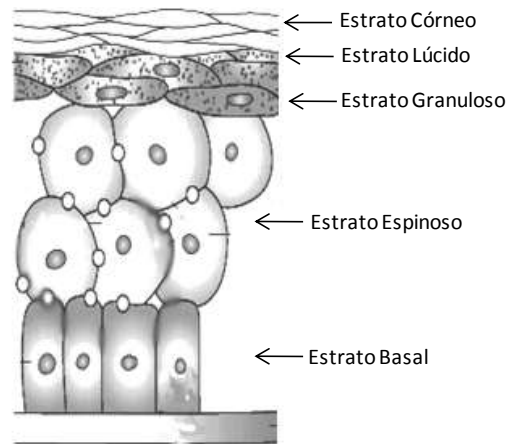


**Figura I.1 Esquema de la piel con sus principales componentes.**

##### I.1.1. Estructura de la piel

La piel o membrana cutánea es un órgano laminar compuesto de tres capas (Figura I.1), con características específicas cada una de ellas, que enumeradas del interior al exterior son:

- a) La *hipodermis*, es la capa más profunda y está formada por tejido conjuntivo unido en forma laxa a la dermis. De acuerdo al grado de nutrición de la persona, puede existir una capa suplementaria de células adiposas en personas sobrealimentadas. La zona superficial de la hipodermis contiene parte de los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas.
- b) La *dermis*, es el tejido conjuntivo donde se apoya la epidermis y sirve como punto de unión entre el tejido celular subcutáneo y la epidermis. Es de superficie irregular a lo largo de su localización, observándose protuberancias llamadas papilas dérmicas. La dermis está constituida por dos capas de células, sin límites precisos, la más superficial se llama capa papilar y la más profunda, capa reticular. Ambas poseen fibras elásticas que le otorgan esa propiedad de flexibilidad a la piel. La gran mayoría de las fibras de la piel son de colágeno, que es responsable de la resistencia de la misma. Los elementos celulares que predominan en la dermis son los fibroblastos y los macrófagos. Es la capa más externa del cuerpo que se encuentra vascularizada.
- c) La *epidermis*, que es un epitelio plano estratificado queratinizado está constituido por cinco estratos (Figura 1.2) con diferente grado de maduración de las células que los conforman:



**Figura 1.2. Esquema de los estratos de la epidermis.**

1. Estrato germinativo ó basal, consta de una sola capa de células cilíndricas o cúbicas. Contienen todos los organelos y presenta una elevada mitosis, lo que da origen a nuevas células que son desplazadas hacia la capa superior.

2. Estrato espinoso o de células espinosas, está formado por varias capas de células poliédricas irregulares, ligeramente separadas unas de otras que hacia la superficie las células se aplanan progresivamente. La superficie de las células está cubierta de proyecciones para formar “puentes intercelulares” y todavía presentan los organelos en su totalidad. Además en esta capa están esparcidos los melanocitos, las células de Langerhans (presentadoras de antígenos) y de Merkel (células mecanoreceptoras). También se observa una frecuencia alta de mitosis.
3. Estrato granuloso, el cual está formado por entre tres y cinco capas de células aplanadas. Presentan núcleos vesiculares que carecen de nucleolos lo que indica una disminución en la actividad celular. Es en esta capa que mueren las células de la epidermis.
4. Estrato lúcido, es una capa clara y traslúcida de tres a cinco células de profundidad. Las células no se distinguen con claridad como entidades independientes. Se aplanan y agrupan en forma compacta. Los núcleos son imprecisos o pueden faltar, y el citoplasma carece de mitocondrias, retículo endoplásmico, ribosomas y complejos de Golgi.
5. Estrato córneo, representa la quinta capa y la más externa, formada por células claras, muertas y semejantes a escamas que se aplanan y se fusionan de manera progresiva. El núcleo falta y el citoplasma es sustituido por queratina. La capa más superficial del estrato córneo sufre una descamación constante. Tiene una estructura de “cemento-ladrillos” análoga a la de una pared (Figura 1.3). Los corneocitos, forman los ladrillos, que están embebidos en una mezcla lipídica compleja de ceramidas, ácidos grasos, colesterol y ésteres de colesterol que representan el cemento del modelo propuesto (Leeson, Leeson, & Paparo, 1990).

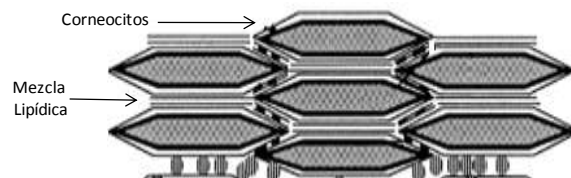


Figura 1.3. Esquema del modelo “cemento-ladrillo” de corneocitos y lípidos.

### I.1.2. Funciones

La piel desempeña tres funciones importantes que contribuyen a la supervivencia del individuo:

- a) De protección. La piel se considera como “primera línea de defensa” contra una multitud de peligros. Las células llenas de queratina nos protegen contra la invasión diaria de microorganismos perjudiciales. Impide también la entrada de sustancias químicas nocivas y proporcionan protección frente a desgarres y cortes; evita además la pérdida excesiva de líquidos. La melanina de la capa pigmentaria que no deja pasar los rayos ultravioleta de la luz solar hacia el interior del cuerpo.
- b) De regulación de la temperatura. La temperatura se encuentra regulada en la piel por la acción de las glándulas sudoríparas y el flujo sanguíneo cerca de la superficie corporal. La transpiración conduce a una pérdida de calor favoreciendo así la termorregulación. Además, el aumento de la cantidad de sangre en los vasos próximos a la piel origina pérdida de calor por radiación.
- c) De actividad sensorial. La piel actúa como un enorme órgano sensorial. Sus millones de terminaciones nerviosas son como antenas o receptores, que reciben información sobre los cambios del medio ambiente. Estos receptores permiten detectar sensaciones de tacto ligero y presión, dolor, calor y frío (Thibodeau, Patton, & Karen, 2007).

### I.1.3. Cáncer de Piel

El cáncer de piel, también conocido como neoplasias en piel, es una degeneración de las células de la piel a un estado maligno provocada por exposición a arsénico, consumo de medicamentos inmunosupresores y principalmente por exposición a la radiación ultravioleta proveniente, en su mayoría del sol. Sin duda, es una de las enfermedades que ha irrumpido con mayor ímpetu en el panorama epidemiológico del país desde finales del siglo XX convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo (individuales y ambientales) con los que se asocia (RHNM, 2001).

En el 2005, un reporte de Martínez Saíd presentó un incremento en el número de casos de cáncer de piel a nivel mundial de hasta 400% (Martínez, 2005). En México, se ha observado un aumento del 500% (Gutierrez, 2003).

De forma específica, el cáncer de piel se ha visto aumentado en un 3.7 % anual en la mayoría de los países. Reportes publicados por *The Skin Cancer Foundation* indican que aproximadamente 65,161 personas mueren al año a causa del sol a nivel mundial.

Según reportes de las estadísticas del Registro de las Neoplasias Malignas en México, se estima que a la fecha, el cáncer de piel ocupa el segundo lugar de frecuencia en nuestro país, observándose más afectados a varones que a mujeres debido a las actividades laborales desempeñadas, los varones, por lo general desarrollan roles que se encuentran con mayor frecuencia en el exterior (Martínez, 2005).

Por su localización geográfica, la República Mexicana recibe dosis elevadas de radiación ultravioleta durante la mayor parte del año (Castañedo-Cázares, Torres-Álvarez, & al, 2008). Molina y colaboradores realizaron un estudio de la capa de ozono, reportando evidencias que demuestran la erosión de la capa de ozono (Molina, 1995). Al adelgazarse o al perder su continuidad, esta capa protectora permite el paso de mayor cantidad de radiación UV hacia la Tierra, dañando a la población en general (Baadsgaard, 1991). Hasta la fecha, la radiación UV-C (200 a 290 nm) es bloqueada en su totalidad por la capa de ozono por lo tanto no causa ningún daño aparente a la población. Una parte de la radiación UV-B (290 a 320 nm) también es bloqueada pero la cantidad de esta radiación que puede pasar a través de la capa de ozono es suficiente para generar daños en la salud como lo son las neoplasias cutáneas además de mutaciones, fotoenvejecimiento cutáneo, inmunosupresión y cataratas oculares. Por el contrario, el paso de la radiación UV-A (320 a 380 nm) es libre a través de la capa de ozono el cual contribuye a la inmunosupresión y fotoenvejecimiento cutáneo (Castañedo-Cázares, Torres-Álvarez, & al, 2008).

Los rayos ultravioleta naturales, procedentes de la luz solar, o artificiales, provenientes de camas de bronceado, producen radicales libres que son moléculas altamente reactivas o especies químicas que contienen electrones no apareados que causan el estrés oxidativo generando daños

en lípidos, proteínas, enzimas, carbohidratos, mutaciones en el ADN y otros daños celulares se acumulan durante años (Venkat Ratnam, Ankola, Bhardwaj, & al, 2006).

Afortunadamente, el cáncer de piel es altamente prevenible y tratable (Stryker & Solky, 2005). En los últimos años, los antioxidantes, que son sustancias que actúan en contra de los radicales libres previniendo así el daño que causan, han ganado una gran importancia debido a su gran potencial como agentes profilácticos y terapéuticos en diversas enfermedades entre las que destaca el cáncer de piel.

## I.2. Formulación de agentes antioxidantes

Actualmente no existen muchos antioxidantes inscritos en las farmacopeas, sin embargo, una amplia investigación realizada a nivel mundial sobre estos agentes han demostrado una importante actividad biológica.

En el mercado existen, productos cosméticos que contienen diferentes agentes con actividad antioxidantes (tabla I.1).

**Tabla I.1. Antioxidantes y su presentación cosmética en el mercado.**

<b>Antioxidante</b>	<b>Presentación</b>	<b>Producto</b>
Enzimas	Inyectables	GeroVital (Rumania)
Ácido ascórbico	Tabletas	iHerb (Estados Unidos de América)
Coenzima Q <sub>10</sub>	Cápsulas	Pronat Ultra (México)
Licopeno	Cápsulas	Tianshi (España)

Por otra parte, las hierbas medicinales con propiedades antioxidantes han sido utilizadas para diversos fines. Los componentes activos principalmente encontrados en los aceites esenciales de estas fuentes naturales se extraen, purifican y prueban para determinar su actividad terapéutica (Venkat Ratnam, Ankola, Bhardwaj, & al, 2006). Los aceites esenciales han sido ampliamente utilizados en la industria alimentaria, en perfumería y en cosmética. Químicamente, están formados por monoterpenos, sesquiterpenos, y compuestos aromáticos (Lock, 1994).

Varios estudios sobre la actividad antioxidante de aceites esenciales han reportado que el carvacrol presenta un considerable efecto antioxidante y antiséptico (Montoya, J., & al, 2007). El carvacrol (Figura I.4), también llamado 5-isopril-2-metilfenol, es el componente principal de aceites esenciales del orégano (*Origanum vulgare*), en un 60 ó 70% y del tomillo (*Thymus vulgaris*) en un 45 ó 50% (Ultee, M., & Moezelaar, 2002).

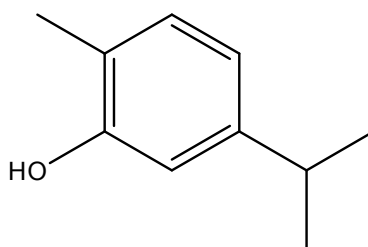


Figura I.4. Estructura química del carvacrol.

Recientemente, una de las propuestas tecnológicas más prometedoras para formular moléculas antioxidantes son los sistemas de liberación particulado entre los que encontramos las micropartículas, los liposomas y las nanopartículas poliméricas (Figura I.4). Estos sistemas particulados podrían modificar la liberación del agente antioxidante y favorecer así su efecto terapéutico.

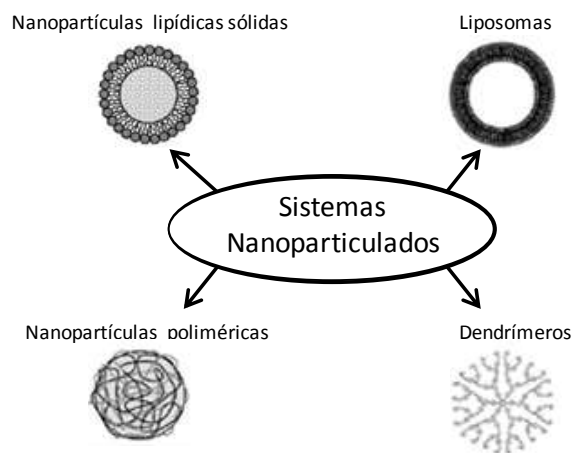


Figura I.5. Principales tipos de sistemas de liberación controlada.

### I.2.1. Micropartículas

Las micropartículas poliméricas esféricas presentan un tamaño que oscila entre 1 a 250  $\mu\text{m}$ . Dentro de este grupo se incluyen las microcápsulas que son sistemas vesiculares en los que el fármaco está confinado en una cavidad rodeada de una única membrana polimérica; y las

microesferas que son sistemas matriciales en los que el fármaco está disperso en la partícula. Las micropartículas ya han sido utilizadas para encapsular moléculas antioxidantes. Esposito y cols. (2002) probaron encapsular vitamina C en micropartículas de Eudragit® para su aplicación oral con el fin de disminuir su velocidad de liberación. Encontraron que la liberación de la vitamina C no se reducía considerablemente. Asimismo, mostraron que las partículas tenían un tamaño y morfología adecuados para ser utilizadas como terapia de apoyo en pacientes con cáncer colorectal (Esposito & al, 2002).

Sin embargo, este tipo de partículas presentan la desventaja de ser eliminadas por el organismo a través de la vía de desecho no específico del sistema retículoendotelial. (Sáez & al, 2004).

### I.2.2. Liposomas

Los liposomas son vesículas preparadas a partir de diferentes tipos de lípidos. Estos sistemas han sido ampliamente utilizados como posibles portadores de fármacos debido a la protección que pueden ofrecer a los activos que se encuentran en su núcleo. Stone y Smith (2004) encapsularon diversas moléculas antioxidantes en liposomas y determinaron que los liposomas antioxidantes son una gran promesa para el tratamiento de un sinnúmero de enfermedades en las cuales el estrés oxidativo juega un papel importante (Stone & Smith, 2004). Más recientemente, Fang y colaboradores (2006) evaluaron la acumulación de polifenoles en células de tumor basocelular (compuestos con alta actividad antioxidante). Los polifenoles, provenientes del té verde, libres y encapsulados en liposomas se pusieron en contacto con las células de tumor basocelular y se determinó una mayor acumulación de los polifenoles a partir de los liposomas que los que se encontraban de manera libre (Fang, Lee, & al, 2006). Sin embargo, los liposomas han mostrado baja eficiencia de encapsulación, baja estabilidad durante el almacenamiento, y rápida liberación de fármacos solubles en medios biológicos (Llabot & al, 2008).

### I.2.3. Dendrímeros

Un dendrímero es una macromolécula tridimensional de construcción arborescente. Los dendrímeros tienen la propiedad de formar complejos huésped-anfitrión, donde la macromolécula dendrímica es capaz de actuar como un sistema anfitrión que puede dar cabida a diferentes moléculas en número y tamaño. En el 2002, Jesus y colaboradores propusieron la encapsulación

de un anticancerígeno (doxorubicina) en dendrímeros para pruebas *in vivo* e *in vitro*. Este sistema mostró una baja citotoxicidad en los estudios realizados *in vitro*, mientras que la distribución de los dendrímeros *in vivo* mostró una mínima acumulación en órganos vitales como lo son el hígado y el corazón, además de que aumentó la vida media del fármaco en comparación de la forma libre (Bharali, Marianne, & Gurbuz, 2009).

#### I.2.4. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas (NPs) se definen como partículas con un tamaño en el rango de 1 a 1000 nm, al menos en una de las tres dimensiones. Las NPs son formadas por un material macromolecular (biodegradable o no) que pueden ser utilizadas como microreservorios del principio activo, el cual puede encontrarse disuelto, entrampado o encapsulado (Álvarez Román, 2000). A modo de ejemplo, los fármacos pueden ser encapsulados en la matriz polimérica (en el núcleo de las NPs), conjugados químicamente con el polímero, o adsorbidos en la superficie de la partícula.

El término NPs abarca tanto a las nanoesferas como a las nanocápsulas (Fig. I.5). La diferencia entre estas dos formas está ligada a su morfología y a su arquitectura. Las nanoesferas son de tipo matricial y en este caso los fármacos pueden ser absorbidos en la superficie de la esfera o encapsulada dentro de la partícula. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que la molécula activa se encuentra en la cavidad interior; el sistema consiste en un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica. En este caso, las sustancias activas suelen ser disueltas en el núcleo interno, pero también pueden ser adsorbidas a la superficie de la cápsula.

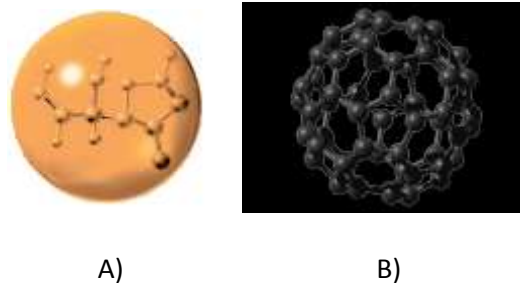


Figura I.6 Esquema de A) una nanocápsula y B) una nanoesfera.

Debido a esta escala de tamaño tan pequeña, las NPs poseen una inmensa superficie por unidad de volumen, lo que les otorga una gran proporción de átomos en la superficie (Nagarajan, 2008),

protegen al principio activo de la degradación, reducen la toxicidad o efectos secundarios que pudiera causar el mismo activo administrado en una forma convencional (Mohanraj V.J., et al., 2006) y poseen mayor estabilidad en fluidos biológicos (Álvarez Román, 2000).

Asimismo, las características fisicoquímicas de las NPs le brindan importantes ventajas frente a otros sistemas particulados:

- i) Tamaño nanométrico. Permite inducir endocitosis, atravesar membranas biológicas, ser transportado por todo el organismo en el sistema circulatorio (en caso de requerirse) y absorbidos por las células.
- ii) Carácter sólido. Protección del principio activo, de enzimas hidrolíticas y algunos otros factores, permitiendo la liberación del principio activo en sitios blanco.
- iii) Gran área superficial. Permite un contacto más íntimo con el sustrato biológico.
- iv) Composición polimérica variable. Permiten controlar el sistema de liberación prolongado del principio activo.

En la tabla I.2 se presentan las ventajas que presentan las nanopartículas poliméricas frente a otros sistemas particulados.

**Tabla I.2. Ventajas de las NPs frente a otras formas farmacéuticas innovadoras.**

<b>Forma farmacéutica</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Referencia</b>
Liposomas	Las NPs presentan una mayor estabilidad en medios acuosos.	Vila Jato, 2009
	Las NPs presentan una capacidad única para liberar al fármaco de manera controlada dependiendo del polímero o mezcla de polímeros utilizados.	Vila Jato, 2009
	Las NPs presentan una mayor capacidad de carga del principio activo sin importar sus características fisicoquímicas.	Bharali, 2009
Micropartículas	Gracias a su tamaño, las NPs difunden	Llabot & al, 2008

	sistémicamente mientras que las micropartículas permanecen en las Placas de Peyer.	
Nanopartículas Lipídicas Sólidas	La temperatura no es un factor determinante para cargar de principio activo a las nanopartículas lipídicas sólidas.	Villafuerte, 2008

El desarrollo de NPS se ha convertido en un área de investigación importante en el campo de la administración de moléculas activas, ya que tienen la capacidad de suministrar una amplia gama de compuestos para las diferentes vías de administración por períodos de tiempo sostenido (Llabot & al, 2008). De forma específica, la tabla I.3 muestra diferentes moléculas antioxidantes encapsuladas en nanopartículas.

**Tabla I.3. Antioxidantes encapsulados en nanopartículas poliméricas.**

Polímero	Antioxidante	Tamaño de NPs (nm)	Referencia
ALG-CS	Curcumina	90	Kumar, Ratul; <i>et al.</i> 2009
Gliadina	Vitamina E	120	Duclairoir, C; <i>et al.</i> 2003
PCL-PEG	Resveratrol	<100	Nair, H.B.; 2010
Quitosan	Eugenol	235	Nair, H.B.; 2010
PLA	Quercetina	50	Kumari, Avenesh; <i>et al.</i> 2010
PLA-PEG	EGCG	260	Nair, H.B.; 2010

ALG-CS, Alginato-quitosan, PLA, Ácido Poliláctico; PCL, Policaprolactona; PEG, Polietilen glicol; EGCG, Epigallocatequina-3-O-indol-3-carbinol.

En base a las ventajas y beneficios que las NPs ofrecen, en el área de dermatología, la aplicación de NPs en la superficie de la piel ha adquirido una gran relevancia. En una revisión de Nair y colaboradores (2010), reportan el desarrollo de NPs de ácido poli D,L-láctico para administrar triptólida para el tratamiento antiinflamatorio y eliminación de edema percutáneo (Nair, et al, 2010). Álvarez-Román y colaboradores (2004), desarrollaron NPs a base de poli  $\epsilon$ -caprolactona con el fin de administrar un agente protector solar altamente lipofílico, el octil metoxicinamato (OMC),

con el fin de aumentar su penetración y su permanencia en la piel (Álvarez-Román, *et al*, 2004). Además, Llabot y colaboradores (2008), reportan que las NPs son sistemas muy prometedores en la administración tópica del interferón- $\gamma$  para el tratamiento del herpes cutáneo (Llabot, & al, 2008).

Del mismo modo, diferentes estudios muestran que sistemas particulados innovadores pueden ser utilizados en la prevención del cáncer de piel provocado por una sobreexposición solar (Cardinal, 2007 y Ghouchi, 2009). Natsuki R. y colaboradores (1996) mostraron que la aplicación tópica de liposomas con *d*-tocoferol aumenta la penetración del *d*-tocoferol en la superficie de la piel humana y de cobayo, favoreciendo así su acción antioxidante (Natsuki, 1996). De igual forma, Pople PV. y colaboradores (2006) observaron que la encapsulación de la vitamina A en nanopartículas lipídicas sólidas, aumentaba dos veces la cantidad de la vitamina presente en la superficie de la piel de rata en comparación al gel control ofreciendo una mayor protección antioxidante tópica (Pople, 2006).

Por lo antes mencionado, la aplicación de un agente antioxidante encapsulado en NPs, ofrece la posibilidad de ser aplicado en la prevención del cáncer de piel.

### I.3 Posible mecanismo de la penetración de las NPs en piel

Es sabido que, la piel ofrece una alternativa a la administración de moléculas activas que sean susceptibles a la degradación en el tracto gastrointestinal, así como la posibilidad de evitar el metabolismo de los fármacos a nivel hepático y asegurar así su efecto terapéutico sistémico.

Para que una molécula activa, administrada sobre la superficie de la piel, lleve a cabo su acción terapéutica debe forzosamente absorberse a través de la superficie de la piel. La absorción percutánea o transdérmica es el proceso por el cual una molécula pasa a través del estrato córneo hasta llegar a su sitio de acción y/o a la circulación sistémica en un periodo de tiempo determinado. Además, esta molécula debe penetrar a una concentración adecuada para producir la respuesta terapéutica deseada.

Existen diferentes teorías relacionadas con los mecanismos de permeación que van a seguir los fármacos al atravesar el estrato córneo. Algunas investigaciones han demostrado que el transporte de los fármacos es preferentemente intercelular, es decir, el paso del fármaco a través de los lípidos extracelulares (Potts RO, 1991). Otros estudios mencionan que la vía intracelular (a través de los corneocitos y los espacios extracelulares) también participa en la absorción percutánea (Landmann L, 1988). En la Figura I.7 se muestran las diferentes vías de permeación transdérmica.

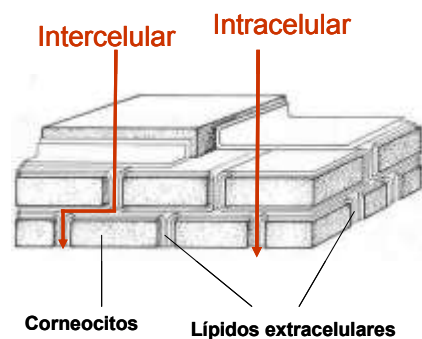


Figura I.7. Vías de permeación: intercelular e intracelular.

Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado que la absorción a través de los apéndices de la piel es más importante de lo que se creía. Los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas contribuyen de manera significativa en la absorción transdérmica de un principio activo (Álvarez-Román, R., 2000).

Investigaciones recientes (p.ej. Álvarez-Román, R., *et al*, 2004; Wu, X., *et al*, 2009) han demostrado que las NPs con diámetro alrededor de los 200 nm no penetran el estrato córneo, se acumulan principalmente en los folículos pilosos y en los pliegues más profundos de la piel, favoreciendo así, la liberación del fármaco en estos sitios.

#### I.4. Cuantificación de moléculas activas encapsuladas en nanopartículas poliméricas

Actualmente, son pocos los estudios que integran la obtención de las NPs y la cuantificación de la molécula encapsulada por técnicas analíticas. Las propiedades fisicoquímicas de la molécula encapsulada van a determinar la técnica analítica seleccionada para su cuantificación. En la tabla I.4 se presenta las técnicas de cromatografía comúnmente utilizadas para la cuantificación de la molécula activa encapsulada en las NPs.

Tabla I.4. Analitos encapsulados en NPs y su técnica de cuantificación.

<b>Molécula activa</b>	<b>Características fisicoquímicas</b>	<b>Técnica analítica</b>	<b>Referencia</b>
Clotrimazol	Hidrofóbico  PM= 344.84 g/mol	HPLC-UV	Velázquez, 2009
Paclitaxel	Hidofílico  PM= 853.92 g/mol	HPLC	Xie, 2004
Rifampicina	Hidrofóbico  PM= 822.96 g/mol	HPLC-UV	Calleja, 2004

PM, Peso molecular; HPLC-UV, Cromatografía de líquidos de alta resolución (por sus siglas en inglés) con detector ultravioleta-visible.

Entre los problemas más frecuentemente encontrados en la cuantificación de la molécula encapsulada en las NPs, están las interferencias analíticas del polímero y/o del agente tensoactivo que dificulta su cuantificación. Una de las propuestas analíticas para la extracción y posterior cuantificación de la molécula activa es el uso de cromatografía de gases con microextracción en fase sólida con *headspace* (*HS-SPME*, por sus siglas en inglés) (Pawliszyn, 1997). Esta técnica ha resultado ser una alternativa conveniente para la extracción de analitos volátiles y semivolátiles en una amplia gama de matrices, su principal ventaja es la capacidad de combinar extracción y preconcentración en un solo paso.

Rodríguez-Lafuente y colaboradores, 2009, determinaron las condiciones óptimas de la microextracción de analitos volátiles contenidos en muestras de tomates. Las respuestas cromatográficas obtenidas fueron buenas y eliminaron las interferencias causadas por la matriz (Rodríguez-Lafuente, 2009). Además, Jordán-Bueso (1999), extrajo los componentes volátiles de la fracción aromática del zumo de naranja, mostrando una elevada eficiencia al utilizar HS-SPME frente a otras técnicas de extracción (Jordán-Bueso, María José, 1999). Finalmente, Castellanos-Molina (2007), reporta que al emplear la técnica de HS-SPME para la determinación de los metabolitos del limoneno y  $\alpha$ -pineno se presentaron ventajas superiores en comparación con la extracción por solvente, como son: disminución del tiempo de análisis, mayor sensibilidad, ahorro en reactivos, entre otros (Castellanos-Molina, 2007).

Cabe mencionar que, una vez obtenido el método analítico por el cual se analizará el principio activo es necesario validarlo. La validación es el proceso mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas del método analítico cumplen con las especificaciones para su aplicación. (ICH, 1996) Es una herramienta con la que se cuenta para asegurar la calidad de los productos y procedimientos. Este proceso exige el tratamiento estadístico para el manejo y análisis de los datos permitiendo juicios con criterio que llevan a una correcta evaluación.

## I.5 Justificación

Debido al problema emergente de cáncer y la necesidad de atenderlo, es prioritario encontrar estrategias que nos permitan desarrollar nuevos productos con el fin de disminuir su incidencia en la población mexicana.

Teniendo como evidencia el gran potencial de las nanopartículas poliméricas (NPs) en el ámbito médico, farmacéutico y biológico, la encapsulación de un agente antioxidante brindaría una alternativa innovadora y eficiente para la prevención del cáncer de piel.

## I.6 Objetivo General

Obtener una formulación de nanopartículas poliméricas (NPs) cargadas con un agente antioxidante (carvacrol) para su caracterización dermatocinética utilizando estudios *in vitro* de permeación transdérmica

## I.7 Objetivos Específicos

1. Estandarizar la técnica de nanoprecipitación para la obtención de nanopartículas poliméricas (NPs) de 200 nm cargadas con carvacrol.
2. Determinar las características fisicoquímicas de las formulaciones de carvacrol encapsulado en nanopartículas.
3. Desarrollar y validar dos métodos analíticos por cromatografía de gases para la cuantificación del carvacrol tanto en nanopartículas poliméricas (NPs) como en evaluaciones biológicas.
4. Determinar el nivel de penetración del carvacrol en la piel mediante estudios de permeación transdérmica y la técnica de *tape stripping*.

## CAPÍTULO II

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### II.1 Material, Equipos y Reactivos

##### Material

- Agitadores magnéticos
- Celdas tipo Franz modificadas de forma vertical, 15 mL
- Cinta adhesiva (tape stripping), Scotch 845
- Columna, 100% Polidimetilsiloxano, 30m x 0.53 mm, recubrimiento 1.50  $\mu\text{m}$ , Grace
- Material de disección: bisturí y hojillas quirúrgicas, pinzas
- Material de vidrio: cristizador, vasos de precipitado, matraz bola
- Micro jeringa, 5  $\mu\text{L}$ , Hamilton
- Microcon, Microtubos para filtrar NPs, Millipore
- Microfibras, Poliacrilato 85  $\mu\text{m}$ , Supelco
- Pinzas para soporte y para termómetro
- Pipetas automáticas
- Portafibras, Supelco
- Termómetro, -10 a 250  $^{\circ}\text{C}$ , France
- Viales de vidrio de 2 y 15 mL con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón, Supelco

##### Equipos

- Balanza analítica, Shimadzu AX 200
- Baño de inmersión circulador, Thermo-circulator, LabTech
- Centrífuga refrigerada, Heraeus, modelo Biofuge Primo R. No. serie 40305996, 75005441
- Dispersador/homogenizador, VDI12, VWR

- pHmetro, Thermo electron corporation, Orion 3 Star
- Placa de agitación, IKA-Werke, RO-10; IKA-HS 260 basic
- Purificador de agua, Purelab UHQ
- Ultracentrífuga, Allegra™ 64R Centrifuge, Beckman Coulter
- Zetasizer Nanoseries, Nano-Zs90

#### Reactivos

- Acetona, grado HPLC, Burdick & Jackson
- Agua Bidestilada Plus, Laboratorio Monterrey
- Carvacrol, 97% (CG), Fluka Analytical
- Cineole, 99%, Aldrich
- Cloruro de sodio, Carlo Erba Reagents
- Fosfato monoácido de sodio ( $\text{HNa}_2\text{PO}_4$ ), Flucka Chemika
- Fosfato monopotásico ( $\text{H}_2\text{KPO}_4$ ), Acros Organics
- Metanol, grado HPLC, Tedia y Sigma – Aldrich
- Poli  $\epsilon$ -caprolactona, con peso molecular de 10000, Fluka.
- Tween 80, Sigma – Aldrich

#### Material Biológico

Las orejas de cerdo utilizadas se obtuvieron del mercado Campesino, ubicado en Venustiano Carranza 1800 norte, Monterrey, Nuevo León México y de Libramiento Cadereyta-Allende, Cadereyta Jiménez, Nuevo León, México.

## II.2 Obtención y caracterización de las NPs

Las nanopartículas (NPs) se obtuvieron de acuerdo a la técnica de nanoprecipitación propuesta por Fessi y colaboradores (Fessi & al, 1989). El procedimiento base, consiste en inyectar una fase orgánica que contiene el polímero (poli  $\epsilon$ -caprolactona) y la molécula de interés (carvacrol), en 20 mL de fase acuosa la cual contiene tween 80<sup>®</sup> al 3% (p/v), se mantiene a una agitación constante (250 rpm) a temperatura ambiente. La suspensión de NPs obtenida se somete a destilación a presión reducida (Rotavapor *Heidolph*) para la eliminación del solvente y la obtención de las NPs purificadas en un volumen final de 10 mL (Figura II.1).

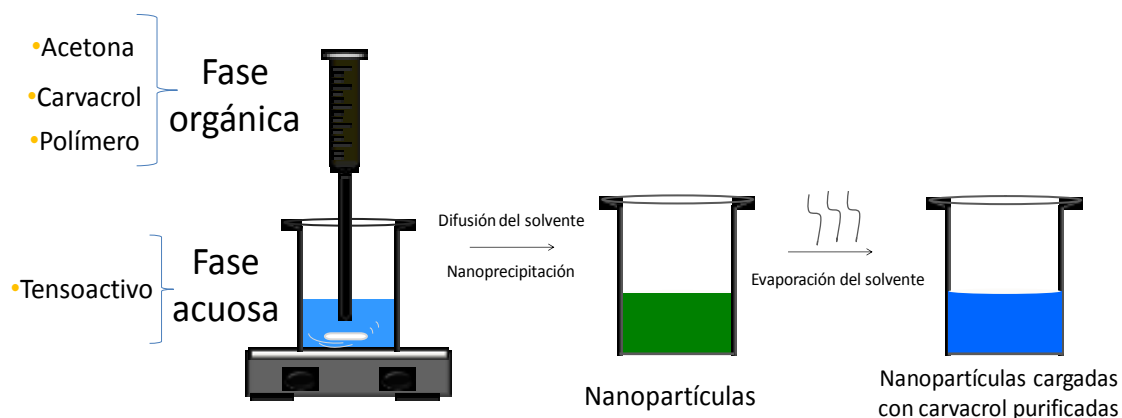


Figura II.1. Procedimiento base de la técnica de nanoprecipitación y purificación de las NPs.

Con el fin de optimizar la obtención de las NPs, se modificaron dos variables experimentales:

- Cantidad de polímero en la fase orgánica. Se obtuvieron NPs sin carvacrol (NPs blanco) con 10, 15, 20 y 25 mg de poli  $\epsilon$ -caprolactona. Los lotes de NPs blanco se realizaron por triplicado.
- Cantidad de carvacrol en la fase orgánica. Se obtuvieron NPs con 15 mg de poli  $\epsilon$ -caprolactona con 10, 13, 15, 17 y 20 mg de carvacrol. Los lotes de NPs cargadas con carvacrol se realizaron por triplicado.

Caracterización de las NPs

Tamaño, potencial  $\zeta$  e índice de polidispersidad de las NPs

El tamaño de las NPs, el potencial  $\zeta$  y el índice de polidispersidad (IP) se determinaron por espectroscopía de correlación fotónica (Zetasizer Nanoseries; Malvern, Nano-Zs90) a partir de una alícuota de las NPs purificadas en agua Milli-Q (Purelab UHQ).

## Morfología de las NPs

Las NPs obtenidas se observaron por microscopía electrónica de barrido (Jeol JSM-6490LV). Se realizó una suspensión de las NPs con agua Mili-Q, una gota de esta suspensión se colocó en soportes de cobre, se dejaron secar a temperatura ambiente en un desecador a vacío por 1 hora. Las muestras completamente secas se recubrieron con oro coloidal con una unidad de recubrimiento (Denton vacuum, Desk IV) por pulverización catódica a 10 pascales de vacío por 10 segundos.

## Estabilidad de las NPs

Para determinar la estabilidad de las formulaciones obtenidas, se midió el tamaño y el IP de las NPs cargadas con carvacrol por espectroscopía de correlación fotónica (Zetasizer Nanoseries; Malvern, Nano-Zs90) durante cinco meses. Los lotes formulados se mantuvieron almacenados a temperatura ambiente, en viales cerrados herméticamente, protegidos de la luz y en un ambiente con  $37 \pm 2$  % de humedad relativa.

## Porcentaje y eficiencia de encapsulación

La suspensión de NPs cargadas con carvacrol, se sometió a ultracentrifugación a 20,000 rpm durante 2 horas a 4°C para obtener la pastilla y el sobrenadante de las NPs. La pastilla se secó en horno durante 24 horas a 50 °C, se resuspendió en 1 mL de metanol, se realizó una dilución 1:20 con metanol y se analizó por inyección directa en cromatografía de gases con detector de ionización de flama. Al sobrenadante se le realizó una dilución 1:70 con agua Mili-Q y se cuantificó por cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por *headspace*.

El porcentaje de encapsulación y la eficiencia de encapsulación del carvacrol se determinaron utilizando las siguientes ecuaciones:

### ***Ecuación 1***

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{(\text{Cant. total de carvacrol}) - (\text{Cant. de carvacrol no unido})}{\text{Peso del polímero en fase orgánica}} \times 100$$

### ***Ecuación 2***

$$\% \text{ de Eficiencia de Encapsulación} = \frac{(\text{Cant. total de carvacrol}) - (\text{Cant. de carvacrol no unido})}{\text{Cant. total de Carvacrol}} \times 100$$

### II.3 Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con detector de ionización de flama

Para cuantificar el carvacrol en las NP y en las muestras biológicas se desarrolló y validó un método por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID, por sus siglas en inglés), por inyección directa. Se utilizó una columna Grace AT-1 (Polidimetilsiloxano, 0.53 mm d.i. x 30 m, 1.5 µm de espesor). La temperatura del inyector fue de 270°C, con un modo split de 1:20. La temperatura del detector FID fue de 250°C. El gas acarreador fue helio con un flujo de 2 mL/min.

Se inyectó 1 µL de una solución estándar de carvacrol en metanol a una concentración de 1000 µg/mL y se analizó con el programa propuesto por Rodríguez-Lafuente (Rodríguez-Lafuente & cols., 2009) con una temperatura inicial de 30°C durante 3 min, con una rampa de 10°C/min hasta 200°C.

Estas condiciones fueron optimizadas modificando el programa de temperatura inicial. En la tabla II.1 se muestran diferentes programas de temperatura probados.

Tabla II.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.

Programa de temperatura	Condiciones	Tiempo de análisis (minutos)
1	Temperatura inicial: 30°C Incremento de 10°C/min hasta llegar a 260°C	23
2	Temperatura inicial: 40°C, mantener por 3 minutos Incremento de 25°C/min hasta llegar a 140°C Incremento de 10°C/min hasta llegar a 240°C	17
3	Temperatura inicial: 40°C, mantener por 3 minutos Incremento de 30°C/min hasta llegar a 160°C Incremento de 15°C/min hasta llegar a 250°C	13
4	Temperatura inicial: 60°C, mantener por 3 minutos Incremento de 30°C/min hasta llegar a 180°C Incremento de 5°C/min hasta llegar a 200°C Incremento de 30°C/min hasta llegar a 260°C, mantener por 2 minutos	13
5	Temperatura inicial: 90°C, mantener por 1 minuto Incremento de 30°C/min hasta llegar a 180°C Incremento de 5°C/min hasta llegar a 200°C Incremento de 30°C/min hasta llegar a 260°C, mantener por 2 minutos	12
6	Temperatura inicial: 130°C, mantener por 1 minuto	10

	Incremento de 30°C/min hasta llegar a 190°C Incremento de 10°C/min hasta llegar a 210°C Incremento de 30°C/min hasta llegar a 270°C, mantener por 4 minutos	
--	--	--

Una vez establecido el programa de temperatura óptimo para la cuantificación del carvacrol, se seleccionó el estándar interno. Los terpenos probados fueron: mentol, timol y cineol.

El método analítico para cuantificar el carvacrol por inyección directa, se validó bajo los criterios de la ICH/Q2B (ICH,1996). Se validó el procedimiento cromatográfico mediante la determinación de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

Se utilizaron los valores obtenidos de la curva de calibración de estándares de carvacrol en metanol realizada por triplicado. El rango de concentraciones del carvacrol y mentol se muestran en la tabla II.2.

**Tabla II.2. Rango de concentraciones de carvacrol y mentol utilizadas en la curva de calibración por inyección directa.**

Concentración de carvacrol (µg/mL)	Concentración de mentol (µg/mL)	Relación carvacrol/mentol
5	12.5	0.4
12.5	12.5	1
25	12.5	2
50	12.5	4
100	12.5	8
200	12.5	16

#### II.4 Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por *headspace*

Para cuantificar el carvacrol no unido a las NPs, se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por *headspace* (HP-SPME, por sus siglas en inglés). Esta técnica consiste brevemente en extraer el carvacrol presente en las muestras que se colocan en viales (relación 1:1 muestra:headspace), mediante la adsorción en una fibra de sílice fundida recubierta por poliacrilato (85 µm) que se introduce en el espacio del *headspace*, seguida de la desorción del carvacrol mediante temperatura en el inyector del cromatógrafo de gases (Figura II.2).

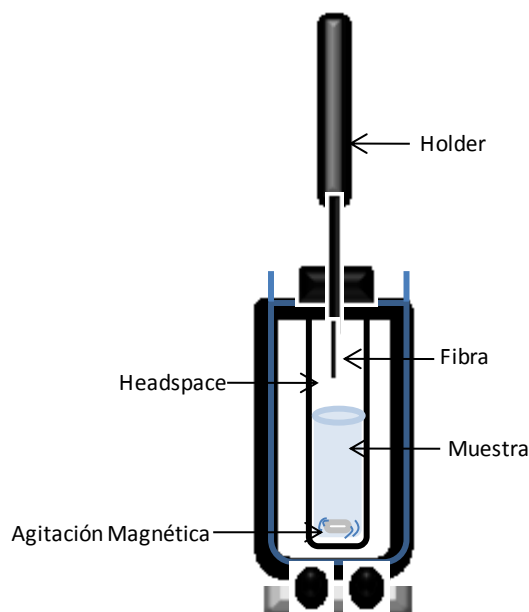


Figura II.2. Esquema de los experimentos de HS-SPME.

Con el fin de establecer las mejores condiciones de extracción del carvacrol a partir de las muestras, se probaron diferentes tiempos de extracción. Se prepararon estándares de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de carvacrol y 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de mentol en un volumen final de 7.5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos-salina (0.8% p/v). Se colocaron en viales de 15 mL en relación 1:1 (muestra:headspace) y se dejó equilibrar durante 10 min a 55°C. Los tiempos de extracción del carvacrol probados fueron de 5, 10, 20, 30, 40 y 60 minutos a 55°C. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Cabe mencionar que, previo a la primera utilización de la fibra de poliacrilato, se acondicionó en el inyector del cromatógrafo de gases durante 1 hora a 280°C. Los acondicionamientos posteriores se realizaron durante 20 minutos a la misma temperatura.

Las condiciones experimentales utilizadas para realizar la HS-SPME se muestran en la tabla II.3 (Rodríguez-Lafuente, 2009).

Tabla II.3. Condiciones utilizadas en la HS-SPME.

Fibra	Poliacrilato (85 $\mu\text{m}$ )
Volumen de headspace	7.5 mL
Volumen de muestra	7.5 mL
Velocidad de agitación	250 rpm
Temperatura de equilibrio y extracción	55°C
Tiempo de equilibrio	10 minutos
Tiempo de extracción	10 minutos
Temperatura de desorción	270°C
Tiempo de desorción	5 minutos

Una vez establecidas las condiciones para la HS-SPME, se realizó una curva de calibración (por triplicado) con estándares de carvacrol en metanol:agua (0.1:10) con un rango de concentraciones de 0.1 a 2.5 µg/mL. A cada estándar se le adicionó 625 µL de una solución de mentol a una concentración de 100 µg/mL como estándar interno (Tabla II.4).

**Tabla II.4. Rango de carvacrol y mentol utilizado en la curva de calibración por HS-SPME.**

Concentración de carvacrol (µg/mL)	Concentración de mentol (µg/mL)	Relación carvacrol/mentol
0.1	0.5	0.2
0.5	0.5	1
1	0.5	2
1.5	0.5	3
2.5	0.5	5

Para su cuantificación, se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas optimizadas previamente para la cuantificación del carvacrol por inyección directa, la única modificación que se realizó fue la utilización del inyector a modo de splitless.

Para identificar posibles interferencias en la cuantificación del carvacrol, se analizaron diferentes muestras (Tabla II.5).

**Tabla II.5. Muestras analizadas por los métodos analíticos de cromatografía de gases.**

Muestra de análisis	Procedimiento
Acetona	inyección directa
1.5 mg/mL de poli ε-caprolactona en acetona	inyección directa
NPs sin carvacrol	HS-SPME
NPs sin carvacrol con una concentración de 1.5 mg/mL de poli ε-caprolactona	HS-SPME
Solución amortiguadora de fosfatos-salina (0.8% p/v)	HS-SPME
Solución amortiguadora de fosfatos-salina (0.8% p/v) con tween 80 (3% p/v)	HS-SPME

El método analítico para cuantificar el carvacrol con HS-SPME, se validó bajo los criterios de la ICH/Q2B (ICH,1996). Se validó el procedimiento cromatográfico mediante la determinación de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

## II.5 Validación de los métodos cromatográficos

Ambos métodos se validaron bajo los criterios de la ICH/Q2B. Utilizando los valores obtenidos de sus respectivas curvas de calibración, se evaluó el comportamiento del procedimiento cromatográfico mediante la determinación de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación para cada uno de los métodos desarrollados.

### Linealidad

Para el estudio de la linealidad del sistema se preparó una curva de calibración, para el caso de inyección directa se prepararon estándares en un intervalo de concentración desde 5 hasta 200 µg/mL que incluyó 6 concentraciones diferentes (tabla II.2). Para el caso de CG HS-SPME se prepararon estándares en un intervalo de concentración desde 0.1 hasta 2.5 µg/mL que incluyó 5 concentraciones diferentes (tabla II.4). Cada uno de los análisis se realizó por triplicado. Con los datos obtenidos se graficó la respuesta cromatográfica en función de la concentración y se realizó un análisis de regresión lineal.

El valor del coeficiente de correlación múltiple entre más cercano a 1 indica una recta con mayor linealidad; sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal es el test estadístico de t. En éste caso la hipótesis nula es la no correlación entre X y Y. Si el valor observado de  $t_r$  es mayor que  $t_{\text{tabla}}$ , se rechaza la hipótesis, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

La ecuación propuesta por Quattrocchi (Quattrocchi, O., 1992) es la siguiente:

### ***Ecuación 3***

$$t_r = |R| \frac{\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-R^2}}$$

Donde:

$t_r$  = Estadístico t calculado

$R$  = Coeficiente de correlación múltiple

$n$  = Número de experimentos

$R^2$  = Coeficiente de correlación

## Precisión

Para la determinación de la precisión del sistema se evaluó la desviación estándar relativa (DER) de las respuestas de los triplicados de la curva de calibración obtenida en cada uno de los métodos.

La fórmula utilizada por Quattrocchi (Quattrocchi, O., 1992) para la determinación de la DER es la siguiente:

### **Ecuación 4**

$$DER = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

Donde:

$S$  = Desviación estándar de los valores

$\bar{X}$  = Media de los valores

Los criterios de aceptación se muestran en la tabla II.6

**Tabla II.6. Criterios de aceptación para evaluar la precisión de un método analítico.**

<b>Método</b>	<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Referencia</b>
Inyección directa	DER < al 3 %	Batista-Carmona, 2003
HS-SPME	DER < al 15 %	Castellanos-Molina, 2007

## Exactitud

La exactitud del sistema se determinó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación para el cual fue necesario emplear el método de adición de estándar, mediante la preparación de muestras con diferentes volúmenes de un estándar de carvacrol de concentración conocida.

Para el caso del método por inyección directa, se adicionaron diferentes volúmenes de una solución estándar de carvacrol a 1000 µg/mL y se mantuvo constante el volumen adicionado de la solución muestra de carvacrol (1000 µg/mL). Se adicionó 1 mL de una solución de mentol a 1000 µg/mL. Se llevó a un volumen total de 5 mL con metanol (tabla II.7). Cada estándar se realizó por triplicado.

**Tabla II.7. Curva con adición de estándar para determinar exactitud en CG por inyección directa.**

<b>Estándar</b>	<b>Volumen adicionado del estándar de carvacrol (µL)</b>	<b>Volumen adicionado de la muestra de carvacrol (µL)</b>
1	0	700

2	50	700
3	300	700
4	550	700
5	800	700

En el método de HS-SPME, se adicionaron diferentes volúmenes de una solución estándar de carvacrol a 50 µg/mL y se mantuvo constante el volumen adicionado de la solución muestra de carvacrol (50 µg/mL). El volumen total de los estándares fue de 20 mL aforados con agua Mili-Q (tabla II.8). De cada uno de los estándares se transfirió 7.5 mL a viales a los cuales se les adicionó 75 µL de una solución de mentol a 50 µg/mL, para su posterior extracción. Cada estándar se realizó por triplicado.

**Tabla II.8. Curva con adición de estándar para el método de HS-SPME.**

<b>Estándar</b>	<b>Volumen adicionado de estándar de carvacrol (mL)</b>	<b>Volumen adicionado de la muestra de carvacrol (µL)</b>
1	0	400
2	0.5	400
3	1	400
4	1.5	400
5	2	400

Para calcular el porcentaje de recuperación se empleó la siguiente ecuación (Quattrocchi, O., 1992):

**Ecuación 5**

$$\%R = \frac{X}{x} * 100$$

Donde:

$\%R$  = % de recuperación

$X$  = Valor promedio observado

$x$  = Valor verdadero

Para tener un valor verdadero de la muestra se preparó un estándar de carvacrol (65 y 1 µg/mL, para el de inyección directa y HS-SPME respectivamente) el cual se analizó con la curva de estándar interno con el dato obtenido se calculó el %R.

Además, la exactitud del sistema también se determinó, en ambos casos, obteniendo el coeficiente de correlación de la curva obtenida al graficar el cálculo de concentración de los estándares utilizados, con la ecuación de la recta de la curva de calibración, en función de los valores reales de concentración de dichos estándares. Cuanto más se acerque a uno el valor del coeficiente, más exacto es el método.

#### Límite de Detección

El límite de detección para los dos sistemas se determinó utilizando los valores de la curva de calibración y los datos de la ecuación de la recta de cada uno de los métodos según lo indica Miller (Miller, J., Miller, J., 1993). La fórmula utilizada fue:

#### ***Ecuación 6***

$$LDD = Y_B + S_B$$

Donde:

$Y_B$  = Intercepto de la recta en el eje de las Y.

$S_B$  = Desviación estándar del blanco, también se representa como  $S_{y/x}$  que se puede determinar:

#### ***Ecuación 7***

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Donde:

$y_i$  = Valores de y en la recta

$\hat{y}_i$  = Valores de y ajustados (corresponde al pronóstico de absorbancia obtenido de la curva de calibración a través del programa Excel)

$n$  = Número de experimentos realizados

#### Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación para los dos sistemas se determinó utilizando los valores de la curva de calibración y los datos de la ecuación de la recta de cada uno de los métodos según lo indica Miller (Miller, J., Miller, J., 1993). La fórmula utilizada fue:

#### **Ecuación 8**

$$LDC = Y_B + 10S_B$$

Donde:

$Y_B$  = Es el intercepto de la recta en el eje de las Y.

$S_B$  = Desviación estándar del blanco, que de igual forma que en el caso del LDC, también se representa como  $S_{y/x}$ .

## II.6 Ensayos biológicos con la piel de cerdo

### Estudios *in vitro* de permeación transdérmica

Se utilizaron celdas de Franz modificadas de forma vertical (figura II.3), las cuales constan de un compartimento donador y uno receptor. En el compartimento receptor se colocaron 15 mL de solución amortiguadora de fosfatos-salina al 0.8 % (p/v) (SAFS) a un pH de 7.4, con tween 80 al 3% (p/v), a una temperatura de 37 °C y agitación constante. En el compartimento donador se adicionaron 2 mL de la formulación de NPs con carvacrol o de la emulsión control de carvacrol. La piel de cerdo se colocó entre los dos compartimentos.

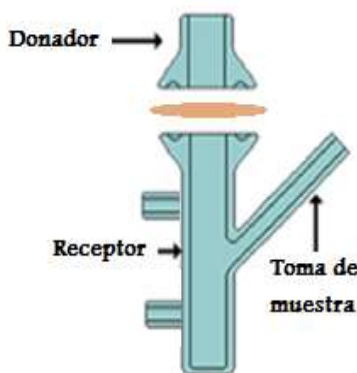


Figura II.3. Esquema de una celda de Franz modificada verticalmente.

Después de 3 horas de contacto de las formulaciones con la superficie de la piel, la formulación donadora se retiró y se realizó un lavado con 3 mL de SAFS. La solución receptora se recuperó y se sometió a la técnica de HS-SPME para determinar la cantidad de carvacrol presente. La piel de cerdo se recuperó y se realizó la técnica de *tape stripping*. Cada experimento se realizó por quintuplicado.

#### Técnica de *Tape stripping*

Esta técnica consiste en eliminar sucesivamente las capas que forman el estrato corneo, capa más superficial de la piel. Se coloca una cinta adhesiva (2.1x2.1 cm), previamente acondicionada, en la superficie de la piel; se presiona suavemente para asegurar un buen contacto y, posteriormente, se desprende la cinta adhesiva de la superficie de la piel con un solo movimiento.

La optimización de la técnica de *tape stripping* consistió en aplicar esta técnica a cinco pedazos de piel control utilizando 15 cintas adhesivas previamente acondicionadas y pesadas. Después, se pesaron nuevamente y por diferencia de peso, se obtiene la cantidad de estrato córneo arrancado en cada cinta adhesiva. Para calcular la profundidad del estrato córneo, se utiliza la fórmula de densidad (ecuación 9) involucrando la densidad de la piel ( $\rho = 1 \text{ g/mL}$ ) (Kalia, Y. N., 1996).

#### **Ecuación 9**

$$\rho = m/v$$

Donde:

$\rho$ = densidad

$m$ = masa

$v$ = volumen

En relación a los experimentos de permeación transdérmica, después de 3 horas de contacto de las formulaciones, la piel de cerdo se recuperó y se aplicaron 15 cintas adhesivas previamente acondicionadas y pesadas. El carvacrol presente en cada cinta se extrajo con 1.5 mL de metanol en agitación por 10 minutos. Cada una de las primeras cinco cintas adhesivas se extrajeron individualmente, a partir de la sexta cinta, la extracción se realizó de dos en dos cintas. Cada experimento se realizó por quintuplicado. La cuantificación del carvacrol se analizó por inyección directa por CG.

Para identificar posibles interferencias en la cuantificación del carvacrol, se analizaron diferentes muestras (Tabla II.9).

**Tabla II.9. Muestras analizadas como controles experimentales.**

<b>Muestra de análisis</b>	<b>Método</b>
Solución amortiguadora 8% (p/v) (SAFS)	HS-SPME
SAFS con el tensoactivo tween 80 al 1, 3 y 5 % (p/v)	HS-SPME
SAFS con el tensoactivo volpo al 1, 3 y 5 % (p/v)	HS-SPME
SAFS con el tensoactivo tween 80 al 3% (p/v) después de 6 horas de estar en contacto con la piel de puerco.	HS-SPME
Cintas adhesivas en 1.5 mL de metanol después de agitación constante durante 10 min.	inyección directa
Cintas adhesivas con estrato corneo en 1.5 mL de metanol después de agitación constante durante 10 min.	inyección directa
Carvacrol en cintas adhesivas en 1.5 mL de metanol después de agitación constante durante 10 min.	inyección directa
Carvacrol en cintas adhesivas con estrato córneo en 1.5 mL de metanol después de agitación constante durante 10 min.	inyección directa
NPs con carvacrol en cintas adhesivas en 1.5 mL de metanol después de agitación constante durante 10 min.	inyección directa
NPs con carvacrol en cintas adhesivas con estrato corneo en 1.5 mL de metanol después de agitación constante durante 10 min.	inyección directa

## II.7 Preparación y caracterización de una emulsión con carvacrol libre

Se utilizó una emulsión como formulación control de carvacrol libre. Se adicionaron 15 mg de carvacrol a 10 mL de tween 80 al 1% (p/v), se agitaron a 6500 rpm en un dispersador/homogenizador (VWR, VDI12) por 2 ciclos de 4 minutos, a temperatura ambiente. La emulsión se preparó por triplicado con una concentración final de carvacrol de 1.5 mg/mL (misma concentración de carvacrol en las NPs). Para determinar su estabilidad, las emulsiones se mantuvieron a temperatura ambiente, en viales cerrados herméticamente, protegidos de la luz y en un ambiente con humedad relativa del 37±2 %. La estabilidad se evaluó de acuerdo a su

aspecto físico: determinando estabilidad mientras la solución mostrara una apariencia homogénea.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### III.1 Obtención y caracterización de las nanopartículas (NPs)

Las NPs se obtuvieron de acuerdo a la técnica de nanoprecipitación. Con el fin de optimizar la obtención de las NPs, se modificaron dos variables experimentales:

a) Cantidad de polímero en la fase orgánica. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.1.

**Tabla III.1. Cantidad de polímero utilizada y tamaño de NPs obtenido.**

<b>poli <math>\epsilon</math>-caprolactona (mg)</b>	<b>Tamaño de NPs (nm) (<math>\bar{x} \pm \sigma</math>) n=3</b>
10	170 $\pm$ 4
15	180 $\pm$ 1
20	210 $\pm$ 5
25	225 $\pm$ 2

$\sigma$ , Desviación estándar; n, Número de muestras

b) Cantidad de carvacrol en la fase orgánica. En la tabla III.2 se encuentran los tamaños de las NPs obtenidos al utilizar 15 mg de poli  $\epsilon$ -caprolactona y diferentes cantidades de carvacrol.

**Tabla III.2. Cantidad de carvacrol utilizado y el tamaño de NPs obtenido.**

<b>Carvacrol (mg)</b>	<b>Tamaño de NPs (nm) (<math>\bar{x} \pm \sigma</math>) n=3</b>
10	181 $\pm$ 35
13	182 $\pm$ 12
15	180 $\pm$ 3
17	194 $\pm$ 17
20	167 $\pm$ 33

$\sigma$ , Desviación estándar; n, Número de muestras

La suspensión de NPs seleccionada fue aquella obtenida con 15 mg de poli  $\epsilon$ -caprolactona y 15 mg de carvacrol en la fase orgánica. Las NPs presentaron un diámetro de partícula de 180  $\pm$  3 nm y un potencial  $\zeta$  de -17.5  $\pm$  0.009 mV. En la figura III.1 se puede observar una micrografía electrónica de barrido de estas NPs.

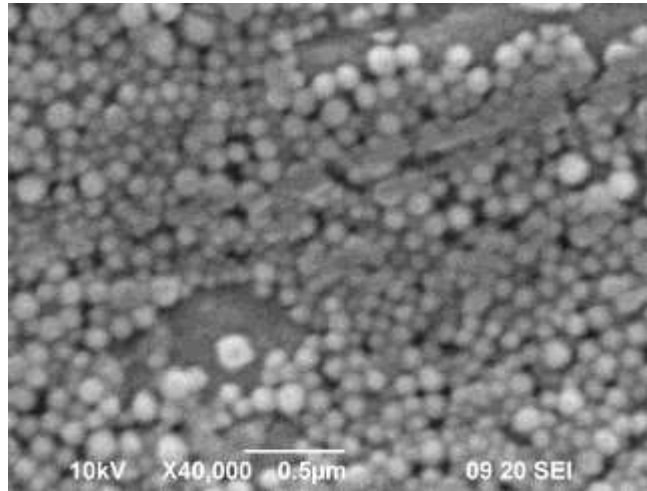


Figura III.1. Micrografía electrónica de barrido de NPs cargadas con carvacrol.

Con respecto a la estabilidad de la suspensión de NPs, se determinó midiendo el tamaño de las NPs durante cinco meses. En la figura III.2 se muestra el tamaño de las NPs en función del tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, protegidos de la luz y en un ambiente con  $37 \pm 2$  % de humedad relativa.

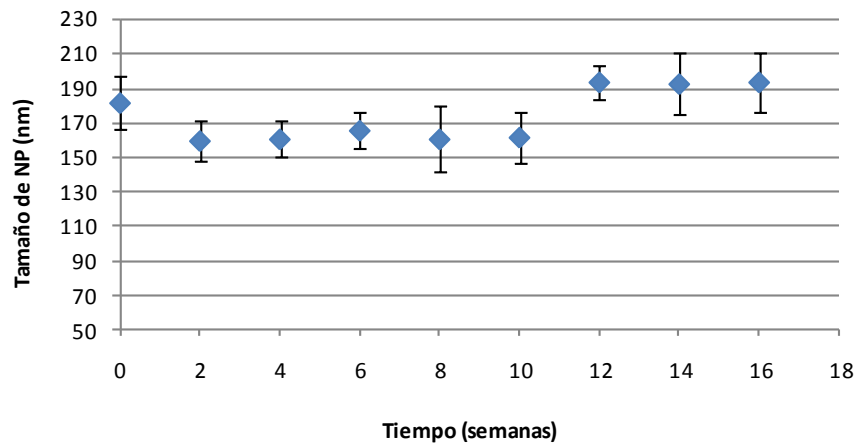


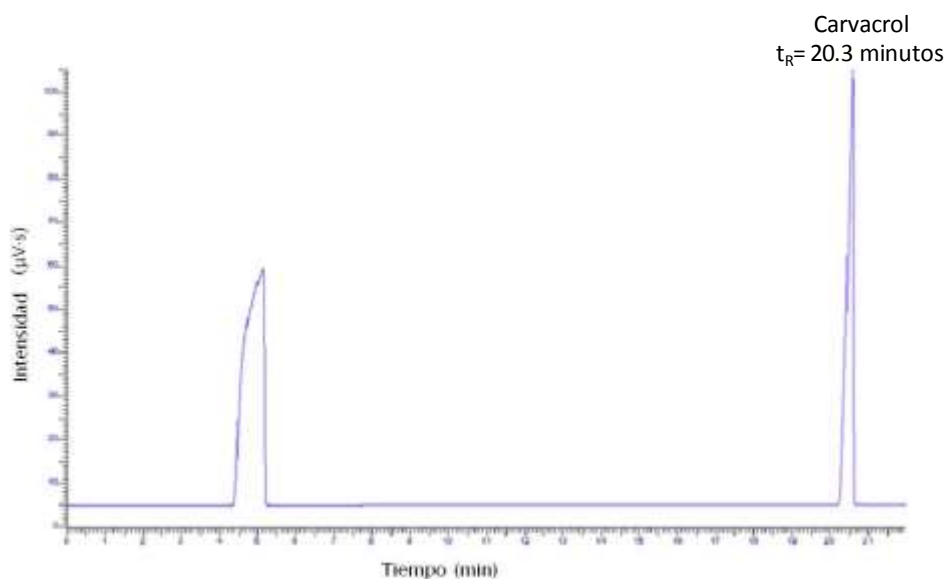
Figura III.2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el tamaño de las NPs.

Los resultados obtenidos del porcentaje de encapsulación y el porcentaje de eficiencia de encapsulación se muestran en la tabla III.3.

Tabla III.3. Porcentaje de encapsulación y porcentaje de eficiencia de encapsulación.	
Parámetro	% obtenido ( $\bar{x} \pm \sigma$ ) n=3
Porcentaje de encapsulación	50.85 % $\pm$ 2.40
Porcentaje de eficiencia de encapsulación	91.76 % $\pm$ 0.27

### III.2 Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID)

Para cuantificar el carvacrol en las NPs y en las muestras biológicas se desarrolló y validó un método por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID, por sus siglas en inglés) por inyección directa. El cromatograma obtenido al analizar un estándar de carvacrol bajo las condiciones cromatográficas iniciales se muestra en la figura III.3.



**Figura III.3. Cromatograma de una solución control de carvacrol (1000 µg/mL) en solución metanólica con el programa de temperatura inicial.**

Para la optimización de las condiciones cromatográficas, se evaluaron diferentes programas de temperatura a partir del programa inicial. Las condiciones cromatográficas definitivas en el método de GC-FID por inyección directa se muestran en la tabla III.4.

**Tabla III.4. Condiciones cromatográficas finales para el análisis.**

<b>Columna</b>	Polidimetilsiloxano (100 %), AT-1, Grace (30m x 0.53mm x1.5µm)
<b>Detector</b>	FID a 250°C
<b>Inyector</b>	270°C Split 1:20
<b>Programa de temperatura final</b>	Temperatura inicial: 130°C, mantener por 1 minuto Incremento de 30°C/min hasta llegar a 190°C Incremento de 10°C/min hasta llegar a 210°C Incremento de 30°C/min hasta llegar a 270°C, mantener por 4 minutos.

El cromatograma obtenido al analizar el carvacrol con las condiciones cromatográficas previamente establecidas se muestran en la figura III.4

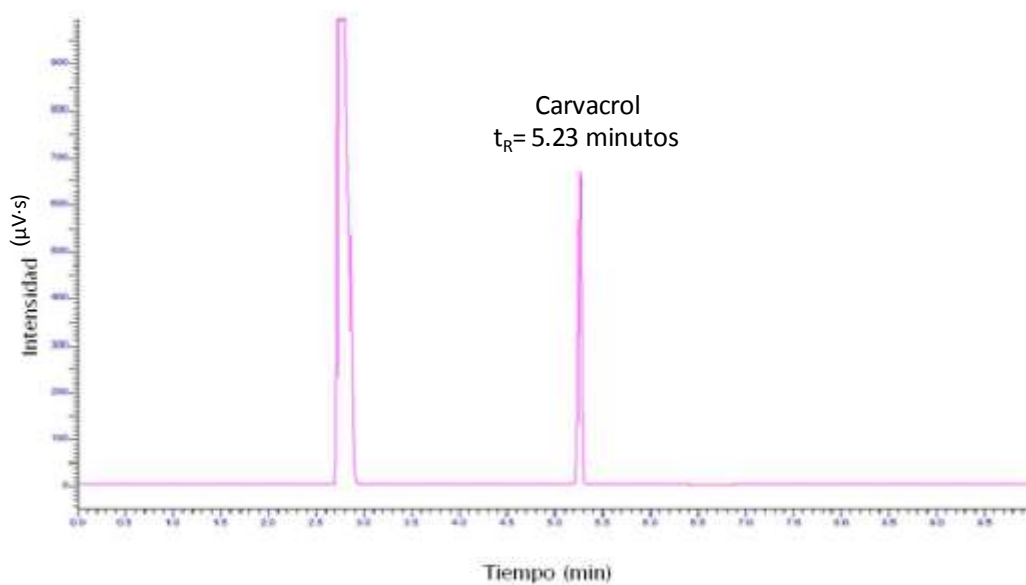


Figura III.4 Cromatograma de una solución control de carvacrol (500 µg/mL) en solución metanólica con el programa de temperatura optimizado.

Para seleccionar el estándar interno, se analizaron los terpenos: mentol, timol y cineol con las condiciones cromatográficas previamente establecidas. En base a su cromatograma (figura III.5), se seleccionó el mentol como estándar interno.

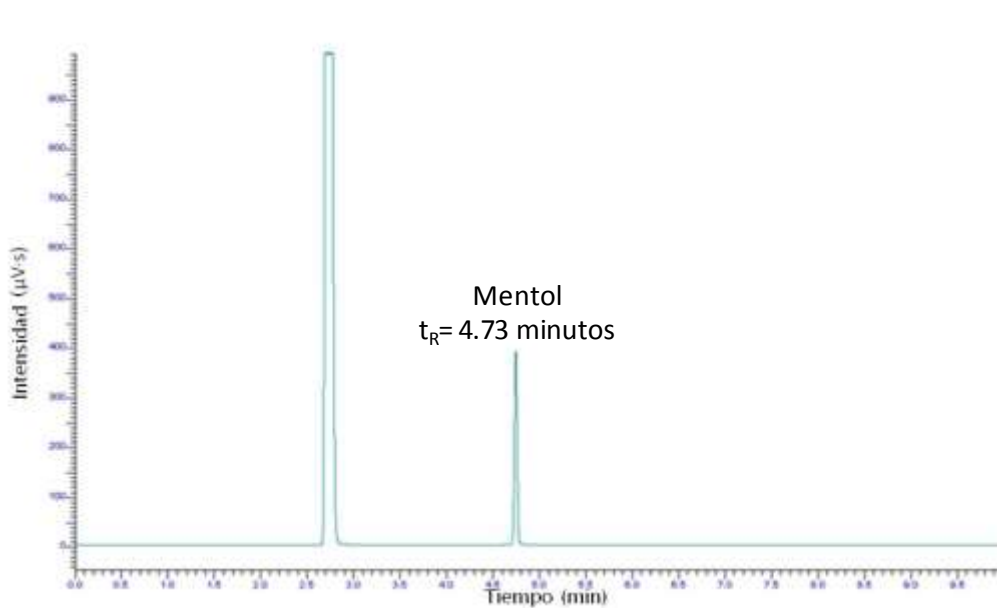


Figura III.5. Cromatograma de una solución control de mentol (500 µg/mL) en solución metanólica con el programa de temperatura optimizado.

La figura III.6 muestra el cromatograma de una mezcla de mentol y carvacrol con el programa de temperatura optimizado.

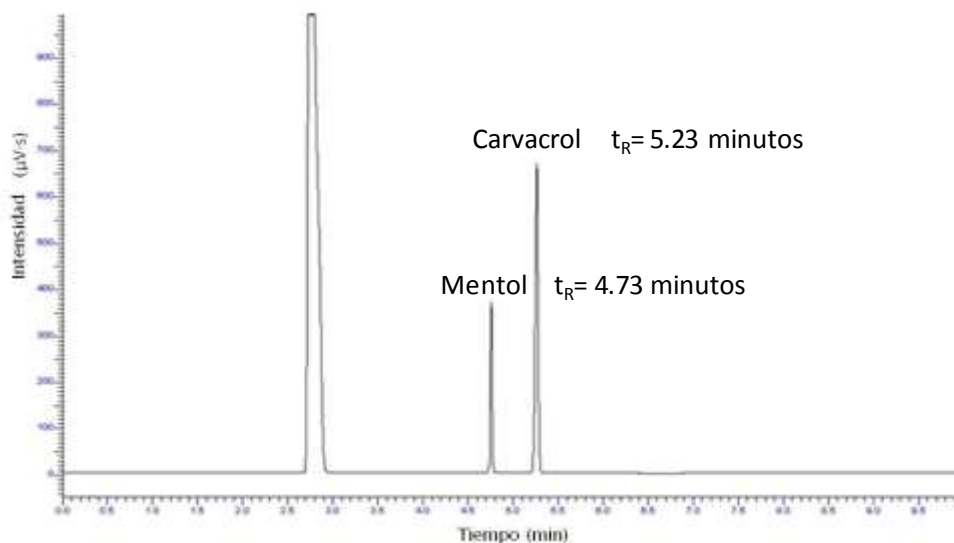


Figura III.6. Cromatograma de una solución control de mentol (500  $\mu\text{g/mL}$ ) y carvacrol (500  $\mu\text{g/mL}$ ) con el programa de temperatura optimizado.

El método analítico para cuantificar el carvacrol por inyección directa, se validó bajo los criterios de la ICH/Q2B (ICH, 1996). Se evaluó el comportamiento del procedimiento cromatográfico mediante la determinación de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

La curva de calibración obtenida se muestra en la figura III.7.

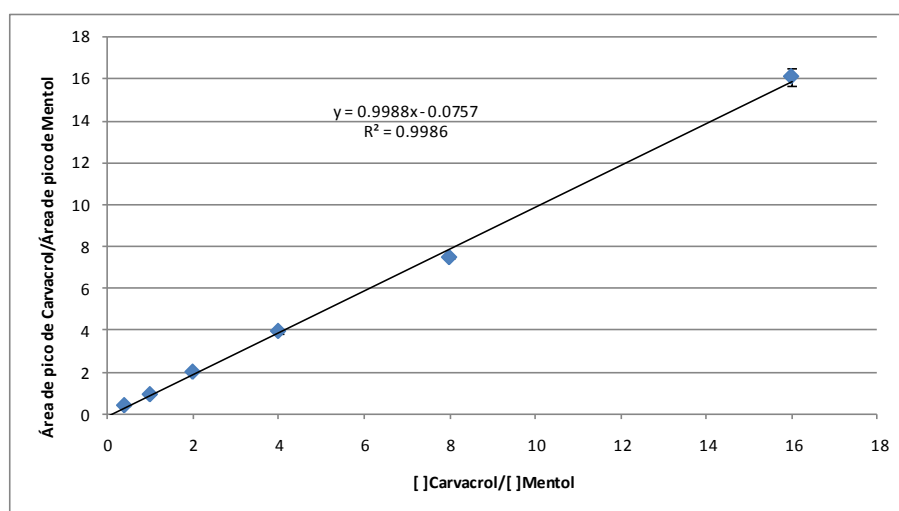


Figura III.7. Curva de calibración del método de cromatografía de gases por inyección directa.

En la tabla III.5 se muestran los parámetros de validación del método de cromatografía de gases por inyección directa.

**Tabla III.5. Parámetros de validación del método de cromatografía de gases por inyección directa.**

<b>Parámetro</b>	<b>Valores</b>
<b>Intervalo de concentración del carvacrol</b>	5-200 µg/mL
<b>Ecuación de la recta</b>	Y=0.9988x-0.0757
<b>Coefficiente de correlación (R<sup>2</sup>)</b>	0.9986
<b>Estadístico de linealidad</b>	t <sub>calculado</sub> > t <sub>tabla</sub>
<b>Precisión</b>	DER < 2.5%
<b>Exactitud</b>	% Recuperación = 98.18%
	R <sup>2</sup> = 0.9979
<b>Límite de detección (LDD)</b>	3.8 µg/mL
<b>Límite de cuantificación (LDC)</b>	9.9 µg/mL

### III.3 Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por *headspace*

Para cuantificar el carvacrol no unido a las NPs, se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por *headspace* (HP-SPME, por sus siglas en inglés).

Con el fin de establecer las mejores condiciones de extracción del carvacrol, se probaron diferentes tiempos de extracción. La figura III.8 muestra la curva obtenida con diferentes tiempos de extracción de estándares de carvacrol.

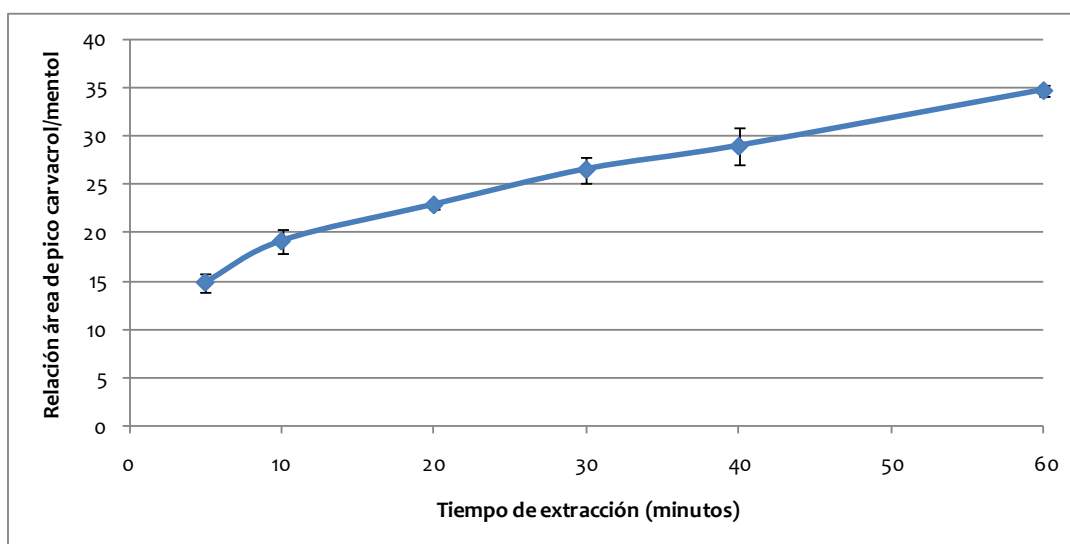


Figura III.8. Efecto del tiempo de extracción del carvacrol sobre la señal obtenida por HS-SPME.

Una vez establecido el tiempo de extracción del carvacrol de 10 minutos se realizó la curva de calibración, la cual se muestra en la figura III.9.

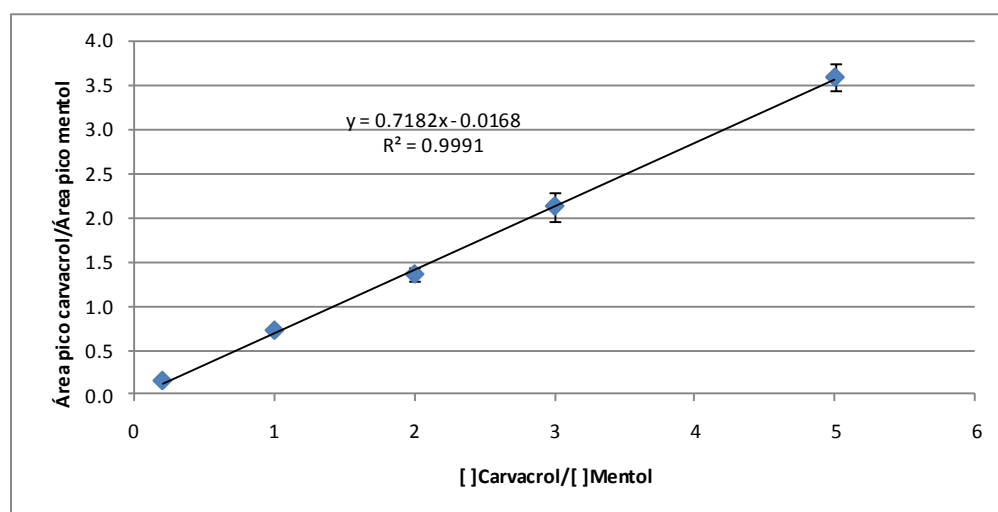


Figura III.9. Curva de calibración del método de cromatografía de gases por HS-SPME.

En la tabla III.6 se muestran los parámetros de validación del método de cromatografía de gases por HS-SPME.

Tabla III.6. Parámetros de validación del método de cromatografía de gases por HS-SPME.

Parámetro	Valores
Intervalo de concentración del carvacrol	0.1–2.5 µg/mL
Ecuación de la recta	Y=0.7182x-0.0168
Coefficiente de correlación (R <sup>2</sup> )	0.9991
Estadístico de linealidad	t calculado > t <sub>tabla</sub>
Precisión	DER < 8%
Exactitud	% Recuperación= 107.7% R <sup>2</sup> = 0.9943
Límite de detección (LDD)	0.07 µg/mL
Límite de cuantificación (LDC)	0.18 µg/mL

#### III.4 Ensayos biológicos con la piel de cerdo

##### Estudios *in vitro* de permeación transdérmica

La suspensión de NPs cargadas con carvacrol y la emulsión con carvacrol libre, se aplicaron en la superficie de la piel durante 3 horas. Después de este tiempo, la solución receptora se recuperó y se sometió a HS-SPME para cuantificar la cantidad de carvacrol que haya sido capaz de atravesar la

piel. En ninguna de las muestras analizadas se obtuvo una señal cromatográfica correspondiente al carvacrol.

#### Técnica de *Tape stripping*

En la figura III.10 se muestran los resultados obtenidos durante la estandarización de la técnica de *tape stripping* con la aplicación de 15 cintas adhesivas a orejas sin previo tratamiento.

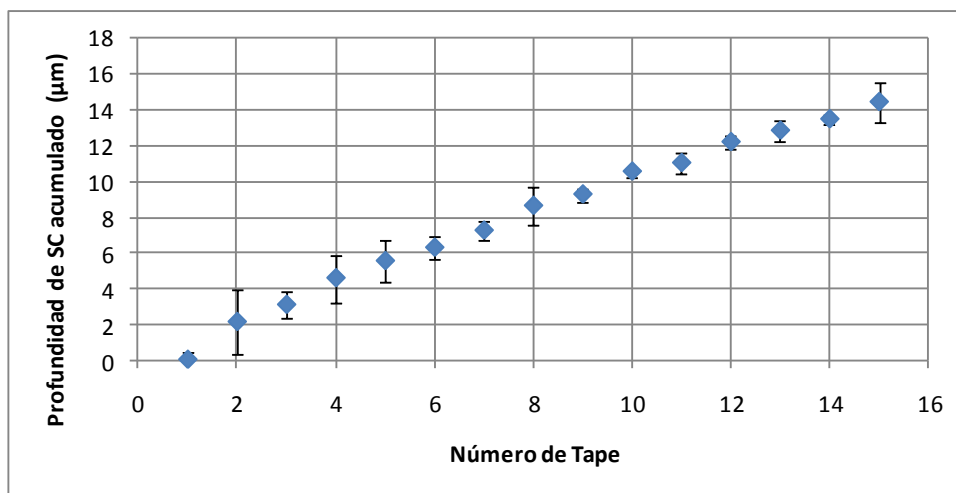


Figura III.10. Curva de la profundidad de EC acumulada en función del número de tape desprendido, (n= 5).

Después de los estudios de permeación transdérmica, la piel que estuvo en contacto con las formulaciones de carvacrol (NPs y libre) se recuperó, se enjuagó y se le aplicó la técnica de *tape stripping*. En la figura III.11 se muestra la cantidad de carvacrol presente a diferente profundidad del estrato córneo.

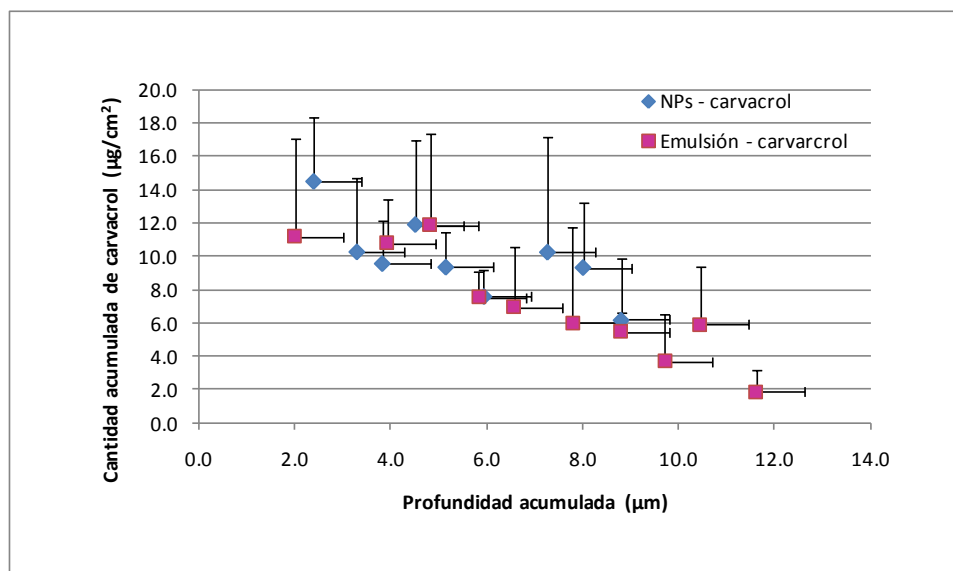


Figura III.11. Cantidad de carvacrol en función de la profundidad acumulada del estrato córneo.

La figura III.12 muestra la cantidad acumulada de carvacrol en función de la profundidad normalizada del estrato córneo.

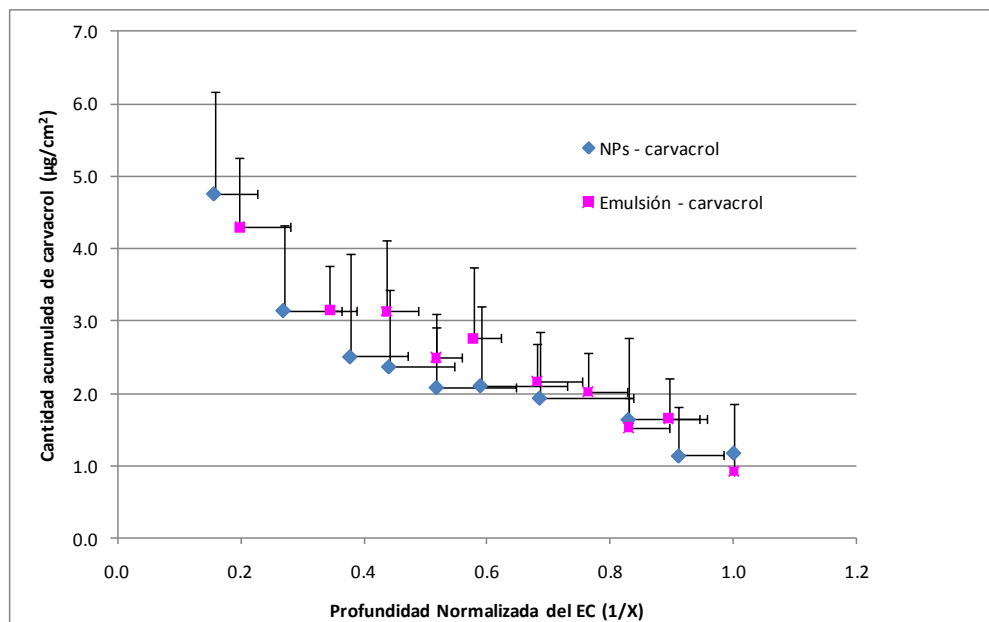


Figura III.12. Cantidad de carvacrol en función de la profundidad normalizada del estrato córneo.

### III.5 Preparación y caracterización de una emulsión con carvacrol libre

Con respecto a la estabilidad de la emulsión de carvacrol, se determinó observando a simple vista la homogeneidad de la solución. Los lotes de emulsión se mantuvieron bajo las condiciones descritas en la sección II.7.

En la figura III.13 se muestran imágenes de la estabilidad de las emulsiones en función del tiempo.

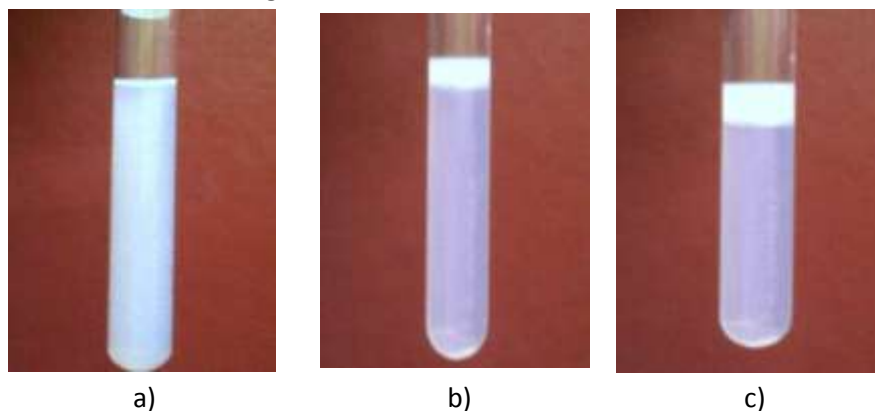


Figura III.13 a) Imagen de la emulsión de carvacrol durante los primeros 10 días posteriores a su formulación; b) Imagen de la emulsión de carvacrol al día 11 de su formulación; c) Imagen de la emulsión de carvacrol después del día 12 de formulado.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### IV.1 Obtención, optimización y caracterización de las nanopartículas (NPs)

Durante la obtención y optimización de las NPs por la técnica de nanoprecipitación, se determinó que un incremento de la cantidad de polímero en la fase orgánica indujo un aumento en el diámetro de las NPs (Tabla III.1). Esto puede explicarse tomando en cuenta el mecanismo de formación de NP por nanoprecipitación: al entrar en contacto las fases orgánica y acuosa, el solvente presente en la fase orgánica difunde a la fase acuosa e induce la agregación de las cadenas de polímero y, en consecuencia, la formación de las nanopartículas. Por lo tanto, a mayor concentración de polímero en la fase orgánica, existe una mayor cantidad de cadenas por unidad de volumen de solvente, lo cual conducirá a la formación de nanopartículas de mayor tamaño (Galindo-Rodríguez, S.A., 2004).

Con el fin de obtener NPs con un diámetro alrededor de los 200 nm, para su posterior aplicación en los estudios *in vitro* de permeación transdérmica, se seleccionó utilizar 15 mg de poli-ε caprolactona en la fase orgánica. Las NPs blanco (NPs sin carvacrol) obtenidas bajo estas condiciones tuvieron un diámetro de  $180 \pm 3$  nm ( $n=3, \bar{x} \pm \sigma$ ), con índice de polidispersión (IP) de  $0.120 \pm 0.027$  ( $n=3, \bar{x} \pm \sigma$ ) y un potencial  $\zeta$  de  $-22 \pm 1.323$  mV ( $n=3, \bar{x} \pm \sigma$ ).

Para determinar el efecto de la cantidad de carvacrol en la fase orgánica sobre el diámetro de las NPs, se adicionó carvacrol en la fase orgánica en un rango de 10 a 20 mg. En la tabla III.2, se muestran los resultados en los cuales se observó que a mayor cantidad de carvacrol adicionado, mayor será el diámetro de las NPs obtenidas. Estos resultados indican que la cantidad de carvacrol presente en la fase orgánica, influye de manera directa en el tamaño de las NPs. Este comportamiento coincide con el observado por Velázquez y colaboradores (2009), donde encapsularon clotrimazol en NPs de Eudragit RL-100® y observaron un incremento del diámetro de las NPs en función de la cantidad del principio activo adicionado. Cabe mencionar que las NPs obtenidas con 20 mg de carvacrol presentan un diámetro menor que aquellas obtenidas con 17 mg. Esto se puede explicar, considerando que en los lotes donde se utilizó 20 mg de carvacrol, más de este aceite quedó libre, sin ser encapsulado por el polímero que se agotó, y debido a que es altamente hidrofóbico, al entrar en contacto con la fase acuosa que contiene tensoactivo, se favorece la formación de pequeñas micelas obteniendo partículas muy pequeñas de carvacrol las cuales también son medidas por el equipo de correlación fotónica.

Diferentes estudios en el área de nanomedicina, han determinado que el tamaño de las NPs es un factor importante en la captación celular, la bio-distribución, la liberación de fármacos, así como en la estabilidad de la formulación (Kumari, Yadav, Pakade, Kumar, & Singh, 2010). En base a lo

anterior, se seleccionaron las NPs con un diámetro de  $180 \pm 3$  nm ( $n=3, \bar{x} \pm \sigma$ ) cuya relación polímero-carvacrol es 1:1.

Con respecto a la caracterización de las NPs seleccionadas, se determinó que su IP fue de  $0.083 \pm 0.009$  ( $n=3, \bar{x} \pm \sigma$ ). El IP varía en un rango de 0 a 1, en donde un valor más alto corresponde a una menor homogeneidad en la distribución del tamaño de las NPs y el valor más cercano al cero indica una distribución homogénea de tamaño de (Galindo-Rodríguez, S. A., 2004). Por lo tanto, las NPs tienen una distribución homogénea de tamaño de partícula buena.

La micrografía electrónica de barrido (Fig. III.1) confirma la formación de NPs esféricas y homogéneas. Además, estas NPs presentaron un potencial  $\zeta$  de  $-17.5 \pm 0.009$  mV ( $n=3, \bar{x} \pm \sigma$ ), dicha carga suele ser negativa, producen fuerzas de repulsión electrostática entre las partículas vecinas lo que permite su suspensión en el medio que las contiene (Zeta-Meter Inc.).

Para determinar la estabilidad de la formulación de NPs seleccionadas, se midió su diámetro por espectroscopía de correlación fotónica y se realizó una evaluación visual de la ausencia o presencia del carvacrol en la superficie de la suspensión de las NPs. En la figura III.2 se aprecia que el diámetro de las NPs no varía de forma significativa después de 16 semanas. Esto sugiere que las NPs son estables por lo menos durante 16 semanas no habiendo un efecto significativo sobre el tamaño de las NPs cargadas con carvacrol. Además no se observó la presencia de carvacrol libre en la superficie de la suspensión de las NPs.

El porcentaje de eficiencia de encapsulación obtenido fue del  $91.76 \pm 0.27$  % ( $n=3, \bar{x} \pm \sigma$ ) lo que indica que el 91.76 % del carvacrol añadido a la formulación logró ser encapsulado en las NPs. La eficiencia fue muy alta debido a que el método de nanoprecipitación es utilizado para incorporar este tipo de moléculas lipofílicas. (Magenheim, M., 1993). Kumari, A. y colaboradores (2010) encapsularon quercetina, el cual es una molécula natural con propiedades fisicoquímicas semejantes al carvacrol, en poli-D,L-láctido, reportando un porcentaje de eficiencia de encapsulación del 96.7%. (Kumari, A., 2010).

El porcentaje de encapsulación indica las partes de la molécula activa incorporadas por cada 100 partes de NPs. En la tabla III.3 se observa el porcentaje de encapsulación obtenido de  $50.85 \pm 2.40$  ( $n=3, \bar{x} \pm \sigma$ ), lo que nos indica que aproximadamente el 51 % de la NPs está formada por carvacrol y el resto corresponde a la poli  $\epsilon$ -caprolactona. Este resultado, se considera adecuado, sobre todo si se toma en cuenta que el porcentaje de la eficiencia de encapsulación fue muy elevado.

#### IV.2 Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID)

Para cuantificar el carvacrol presente en la pastilla formada a partir de NPs y en las cintas adhesivas aplicadas en la técnica de *tape stripping*, se desarrollo y validó un método por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID, por sus siglas en inglés) por inyección directa.

Inicialmente, se trabajó con un programa de temperatura previamente establecido por Rodríguez-Lafuente, descrito en la tabla II.1, programa de temperatura 1 (Rodríguez-Lafuente & al, 2009) y, como puede observarse en el cromatograma de la figura III.3, el tiempo de retención del carvacrol es de 20.3 min. Con la finalidad de disminuir el tiempo de análisis, se plantearon las modificaciones pertinentes (tabla II.1), se analizaron los cromatogramas y se determinó que el programa de temperatura 6 permitió disminuir el tiempo total de la corrida de 23 minutos (programa de temperatura 1) a 10 minutos. En el cromatograma de la figura III.4 se observa que, con el programa de temperatura 6, el tiempo de retención del carvacrol fue de 5.23 minutos.

Una vez establecido el programa de temperatura óptimo, se seleccionó el estándar interno. De acuerdo al cromatograma de la figura III.5, se estableció que el mentol se utilizaría como estándar interno. En el cromatograma de la figura III.6 se pudo observar una correcta separación del carvacrol y el mentol, además se puede apreciar que los picos aparecieron con tiempos de retención diferentes entre ellos y no solapados. Por lo tanto el programa 6 nos permitió obtener un cromatograma de carvacrol y mentol con excelente resolución.

Con el propósito de validar el método cromatográfico desarrollado para cuantificar el carvacrol por inyección directa, los parámetros evaluados fueron: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

En la tabla III.5, se observa que, en el caso de la linealidad para el carvacrol, el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) fue de 0.9986. El estadístico  $t$  aplicado (ecuación 3) al coeficiente de correlación de la curva de calibración sugiere que el método presenta linealidad. Para la precisión se calculó el % DER de los factores de respuesta de la relación del carvacrol/mentol, se obtuvo un valor menor al 2.5%. Este valor es aceptable de acuerdo a Batista-Carmona, 2003 (< 3%) (Tabla II.6). Para la exactitud se calculó del % de recuperación de muestras de carvacrol (método de adición de estándar), se obtuvo un valor de 98.18%. Además, la exactitud también se expresó como el coeficiente de correlación de la curva obtenida al graficar la concentración calculada de los estándares en función de los valores reales de concentración de dichos estándares. Se obtuvo un resultado por arriba de 0.99. Los límites de detección y cuantificación del sistema fueron de 3.8  $\mu\text{g/mL}$  y 9.9  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

### IV.3 Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por *headspace*

Para cuantificar el carvacrol presente en la suspensión de NPs y en la solución receptora de los estudios *in vitro* de permeación transdérmica, se desarrollo y validó un método por cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por *headspace* (HP-SPME, por sus siglas en inglés).

La modalidad de SPME por *headspace*, se seleccionó considerando las ventajas de esta técnica en términos de selectividad, debido a que solo los compuestos volátiles o semivolátiles pueden ser liberados de la matriz a la fase gaseosa (Pawloszyn, 1997). Se seleccionó la fibra de poliacrilato de 85  $\mu\text{m}$  de espesor, en base a lo propuesto por Rodríguez-Lafuente (Rodríguez-Lafuente & al, 2009).

Con la finalidad de establecer las mejores condiciones de extracción del carvacrol, se probaron diferentes tiempos. En la figura III.8 se observa que conforme aumenta el tiempo de extracción del carvacrol mayor será su factor de respuesta. Este comportamiento coincide con datos de la literatura (Pawloszyn, 1997), donde se menciona que entre las variables más importantes que influyen en los procesos de extracción por SPME, se encuentra el tiempo de extracción. Sin embargo, buscando mantener el tiempo de extracción corto, se seleccionó un tiempo de 10 min., también se consideró que con este tiempo se logró obtener respuestas con suficiente señal, repetible y precisa.

Con el propósito de validar el método cromatográfico desarrollado para cuantificar el carvacrol con HP-SPME, los parámetros evaluados fueron: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

En la tabla III.6, se observa que, en el caso de la linealidad para el carvacrol, el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) fue de 0.9991. El estadístico  $t$  aplicado (ecuación 3) al coeficiente de correlación de la curva de calibración sugiere que el método presenta linealidad. Para la precisión se calculó el % DER de los factores respuesta de la relación del carvacrol/mentol, se obtuvo un valor menor al 8%. Este valor es aceptable de acuerdo a Castellanos-Molina, 2007, (<15%) (Tabla II.6). Para la exactitud se calculó del % de recuperación de muestras de carvacrol (método de adición de estándar), se obtuvo un valor de 107.7%. Además, la exactitud también se expresó como el coeficiente de correlación de la curva obtenida al graficar la concentración calculada de los estándares en función de los valores reales de concentración de dichos estándares. Se obtuvo un resultado por arriba de 0.99. Los límites de detección y cuantificación del sistema fueron de 0.07  $\mu\text{g/mL}$  y 0.18  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

#### IV.4 Ensayos biológicos con la piel de cerdo

Los ensayos biológicos se realizaron con piel de cerdo, en base a investigaciones que demuestran que la absorción percutánea de moléculas activas en la piel de cerdo es similar a la del humano (Sekkat, Kalia, & Guy, 2001).

##### Estudios *in vitro* de permeación transdérmica

La absorción de moléculas activas en piel es determinada por sus propiedades físico-químicas, en particular, la lipofilidad y el peso molecular juegan el papel más importante en el proceso de permeación transdérmica (Marti-Mestres, Mestres, Bres, Martin, Ramos, & Vian, 2007).

Con la finalidad de comparar la permeación transdérmica del carvacrol encapsulado y libre, se preparó una emulsión con la misma cantidad de carvacrol que en las NPs (1.5 mg/mL). Previo a su utilización en los estudios de permeación transdérmica, se determinó su estabilidad observando a simple vista la homogeneidad de la fase. Después de 10 días se observó una separación de fases (figura III.13). Por lo tanto, la emulsión con carvacrol libre fue estable durante 10 días.

En los estudios de permeación transdérmica, la suspensión de NPs cargadas con carvacrol y la emulsión con carvacrol libre, se aplicaron en la superficie de la piel durante 3 horas. Después de este tiempo, la solución receptora se recuperó y se sometió a HS-SPME para cuantificar la cantidad de carvacrol que haya sido capaz de atravesar la piel. En ninguna de las muestras analizadas se obtuvo una respuesta cromatográfica por arriba de los límites de detección del carvacrol. Por lo tanto, se puede concluir que el carvacrol no pasa a través de la piel si no que se encuentra en los estratos más externos de la piel. Resultados similares se han reportado en literatura; por ejemplo Álvarez-Román, R y colaboradores (2004) realizaron ensayos de permeación transdérmica con octil metoxicinamato (OMC) encapsulado en poli  $\epsilon$ -caprolactona y tampoco detectaron una señal cromatográfica atribuida al OMC en las soluciones receptoras (Álvarez-Román, R., Naik, Y., Guy, R. H., 2004).

##### Técnica de *Tape stripping*

La técnica de *tape stripping* consiste en la remoción secuencial de capas microscópicas (0.5-1  $\mu\text{m}$ ) del estrato córneo utilizando fragmentos de cinta adhesiva (Alberti & Kalia, 2000). Esta técnica es un enfoque reciente para determinar el grado de penetración de compuestos en las diferentes capas del estrato córneo.

Con el propósito de obtener una remoción homogénea de las capas que componen al estrato córneo, la técnica de *tape stripping* fue estandarizada utilizando 15 cintas adhesivas. En la gráfica de la figura III.10 se aprecia que a medida que se aplicaron las cintas adhesivas en la superficie de la piel, se llegó a una mayor profundidad del estrato córneo. Asimismo, se puede observar que la

aplicación de 15 cintas adhesivas permitió la remoción del estrato córneo a una profundidad de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ ., los cuales corresponden al espesor total del estrato córneo de la piel de cerdo (Sekkata, N, Kalia, Y. N., Guy, R. H., 2001).

Después de los experimentos de permeación transdérmica con las NPs cargadas con carvacrol y la emulsión con carvacrol libre, la piel fue recuperada para la aplicación de la técnica de *tape stripping* y determinar así el grado de penetración del carvacrol en el estrato córneo. El carvacrol presente en cada cinta se extrajo con metanol y se cuantificó por CG con inyección directa. En la gráfica de la figura III.11 se observa la cantidad de carvacrol ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de piel) presente en el estrato córneo a una profundidad acumulada. Se puede observar que con las dos formulaciones, la mayor cantidad de carvacrol se localizó en las primeras capas del estrato córneo (aproximadamente a 2  $\mu\text{m}$  de profundidad acumulada). De igual forma, se puede observar que el grado de penetración del carvacrol en el estrato córneo con las NPs cargadas con carvacrol, fue el mismo que con la emulsión de carvacrol libre.

La grafica en la figura III.12 muestra la cantidad acumulada de carvacrol presente en el estrato córneo a una profundidad normalizada. La normalización de los valores obtenidos fue necesaria, debido a que en cada oreja se llega a una profundidad total de estrato córneo variable. Esta estrategia permite que los resultados impares puedan ser racionalizados facilitando su análisis. La normalización se obtiene dividiendo cada valor de profundidad de estrato córneo entre la profundidad total alcanzada en cada oreja.

Si bien se observa que el nivel de penetración del carvacrol en el estrato córneo fue el mismo a partir de las NPs y la emulsión, se debe considerar que el empleo de las NPs como acarreadores de carvacrol podría ser una excelente estrategia para aumentar la residencia del carvacrol en piel debido a su importante acumulación en los folículos pilosos y en los pliegues de la piel para su posterior liberación.

Cabe mencionar que, las NPs ofrecen una mayor protección a la degradación química del carvacrol, con respecto a la emulsión. La encapsulación del carvacrol en NPs mejoraría significativamente su estabilidad física y muy probablemente también su estabilidad química debido a la capa de polímero que recubre al carvacrol. Lee, J. Y. & colaboradores (2002) reportaron que las NPs incrementan la estabilidad antioxidante de moléculas altamente lipofílicas como la coenzima  $\text{Q}_{10}$  (Kwon, S. S. & colaboradores, 2002).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

La técnica de naoprecipitación permitió obtener NPs cargadas con carvacrol con un diámetro de  $180 \pm 3$  nm, con un porcentaje de encapsulación del  $50.85 \% \pm 2.40$ , porcentaje de eficiencia de encapsulación de  $91.76 \% \pm 0.27$  y una estabilidad superior a los cinco meses.

Se demostró que un incremento en la cantidad de polímero y de carvacrol en la fase orgánica indujo un aumento en el diámetro de las NPs.

Se desarrolló y validó un método analítico de cromatografía de gases por inyección directa que permitió obtener una respuesta lineal, precisa y exacta del carvacrol en NPs y cintas adhesivas aplicadas en la técnica de *tape stripping*.

Se desarrolló y validó un procedimiento de CG con SPME innovador para la determinación directa del carvacrol en la suspensión de NP y en los estudios *in vitro* de permeación transdérmica con piel de cerdo.

Se determinó que el carvacrol no pasa a través de la piel de cerdo después de 3 horas de contacto con la suspensión de NPs y con la emulsión.

El grado de penetración del carvacrol en el estrato córneo después de 3 horas de aplicación de las NPs con carvacrol en la superficie de la piel fue el mismo que con la emulsión con carvacrol libre.

## CAPÍTULO VI

### PERSPECTIVAS

Realizar ensayos *in vitro* de permeación transdérmica con tiempos más prolongados.

Realizar ensayos de remanencia de carvacrol en piel durante la permeación transdérmica.

Evaluar la actividad antioxidante del carvacrol en NPs mediante bioensayos durante las diferentes etapas de proceso: posterior a nanoprecipitación, durante el tiempo de estabilidad de las NPs y posterior a los ensayos de permeación transdérmica.

Determinar el perfil de liberación del carvacrol a partir de las NPs.

Mejorar la funcionalidad de las NPs, modificando la composición polimérica para controlar la velocidad de liberación del carvacrol.

Encapsular otros terpenos y/o aceites esenciales con diferentes actividades biológicas para su posterior aplicación como sistemas terapéuticos.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberti, I., & Kalia, Y. G. (2000). In vivo skin sampling methods for the assessment of the local bioavailability/bioequivalence of topical dermatological formulations. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy* .
2. Alberti, I., Kalia, Y., & Guy, R. (2000). In vivo skin sampling methods for the assessment of the local bioavailability/bioequivalence of topical dermatological formulations. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy* .
3. Álvarez-Román, R. (2000). *Diseño, elaboración y evaluación de un parche transdérmico a partir de una dispersión polimérica coloidal de tamaño nanométrico formada por la técnica de emulsificación difusión*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
4. Álvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y., Guy, R., Fessi, H. (2004). Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 53-62.
5. Álvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y., Guy, R., Fessi, H. (2004). Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 1818-1825.
6. Arbós, P., & al. (2002). Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* , 129-136.
7. Aulton, M. E. (2004). *Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. España: Elsevier.
8. Baadsgaard, O. (1991). In vivo ultraviolet irradiation of human skin results in profound perturbation of the immune system. *Arch Dermatol* , 99-109.
9. Batista-Carmona, A. (2003). Validación de la técnica analítica para la determinación de aceite volátil en la tintura de jengibre al 50%. *Revista Cubana, Plant Med*.
10. Bharali, D., Marianne, K., & Gurbuz, M. (2009). Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers. *International Journal of Nanomedicine*, 1-7.
11. Calleja, I., Blanco-Príeto, M., & al. (2004). High-performance liquid-chromatographic determination of rifampicin in plasma and tissues. *Journal of Chromatography*. 289-294.
12. Cardinal, F., (2007). Les cas de cancers de la peau exploseront d'ici 2015, *La Presse*,

13. Castellanos-Molina, F. (2007). Biotransformación de limoneno, a-pineno y aceites esenciales de naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger*. *Cenivam*.
14. Castellanos-Molina, F. (2007). Biotransformación de limoneno, a-pineno y aceites esenciales de naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger*. *Cenivam*.
15. Castellanos-Molina, F. E. (2007). Biotransformación de limoneno,  $\alpha$ -pineno y aceites esenciales de naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger*. *Universidad Industrial de Santander*.
16. Contreras Ramírez, J., & al. (2007). Estudio preliminar de la síntesis secuencial y caracterización de terpolímeros abc basados en isopreno, estireno y e-caprolactona. *Revista Iationamericana de metalurgia y materiales*, 41-51.
17. Esposito, E., & al. (2002). Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *Int. J. Pharm*, 329-334.
18. Fang, J.-Y., Lee, W.-R., & al. (2006). Effect of liposome encapsulation of tea catechins on their accumulation in basal cell carcinomas. *Elsevier*, 101-109.
19. Fessi, H., & al. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. Journal of Pharmacology*, R1-R4.
20. Galindo-Rodríguez, S. A., & et. (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*.
21. Ghouchi-Eskandar, N., Simovic, S., Prestidge, C.A. (2009). Nanoparticles coated submicron emulsions: sustained in vitro release and improved dermal delivery of all-trans-retinol. *Phar.Res*, 1764-1775.
22. Gutierrez, R. M. (2003). Cáncer de piel. *Rev Fac Med UNAM*, 166-171.
23. <http://www.inti.gov.ar/hilo/h8/h8-2.php>
24. ICH. (1996). Validation of analytical procedures: methodology topic Q2B. Note for guidance on validation of analytical procedures. *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit*.
25. ICH. (1996). Validation of analytical procedures: methodology topic Q2B. Note for guidance on validation of analytical procedures. *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit*.
26. Industrial, I. N. (2006). *Estudios in vitro de permeación transdérmica*. Argentina: Química Informa.
27. Jordán-Bueso, M. J. (1999). Constituyentes aromáticos del zumo de naranja. Efecto del procesado industrial. *Universidad de Murcia*.

28. Kalia, Y. N., Pirot, F., Guy, R. H. (1996). Homogeneous transport in a heterogeneous membrane water diffusion across stratum corneum *in vivo*. *J. Biophys.* 2692-2700.
29. Kolb, B., & Ettre, L. (2006). *Static Headspace-Gas Chromatography*. Estados Unidos de América: John Wiley & Sons, Inc.
30. Konigsberg Fainstein, M. (2008). *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. México: El manual moderno.
31. Kosar, M., Demirci, B., & al. (2008). Effect of maturation on the composition and biological activity of the essential oil of a commercially important *Satureja* species from Turkey: *Satureja cuneifolia* Ten. (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2260-2265.
32. Kumari, A., Yadav, S., Pakade, Y., Kumar, V., & Singh, B. (2010). Nanoencapsulation and characterization of *Albizia chinensis* isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Elsevier*, 224-232.
33. Kumari, A., & al. (2010). Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 184-192.
34. Kwon, S. S., Nam, Y. S., Lee, J. S., Ku, B. S., Han, S. H., Lee, J. Y., & Chang, I. S. (2002) Preparation and characterization of coenzyme Q<sub>10</sub>-loaded PMMA nanoparticles by a new emulsification process based on microfluidization. *Colloids Surfaces A: Physicochem.* 95-104.
35. Landmann L. (1988). The epidermal permeability barrier. *Anat. Embryol. Berl.* 1-13.
36. Leeson, T., Leeson, R., & Paparo, A. (1990). *Texto/Atlas de Histología*. México: Nueva Editorial Interamericana, S.A de C.V.
37. Llabot, J. M., & al. (2008). Nanopartículas poliméricas sólidas. *Farmacotecnia*, 40-47.
38. Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales*. Perú: Fondo editorial de la pontificia universidad católica del Perú.
39. Magenheimer, B., Levy, M., Benita, S., (1993). A new *in vitro* techniques for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers-ultrafiltration techniques at low pressure. *Int. J. Pharma.* 115-123.
40. Malignas, R. H. (2001). *Compendio de cáncer*. México: Secretaría de Salud.
41. Martínez, H. (2005). I. El primer consensio nacional de expertos en melanoma. 11-13.
42. Miller, J., & Miller, J. (1993). *Estadística para Química Analítica*. E.U.A.: Iberoamericana.
43. Miller, J., & Miller, J. (1993). *Estadística para Química Analítica*. E.U.A.: Iberoamericana.

44. Molia, M. (1995). Los clorofluorocarbonos y el ozono estratosférico, un problema global. *Jornada, UNAM*. México.
45. Montoya, G., & al. (2007). Monoterpenos aromáticos timol y carvacrol: aproximaciones de su posible papel en procesos claves de la patología cardiovascular. *Scientia Et Technica* , 27-32.
46. Morales, C. (2009). Benzocaine loaded biodegradable poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. *Mater.Sci. Eng. B* (in press).
47. Nagarajan, R. (2008). Nanoparticles: building blocks for nanotechnology. *American Chemical Society*, 2-14.
48. Nair, Hareesh, & al. (2010). Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 1-11.
49. Nylander-Frech, L. A. (2000). A tape-stripping method for measuring dermal exposure to multifunctional acrylates. *Annals of Occupational Hygiene*. 645-651.
50. Pawliszyn, J. (1997). *Solid phase microextraction*. Ontario, Canadá: Wiley-Vich.
51. Pople, P.V., Singh, K.K. (2006). Development and evaluation of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. *AAPS PharmSciTech*; E1-E7.
52. Potts R.O., Francoeur M.L. (1991) The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J.Invest. Dermatol*. 495-499.
53. Quattrocchi, O. A. (1992). *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica*. Argentina: Artes Gráficas Farro SA.
54. Quattrocchi, O. A. (1992). *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica*. Argentina: Artes Gráficas Farro SA.
55. *Real farmacopea española*. (2002). España.
56. Rodríguez Orjales, I. (1998). Agentes promotores de la permeación cutánea. *Revista cubana de farmacia* .
57. Rodríguez-Lafuente, A., & al. (2009). Determination of fifteen active compounds released from paraffin-based active packaging in tomato samples via microextraction techniques. *Anal Bioanal Chem* , 203-211.
58. Sáez, V., & al. (2004). Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros* , 87-101.
59. Sekkat, N. G. (2001). Biological models to study skin permeation. *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research* .

60. Sekkat, N., Kalia, Y. N., Guy, R. H. (2001). A biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. *J. Pharm. Sci.*
61. Stone, W., & Smith, M. (2004). Therapeutic uses of antioxidant liposomes. *Mol. Biotechnol*, 217-230.
62. Stryker, J. E., & Solky, B. (2005). A content analysis of news coverage of skin cancer prevention and detection, 1979 to 2003. *Arch Dermatol* , 491-496.
63. Thibodeau, G., Patton, K., & Karen, H. (2007). *Estructura y función del cuerpo humano*. España: Elsevier.
64. Ultee, A., M., B., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *American Society for Microbiology* , 1561-1568.
65. Velázquez Dávila, L.A., & al. (2009). Encapsulación de clotrimazol en nanopartículas poliméricas por la técnica de nanoprecipitación. *Revista de Salud Pública y Nutrición*.
66. Venkat Ratnam, D., Ankola, D., Bhardwaj, D., & al, e. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Elsevier* , 189-207.
67. Vila Jato, J. L. (2009). Introducción a las nanopartículas. *Real Academia Nacional de Farmacia* , 9-37.
68. Villafuente, L., & al. (2008). Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana dde Ciencias Farmacéuticas*, 38-52.
69. Wu, X., Price, G., Guy, R. (2009). Disposition of nanoparticles and an associated lipophilic permeant following topical application to the skin. *Molecular Pharmaceutics*. 1441-1448.
70. Xie, J., Wang, Ch. (2004). Paclitaxel-loaded biodegradable nanoparticles developed by direct dialysis and electrohydrodynamic atomization methods. *AIChE Annual Meeting*.
71. Xu, J., & al. (2007). Inhibitory efficacy of Intravitreal dexamethasone acetate-loaded PLGA nanoparticles on chorioidal neovascularization in a laser-induced rat model. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*.
72. Zeta-Meter, Inc. Potencial Zeta: un curso completo en 5 minutos.

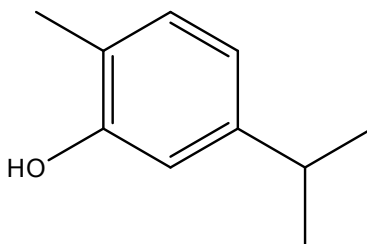
## ANEXOS

### ANEXO A

#### Estructuras químicas y generalidades de los materiales utilizados

##### A.1. CARVACROL

- Estructura



- Nombre químico: 5-isopril-2-metilfenol
- Nombre común :Carvacrol; cimofenol;
- Propiedades físicas y químicas

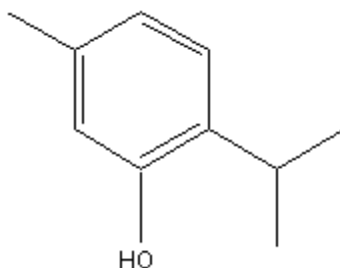
Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
Peso molecular	150.217 g/mol
Aspecto	Líquido
Olor	Especiado, característico del orégano
Color	Incoloro-Amarillento
Densidad relativa	0.9772 g/cm <sup>3</sup>
Punto de fusión	1 °C
Punto de ebullición	237.7 °C
Punto de autoinflamación	85 °C
Log P	3.4
Índice de refracción	1.52295
Solubilidad	Metanol, etanol, dietil éter, tetracloruro de carbono, acetona
Volatilidad	Alta 2.5 hPa a 25°C

- Usos: fabricación de bases aromáticas y como conservador de alimentos.

## MENTOL

### Identificación

- Estructura



- Nombre químico: 5-metil-2-isopropil ciclohexa-1-ol
- Nombre común: Mentol; L-mentol
- Propiedades físicas y químicas

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O
Peso molecular	156.26 g/mol
Aspecto	Cristales pequeños
Olor	Menta
Color	Blanco-incoloro
Densidad relativa	0.00089 g/cm <sup>3</sup>
Punto de fusión	37 °C
Punto de ebullición	485 °C
Punto de autoinflamación	90 °C
Log P	3.2
Solubilidad	Metanol, etanol, acetona
Volatilidad	Alta

- Aplicación

Materia prima destinada principalmente al uso industrial, como ingrediente para la fabricación de bases aromáticas.

## POLI $\epsilon$ -CAPROLACTONA

### Identificación

- Estructura



- Nombre común: Poli  $\epsilon$ -caprolactona, caprolactona
- Propiedades físicas y químicas

Propiedad	Valor
Peso molecular	14 000 g/mol
Aspecto	Perlas
Color	Blanco
Punto de fusión	58-63 °C
Solubilidad	Acetona

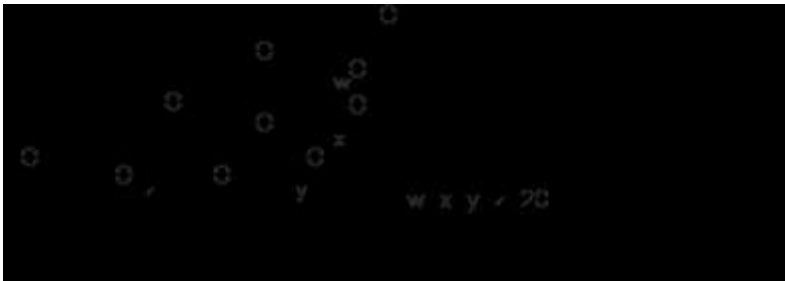
- Aplicación

Polímero biodegradable utilizado para formulaciones farmacéuticas

## TWEEN 80®

### Identificación

- Estructura



- Nombre común: Polisorbato 80;
- Nombre químico: Polioxietilen sorbitano monooleatano
- Propiedades físicas y químicas

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	$C_{64}H_{124}O_{26}$
Peso molecular	1310 g/mol
Aspecto	Líquido
Olor	Característico
Color	Ámbar amarillo
Densidad relativa	$>1 \text{ g/cm}^3$
Punto de ebullición	100 °C
Solubilidad	Agua

- Aplicación

Materia prima destinada principalmente al uso industrial, como agente solubilizador y estabilizante de fármacos coloidales.

## ANEXO B

### Curvas de calibración

B.1. Curva de calibración de la cuantificación del carvacrol por el método de cromatografía de gases con inyección directa.

**Tabla B.5. Datos de la curva de calibración del método de cromatografía de gases por inyección directa.**

[ ] Carv ( $\mu\text{g/mL}$ )	[ ] Ment ( $\mu\text{g/mL}$ )	[ ]carv/ [ ]ment	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
			Área de pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área de pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/ Área pico ment	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/ Área pico ment	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/ Área pico ment
5	12.5	0.4	799.39	1962.96	0.4072	721.28	1690.37	0.4267	935.23	2227.91	0.4198
12.5	12.5	1	1728.95	1795.22	0.9631	1505.44	1632.29	0.9223	1645.58	1753.89	0.9382
25	12.5	2	4752.29	2358.78	2.0147	3515.96	1736.34	2.0249	3537.41	1764.23	2.0051
50	12.5	4	4271.68	1072.69	3.9822	4036.76	993.43	4.0635	10933.61	2858.54	3.8249
100	12.5	8	12028.88	1609.47	7.4738	6850.22	907.75	7.5464	10836.6	1460.95	7.4175
200	12.5	16	14032.72	895.37	15.6725	13030.44	805.79	16.1710	17520.94	1064.87	16.4536

B.2. Curva de calibración de la cuantificación del carvacrol por el método de cromatografía de gases con HS-SPME.

**Tabla B.6. Datos de la curva de calibración del método de cromatografía de gases por HS-SPME**

[ ] Carv ( $\mu\text{g/mL}$ )	[ ] Ment ( $\mu\text{g/mL}$ )	[ ]carv/ [ ]ment	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
			Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/ Área pico ment	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/ Área pico ment	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/ Área pico ment
0.1	0.5	0.2	2376.41	16946.57	0.1402	2811.81	18246.52	0.1541	2654.79	17014.31	0.1560
0.5	0.5	1	12356.72	17133.54	0.7212	12636.85	17584.97	0.7186	12770.83	17639.16	0.7240
1	0.5	2	21765.57	16934.23	1.2853	23252.81	16344.36	1.4227	19661.38	14349.81	1.3701
1.5	0.5	3	34335.08	17411.41	1.9720	36895.84	17314.04	2.1310	38284.73	16682.71	2.2949
2.5	0.5	5	50741.45	13848.93	3.6639	61140.53	17875.91	3.4203	63533.11	17146.36	3.7053

## ANEXO C

### Validación de los métodos analíticos

**Linealidad.** Se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. La evaluación se realiza mediante una regresión lineal, coeficiente de correlación (R), coeficiente de determinación ( $R^2$ ) ó un test estadístico en el cual se calcula un valor de  $t_r$  con  $n-2$  grados de libertad y se compara con el valor  $t$  tabulado para el nivel de confianza requerido (Quattrocchi, 1992). Experimentalmente lo podemos obtener al analizar la curva de calibración de por lo menos 5 niveles de concentraciones diferentes, realizadas por triplicado (Ecuación 3).

**Precisión.** Es la capacidad de un instrumento de dar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones. Está relacionada con la dispersión de las medias alrededor de su valor medio o central. La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, desviación estándar relativa (DER) ó coeficiente de variación (CV) (Quattrocchi, 1992). La precisión del sistema se determina experimentalmente utilizando 5 niveles de concentración en el rango esperado y realizándolo por triplicado (Ecuación 4).

**Exactitud.** Representa la cualidad de concordancia entre un valor determinado y el valor real o convencionalmente verdadero. Se evalúan por comparación con los valores de referencia de un material caracterizado (adición de estándar). Quattrocchi reporta, en su libro Introducción a la HPLC, que se puede obtener el % de recuperación mediante la utilización de la fórmula de mostrada en la ecuación 5. Si bien el valor promedio de concentración no se conoce sino que sólo puede estimarse, es posible obtener la concentración de la muestra por cálculo con la ecuación de la recta obtenida por adición de estándar (Quattrocchi, 1992). El valor real de la concentración de la muestra es posible estimarse al conocer la cantidad de muestra que se adicionó a los estándares. La recuperación del analito debe acercarse al 100%.

**Límite de Detección (LDD).** Se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado, pero no necesariamente cuantificable de manera exacta. Se expresa en unidades de concentración. Su determinación puede efectuarse mediante la curva de calibración (Miller & Miller, 1993) (Ecuación 6 y 7).

**Límite de Cuantificación (LDC).** Es la mínima concentración de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud, es reportada en unidades de concentración. Se define como la concentración de analito correspondiente al valor del blanco más 10 desviaciones estándar de la media de blancos. Se puede determinar mediante la curva de calibración (Miller & Miller, 1993) (Ecuación 7 y 8).

### C.1. Método de cromatografía de gases (CG) por inyección directa

#### a) Linealidad

**Tabla C.1. Estadísticas de regresión lineal de la curva de calibración del método de CG por inyección directa.**

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple (R)	0.9989
Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	0.9986
R <sup>2</sup> ajustado	0.9977
Error típico	0.2688
Observaciones	18

El estadístico t calculado aplicando la ecuación 3 es:

$$t_r = 107.1267$$

#### b) Precisión

**Tabla C.2. Desviación estándar relativa (DER) obtenidos de los datos de la curva de calibración del método de CG por inyección directa.**

[ ]carv/ [ ]ment	Área pico carv / Área pico ment	Media	Desviación estándar	DER (%)
0.4	0.4072	0.4179	0.0099	2.3607
0.4	0.4267			
0.4	0.4198			
1	0.9631	0.9412	0.0206	2.1844
1	0.9223			
1	0.9382			
2	2.0147	2.0149	0.0099	0.4927
2	2.0249			
2	2.0051			
4	3.9822	3.9360	0.0967	2.4563
4	4.0009			

4	3.8249			
8	7.4738	7.4792	0.0646	0.8638
8	7.5464			
8	7.4175			
16	15.6725	16.0990	0.3955	2.4565
16	16.1710			
16	16.4536			

c) Exactitud

Curva de calibración con adición de estándar.

Tabla C.3. Curva de calibración por el método con adición de estándar en CG por inyección directa.

Std	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/Área pico ment	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/Área pico ment	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/Área pico ment
1	6475.83	7348.79	0.8812	8853.03	12622.63	0.7014	9980.35	13897.13	0.7182
2	10444.09	12072.23	0.8651	10123.95	12147.14	0.8334	10315.01	10131.97	1.0181
3	12421.62	11337.77	1.0956	10690.41	9149.28	1.1684	15422.97	12878.62	1.1976
4	17645.81	10888.16	1.6206	16155.92	12390.48	1.3039	11950.99	8332.18	1.4343
5	26329.95	13977.8	1.8837	23809.29	13693.79	1.7387	30943.36	17721.42	1.7461

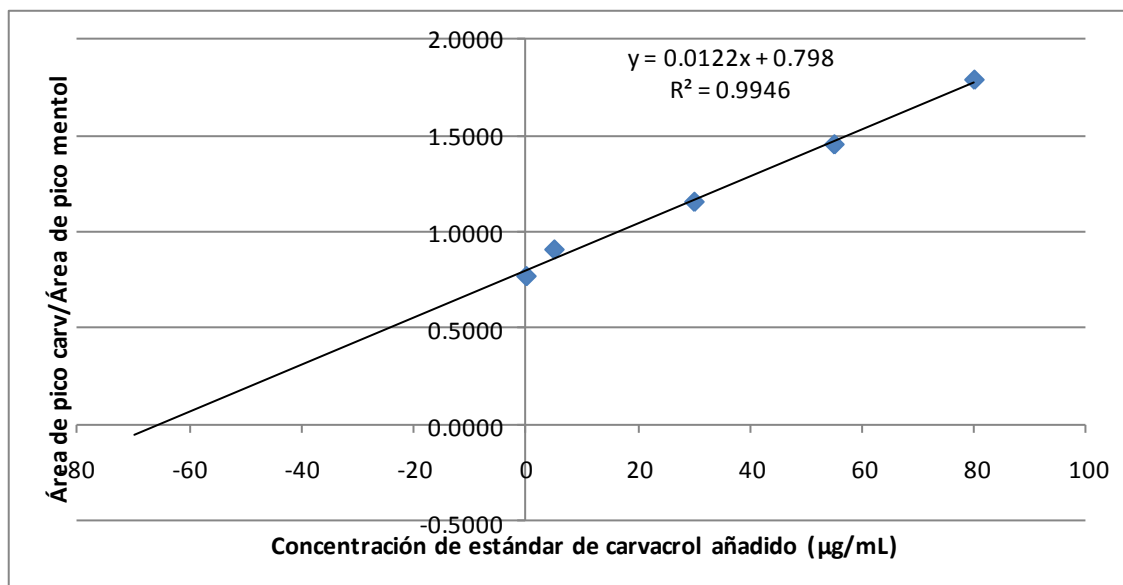


Figura C. 1. Curva de calibración por el método con adición de estándar en CG por inyección directa.

Tabla C.4. Muestra analizada por el procedimiento de estándar interno por inyección directa.

Std	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3			Media	DE	CV (%)	Valor calculado	[ ] Carv (ppm)
	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment					
1	56475.83	8348.79	6.7646	58853.03	12622.63	4.6625	59980.35	13897.13	4.3160	5.2477	1.3250	25.2494	5.3298	66.6224

Tabla C.5. Valores reales y calculados de la concentración de los estándares de carvacrol analizados por la curva de calibración con estándar interno por CG inyección directa.

[ ] real carv (ppm)	área carv/área ment	[ ] calculada carv (ppm)
5	0.4072	0.4148
5	0.4267	0.4343
5	0.4198	0.4274
12.5	0.9631	0.9707
12.5	0.9223	0.9299
12.5	0.9382	0.9458
25	2.0147	2.0223
25	2.0249	2.0325
25	2.0051	2.0127
50	3.9822	3.9898
50	4.0635	4.0710
50	3.8249	3.8325
100	7.4738	7.4814
100	7.5464	7.5540
100	7.4175	7.4251
200	15.6725	15.6801
200	16.1710	16.1786
200	16.4536	16.4612

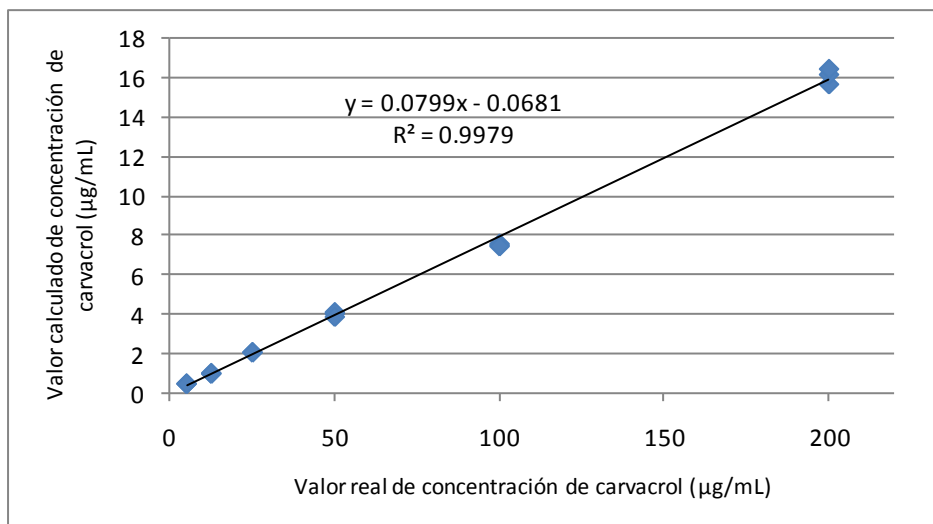


Figura C. 2 Gráfica de valor calculado en función del valor real de la concentración de los estándares de carvacrol utilizados en la curva de calibración con estándar interno analizado por CG con inyección directa.

d) Límite de detección y límite de cuantificación

Tabla C.6. Valores de  $y$  ( $y_i$ ) y pronósticos de  $y$  ( $\hat{y}$ ) de la curva de calibración con estándar interno por CG con inyección directa.

$y_i$	$\hat{y}_i$	$(y-\hat{y})^2$
0.4072	0.3146	0.0086
0.4267	0.3146	0.0126
0.4198	0.3146	0.0111
0.9631	0.9144	0.0024
0.9223	0.9144	0.0001
0.9382	0.9144	0.0006
2.0147	1.9141	0.0101
2.0249	1.9141	0.0123
2.0051	1.9141	0.0083
3.9822	3.9135	0.0047
4.0635	3.9135	0.0225
3.8249	3.9135	0.0078
7.4738	7.9121	0.1921
7.5464	7.9121	0.1338
7.4175	7.9121	0.2447
15.6725	15.9095	0.0562
16.1710	15.9095	0.0684
16.4536	15.9095	0.2960

## C.2. Método de cromatografía de gases por HS-SPME

### a) Linealidad

Tabla C.7. Estadísticas de regresión lineal de la curva de calibración del método de CG por HS-SPME.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple (R)	0.9996
Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	0.9991
R <sup>2</sup> ajustado	0.9987
Error típico	0.0448
Observaciones	15

El estadístico t calculado aplicando la ecuación 3 es:

$$t_r = 121.5075$$

### b) Precisión

Tabla C.8. Desviación estándar relativa (DER) obtenidos de los datos de la curva de calibración del método de CG por HS-SPME.

[ ]carv/[ ]ment	Área pico carv/ Área pico ment	Media	Desviación Estándar	DER (%)
0.2	0.1402	0.1501	0.0086	5.7469
0.2	0.1541			
0.2	0.156			
1	0.7212	0.7213	0.0027	0.3744
1	0.7186			
1	0.724			
2	1.2853	1.3594	0.0693	5.0999
2	1.4227			
2	1.3701			
3	1.972	2.1326	0.1615	7.5707
3	2.131			
3	2.2949			
5	3.6639	3.5965	0.1540	4.2817
5	3.4203			
5	3.7053			

c) Exactitud

Curva de calibración con adición de estándar.

Tabla C.9. Curva de calibración por el método con adición de estándar en CG por HS-SPME.

Std	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/Área pico ment	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/Área pico ment	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico carv/Área pico ment
1	26769.72	19511.81	1.3720	27968.41	20002.23	1.3983	25649.61	19967.09	1.2846
2	52436.80	19964.91	2.6264	51282.05	19174.8	2.6745	49307.27	18649.25	2.6439
3	89775.89	18651.18	4.8134	90313.94	18230.1	4.9541	83944.32	16638.31	5.0452
4	119582.97	17888.76	6.6848	119736.95	17552.34	6.8217	113947.94	17234.13	6.6118
5	144869.27	17248.03	8.3992	165105.86	17225.05	9.5852	140371.32	16429.45	8.5439

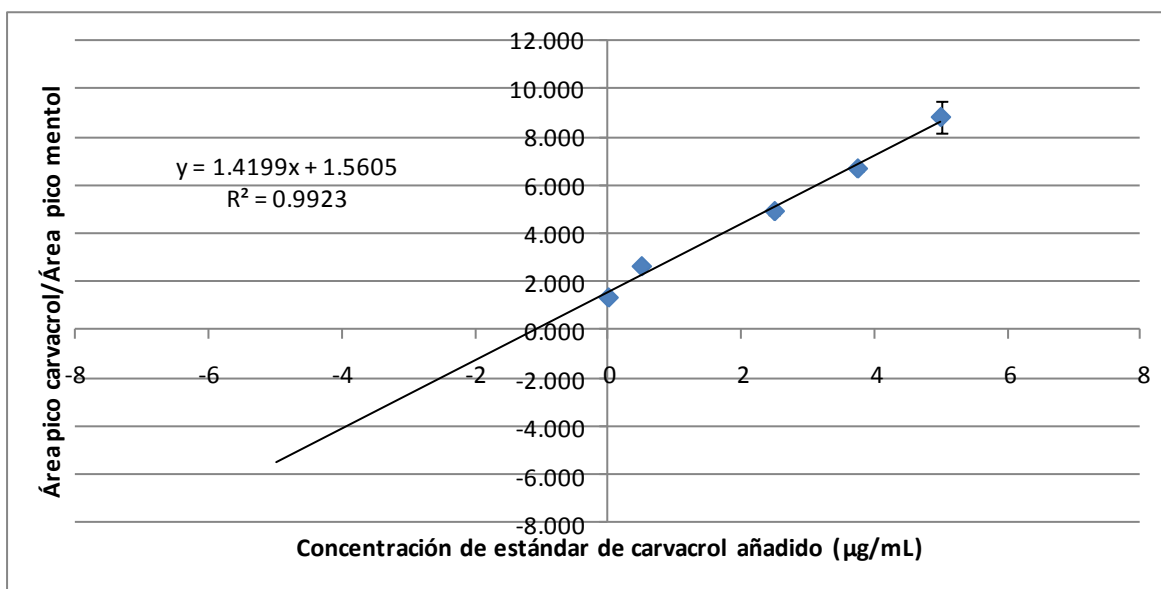


Figura C. 3 Curva de calibración por el método con adición de estándar en CG por HS-SPME.

Tabla C 10. Muestra analizada por el procedimiento de estándar interno por HS-SPME.

Std	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3		Media	DE	CV (%)	Valor calculado	[ ] Carv ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
	Área de pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área de Pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment	Área de pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área de pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment	Área de pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área de pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment						
1	26769.72	18511.81	1.4461	27968.41	19002.23	1.4718	25649.61	17967.09	1.4276	1.449	0.022	1.5346	2.0403	1.0201	

Tabla C.11. Valores reales y calculados de la concentración de los estándares de carvacrol analizados por la curva de calibración con estándar interno por CG HS-SPME.

[ ] real carv (µg/mL)	área carv/ área ment	[ ] calculada carv (µg/mL)
0.1	0.1402	0.1636
0.1	0.1541	0.1775
0.1	0.1560	0.1794
0.5	0.7212	0.7446
0.5	0.7186	0.7420
0.5	0.7240	0.7474
1	1.2853	1.3087
1	1.4227	1.4461
1	1.3701	1.3935
1.5	1.9720	1.9954
1.5	2.1310	2.1544
1.5	2.2949	2.3183
2.5	3.6639	3.6873
2.5	3.4203	3.4437
2.5	3.7053	3.7287

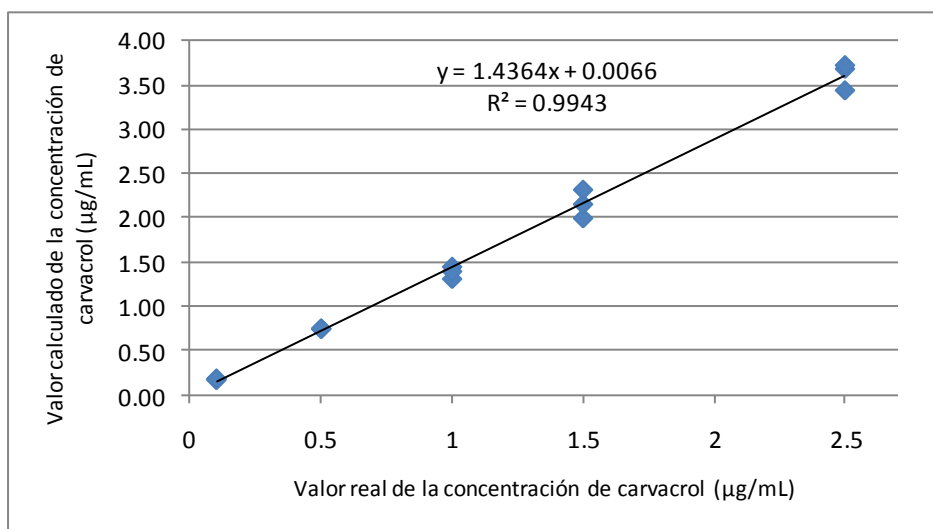


Figura C. 4. Gráfica de valor calculado en función del valor real de la concentración de los estándares de carvacrol utilizados en la curva de calibración con estándar interno analizado por CG HS-SPME.

d) Límite de detección y límite de cuantificación

**Tabla C .12. Valores de  $y$  ( $y_i$ ) y pronósticos de  $y$  ( $\hat{y}$ ) de la curva de calibración con estándar interno por CG con HS-SPME.**

$y_i$	$\hat{y}_i$	$(y-\hat{y})^2$
0.1402	0.12418678	0.0002564
0.1541	0.12418678	0.0008948
0.156	0.12418678	0.0010121
0.7212	0.6993707	0.0004765
0.7186	0.6993707	0.0003698
0.724	0.6993707	0.0006066
1.2853	1.41835061	0.0177025
1.4227	1.41835061	1.892E-05
1.3701	1.41835061	0.0023281
1.972	2.13733051	0.0273342
2.131	2.13733051	4.008E-05
2.2949	2.13733051	0.0248281
3.6639	3.57529033	0.0078517
3.4203	3.57529033	0.024022
3.7053	3.57529033	0.0169025

## ANEXO D

### Porcentaje de recuperación del carvacrol en diferentes matrices

D.1. Porcentaje de recuperación del carvacrol adicionado en una solución de polímero.

Para determinar el efecto de la cantidad de polímero en solución sobre el porcentaje de recuperación del carvacrol adicionado, se realizaron experimentos con diferentes cantidades de polímero manteniendo constante la concentración de carvacrol (50 µg/mL para inyección directa y 2.5 µg/mL para HS-SPME). Las concentraciones de polímero utilizadas en ambos procedimientos se muestran en la tabla D.1.

**Tabla D.1. Cantidad de poli ε-caprolactona utilizada en los experimentos realizados por inyección directa y HS-SPME para determinar la influencia del polímero sobre el % de recuperación del carvacrol.**

Concentración de poli ε-caprolactona en experimentos por inyección directa (µg/mL)	Concentración de poli ε-caprolactona en experimentos por HS-SPME (µg/mL)
0	0
0.5	0.1
0.7	0.3
0.9	0.5
1.5	1.5
3	3
6	9

En los experimentos realizados por inyección directa se le agregó 250 µL de una solución de carvacrol (1000 µg/mL) y 500 µL de una solución de mentol (1000 µg/mL), se llevaron a un volumen total de 5 mL con metanol.

Para los experimentos realizados por HS-SPME se le agregó 300 µL de una solución de carvacrol (50 µg/mL) y 100 µL de una solución de mentol (50 µg/mL), se llevaron a un volumen total de 5 mL con agua Mili-Q. Las muestras se analizaron con los métodos analíticos descritos en la sección II.3 y II.4.

En la figura D.1 y D.2 se muestran los % de recuperación de carvacrol al utilizar diferentes concentraciones de polímero analizados por inyección directa y por HS-SPME respectivamente.

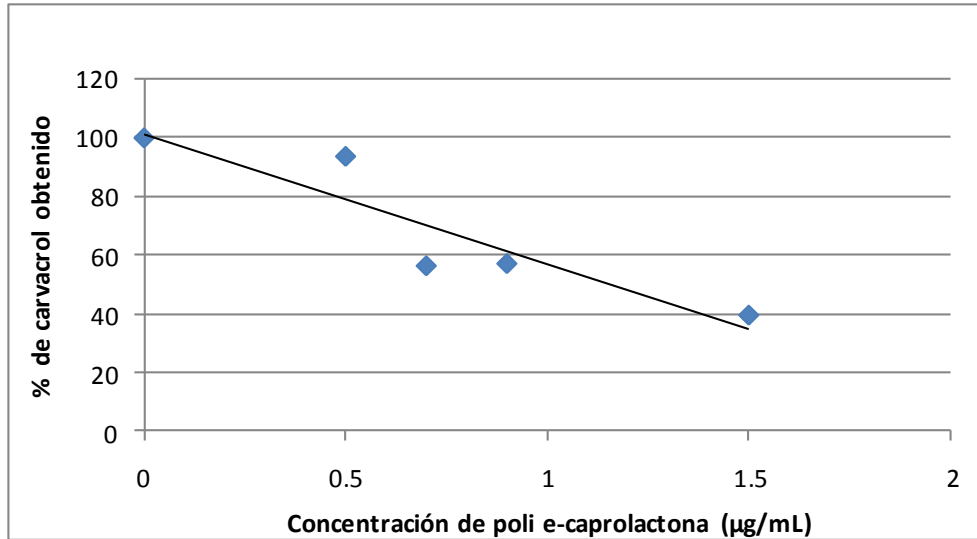


Figura D.2. Efecto de la cantidad de polímero sobre el porcentaje de recuperación de carvacrol analizado con cromatografía de gases por inyección directa.

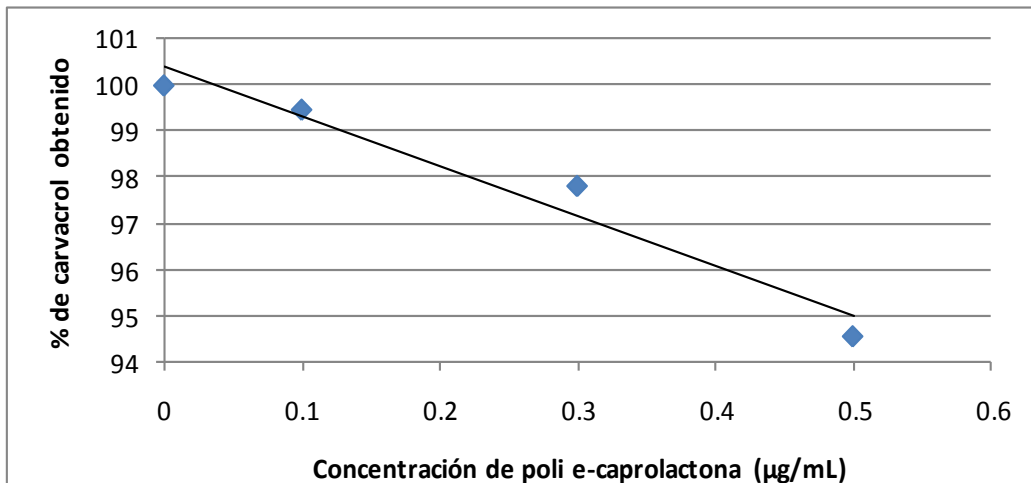


Figura D.2. Efecto de la cantidad de polímero sobre el porcentaje de recuperación de carvacrol analizado con cromatografía de gases por HS-SPME.

En las gráficas de las figuras D.1 y D.2 se observa que a mayor concentración de polímero, menor será el porcentaje de carvacrol recuperado. Este comportamiento puede ser atribuido a una posible adsorción del carvacrol en el polímero.

## D.2. Porcentaje de recuperación del carvacrol adicionado en el sobrenadante de NPs blanco

Para determinar el efecto del polímero en las NPs sobre el porcentaje de recuperación del carvacrol adicionado, se preparó un lote de NPs blanco, con 1.5 mg/mL de poli  $\epsilon$ -caprolactona como se indica en el procedimiento de nanoprecipitación (sección II.2), se sometió a ultracentrifugación a 20,000 rpm durante 2 horas a 4°C para obtener el sobrenadante de las NPs. 10 mL de éste se recuperaron y se les adicionó 300  $\mu$ L de una solución de carvacrol (50  $\mu$ g/mL), se tomaron 7.5 mL de la solución y se le agregó 75  $\mu$ L de mentol (50  $\mu$ g/mL). Se realizó HS-SPME y se cuantificó por CG como está indicado en la sección II.4. Los experimentos se realizaron por quintuplicado. En la tabla D.2 se muestra los resultados obtenidos.

**Tabla D.2. Resultados obtenidos del porcentaje de recuperación del carvacrol adicionado en el sobrenadante de NPs blanco.**

Réplica	Área pico Carv ( $\mu$ V·s)	Área pico Ment ( $\mu$ V·s)	Área carv/Área ment	Rel. de [ ] de la curva de calib	[ ] carv ( $\mu$ g/mL)	% Recup	Media	DE	DER (%)
1	37190.75	18188.42	2.0447	2.8704	1.4352	95.6813	93.5527	2.2107	2.3631
2	35377.41	18189.64	1.9449	2.7314	1.3657	91.0480			
3	36975.09	18012.76	2.0527	2.8815	1.4408	96.0511			
4	37767.94	19187.17	1.9684	2.7641	1.3821	92.1375			
5	37058.12	18681.81	1.9836	2.7854	1.3927	92.8454			

En base a los resultados obtenidos, se calculó que el porcentaje de recuperación del carvacrol adicionado en el sobrenadante de las NP blanco fue de  $93.55 \pm 2.21$

### D.3. Porcentaje de recuperación del carvacrol en NPs

Con la finalidad de conocer el porcentaje de recuperación del carvacrol en la suspensión de NPs, se preparó un lote de NPs, con 1.5 mg/mL de poli  $\epsilon$ -caprolactona y 1.5 mg/mL de carvacrol como se indica en el procedimiento de nanoprecipitación (sección II.2), se realizaron dos diluciones con agua Mili-Q hasta obtener una concentración final de carvacrol de 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , se tomaron 7.5 mL de esta solución, se agregaron 75  $\mu\text{L}$  de una solución de mentol (50  $\mu\text{g/mL}$ ) y se realizó HS-SPME como se indica en la sección II.4. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla D.3.

**Tabla D.3. Análisis de los resultados obtenidos del % de recuperación del carvacrol de NPs cargadas.**

Réplica	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment	Rel. de [ ] de la curva de calib	[ ] carv en muestra ( $\mu\text{g/mL}$ )	[ ] carv total ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de Recup	Media	DE	DER (%)
1	6663.81	2534.92	2.6288	3.6837	1.8418	12892.811	85.9521	84.1365	1.8321	2.1775
2	5899.71	2292.11	2.5739	3.6072	1.8036	12625.346	84.1690			
3	5033.1	2000.41	2.5160	3.5266	1.7633	12343.247	82.2883			

En base a los resultados obtenidos, se calculó que el porcentaje de recuperación del carvacrol total presente en las NPs fue de  $84.14 \pm 1.83$ .

#### D.4 Porcentajes de recuperación del carvacrol libre en las cintas adhesivas con estrato córneo

Con la finalidad de determinar el % de recuperación del carvacrol libre en las cintas adhesivas con estrato córneo, se aplicó la técnica de tape stripping con 3 cintas adhesivas (sección II.6), después de haber realizado la técnica de *tape stripping*, se adicionó 40  $\mu\text{L}$  de una solución de carvacrol a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a cada cinta adhesiva. Después de 10 min., las cintas adhesivas se colocaron en viales con 1 mL de metanol, los cuales se mantuvieron en agitación constante durante 10 minutos. A cada vial se le agregó 0.5 mL de mentol a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La cuantificación se realizó por CG con inyección directa. Los experimentos se realizaron por triplicado.

En la tabla D.4 se muestran los resultados obtenidos del análisis de las cintas adhesivas con estrato córneo y carvacrol libre.

**Tabla D.4. Resultados obtenidos de las cintas adhesivas con estrato córneo y carvacrol libre.**

Cinta Adhesiva	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment	Rel. de [ ] de la curva de calib	[ ] carv ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	% de Recup	Media	DE	DER (%)
1	1845.36	1756.65	1.0505	0.9760	12.1996	91.7266	90.8247	4.9390	5.4380
2	1945.69	1788.4	1.0880	1.0135	12.6683	95.2506			
3	1769.32	1797.55	0.9843	0.9097	11.3711	85.4969			

En base a los resultados obtenidos, se calculó que el porcentaje de recuperación del carvacrol libre en las cintas adhesivas con estrato corneo fue de  $90.82 \pm 4.94$ .

#### D.5 Porcentajes de recuperación del carvacrol en NPs en las cintas adhesivas con estrato córneo

Con la finalidad de determinar el % de recuperación del carvacrol en las NPs en las cintas adhesivas con estrato córneo, se aplicó la técnica de *tape stripping* con 5 cintas adhesivas (sección II.6), después de haber realizado la técnica de *tape stripping*, a cada cinta adhesiva se les adicionó 66 µL de NPs cargadas con carvacrol (1.5 µg/mL). Después de 10 min., las cintas adhesivas se colocaron en viales con 1 mL de metanol, los cuales se mantuvieron en agitación constante durante 10 minutos. A cada vial se le agregó 0.5 mL de mentol a 50 µg/mL. La cuantificación se realizó por CG con inyección directa (liner con relleno de lana). Los experimentos se realizaron por quintuplicado.

En la tabla D.5 se muestran los resultados obtenidos del análisis de las cintas adhesivas con estrato córneo y NPs.

**Tabla D.5. Análisis de los resultados obtenidos de las cintas adhesivas con estrato córneo y carvacrol encapsulado en NPs.**

Cinta Adhesiva	Área pico Carv (µV·s)	Área pico Ment (µV·s)	Área carv/Área ment	Rel. de [ ] de la curva de calib	[ ] carv (µg/mL)	% de Recup	media	SD	CV
1	3902.97	1053.91	3.7033	3.78356409	47.2946	94.5891	87.2719	5.419037	6.2
2	2810.66	865.92	3.2459	3.325556336	41.5695	83.1389			
3	2655.79	840.32	3.1605	3.240038827	40.5005	81.0010			
4	2916.57	851.36	3.4258	3.505684401	43.8211	87.6421			
5	2897.3	823.21	3.5195	3.59953451	44.9942	89.9884			

En base a los resultados obtenidos, se calculó que el porcentaje de recuperación del carvacrol libre en las cintas adhesivas con estrato corneo fue de  $87.27 \pm 5.41$ .

## ANEXO E

### Ensayos previos de permeación transdérmica

Con la finalidad de comprobar la cuantificación del carvacrol por CG-HP-SPME en muestras reales, se realizaron ensayos *in vitro* de permeación transdérmica con carvacrol libre. Dos mL de una solución hidroalcohólica (90:10) de carvacrol (1.5 mg/mL) se colocaron en el compartimento donador de la celda de Franz. Se realizó el procedimiento de permeación como se indica en la sección II.6. El tiempo de contacto de la solución de carvacrol con la piel de cerdo fue de 30, 60 y 120 min. Después del tiempo transcurrido, las soluciones receptoras obtenidas se analizaron con el método de HS-SPME (como se indica en la sección II.4). Cada experimento se realizó por triplicado.

En la tabla E.1 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación del carvacrol en los receptores después del procedimiento de permeación transdérmica.

**Tabla E.1. Resultados obtenidos de la cuantificación del carvacrol por HS-SPME en los receptores posterior a la permeación transdérmica.**

Tiempo (min)	Área carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment	[ ]carv/[ ]ment	[ ] carv ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Media	DE	DER (%)
30	2155.73	3230.12	0.6674	0.9526	0.4763	0.4813	0.0127	2.6327
30	2276.66	3443.83	0.6611	0.9439	0.4719			
30	2497.08	3591.45	0.6953	0.9915	0.4957			
60	1859.08	2235.81	0.8315	1.1811	0.5906	0.6326	0.0527	8.3303
60	2121.05	2171.33	0.9768	1.3835	0.6918			
60	2188.77	2523.22	0.8675	1.2312	0.6156			
120	5832.21	3233.51	1.8037	2.5348	1.2674	1.3691	0.1476	10.7844
120	3891.35	2100.54	1.8525	2.6028	1.3014			
120	4822.14	2198.88	2.1930	3.0769	1.5384			

En la figura E.1 se muestra la gráfica de los resultados de concentración de carvacrol determinada por HS-SPME en muestras reales de permeación transdérmica.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la técnica de CG con HS-SPME desarrollada, optimizada y validada permite la cuantificación del carvacrol en muestras reales de permeación transdérmica.

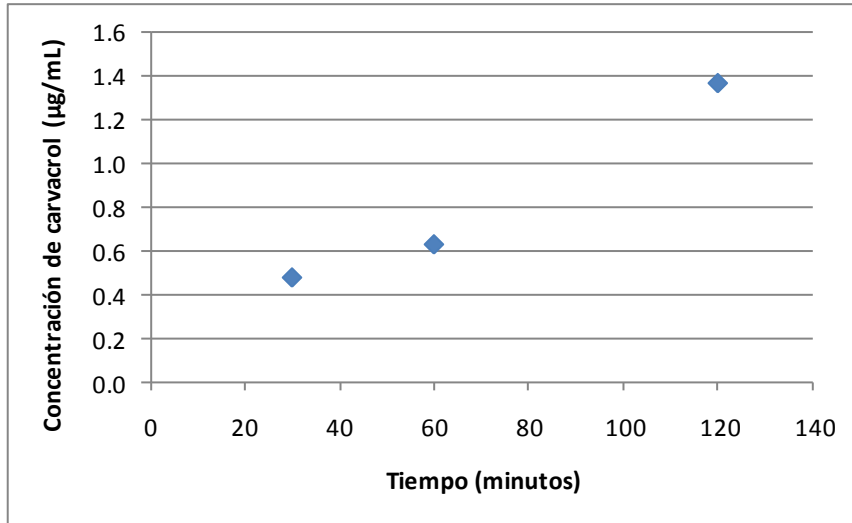


Figura E.1. Gráfica de los resultados obtenidos de la cuantificación del carvacrol por HS-SPME en muestras reales de permeación transdérmica.

## ANEXO F

### Resultados obtenidos en los estudios *in vitro* de permeación transdérmica

Datos con los que se hizo la gráfica de la figura III.13

Permeación con NPs

Tabla F.1. Resultados obtenidos del análisis de las cintas adhesivas después de la permeación por 3 horas con carvacrol en NPs tomando en cuenta la profundidad acumulada.

Celda 1		Celda 2		Celda 3		Celda 4		Celda 5	
( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q
1.2732	4.3978	0.9549	3.3570	1.9099	9.5256	2.5465	0.6909	0.6366	0.6909
1.9099	2.3607	2.5465	5.9818	4.1380	3.7001	3.1831	4.6541	0.9549	6.3138
2.5465	2.5788	3.1831	1.9215	5.4113	3.0197	4.1380	3.9535	2.5465	6.2589
3.1831	4.1060	3.5014	3.0753	6.3662	3.5720	4.4563	1.6291	3.1831	2.1734
3.5014	2.8523	4.1380	2.9097	7.9577	6.7532	4.7746	1.9246	4.1380	5.5402
3.8197	2.2502	5.0929	3.1916	9.2310	2.3398	5.0929	2.3849	4.4563	3.5555
4.7746	2.1075	5.4113	1.9898	10.1859	2.8871	6.0479	1.6329	5.4113	2.6946
5.0929	1.8426	6.3662	7.8881	11.7774	4.1290	8.5943	0.6909	6.0479	1.3962
5.7296	2.8659	6.6845	3.2056	13.0507	4.2829	8.9127	0.6909	6.3662	4.7337
6.0479	1.8553	7.0028	3.4589	13.6873	0.0000	9.5493	3.3439	7.0028	0.6909

Promedio	Promedio	DE	DE
( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q
1.3793	3.7324	0.7666	3.6279
2.3873	6.2545	1.2121	1.6335
3.2892	3.9323	1.2204	1.6865

3.8197	4.3681	1.3505	1.0099
4.5094	4.7645	1.7665	2.0473
5.1460	4.4518	2.1305	0.5905
5.9418	3.5621	2.1822	0.5176
7.2681	4.5537	2.6764	2.9255
8.0108	3.6941	2.9911	1.5750
8.8066	2.8475	3.0976	1.5479

### Permeación con emulsión

**Tabla F.2. Resultados obtenidos del análisis de las cintas adhesivas después de la permeación por 3 horas con carvacrol en emulsión tomando en cuenta la profundidad acumulada.**

Celda 1		Celda 2		Celda 3		Celda 4		Celda 5	
( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q
1.273	5.595	1.592	4.170	1.592	5.165	2.865	4.024	1.592	2.915
2.228	2.810	2.865	3.517	2.546	3.717	4.775	2.940	7.321	2.212
3.501	4.516	3.501	3.793	3.183	2.406	6.048	2.321	7.958	2.633
4.138	3.104	4.138	3.337	3.501	2.504	7.639	1.873	10.186	2.083
4.456	3.717	4.456	3.873	3.820	2.293	9.549	2.282	11.141	1.641
6.048	2.067	5.093	2.848	4.138	1.700	11.141	2.314	13.687	1.818
6.684	2.712	5.730	2.043	4.775	1.792	11.777	2.065	16.552	1.126
7.003	1.475	6.048	1.646	5.093	1.026	12.414	1.991	19.417	0.000
7.321	0.736	6.684	2.276	5.411	1.486	14.324	1.207	20.053	0.000
7.639	0.000	7.321	0.845	7.003	1.291	15.597	0.842	22.282	0.000

Promedio	Promedio	DE	DE
( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Acumulada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q

1.7825	4.3738	0.7968	1.7381
3.9470	3.0394	1.9063	2.9295
4.8383	3.1337	1.8714	7.4297
5.9206	2.5803	2.5912	1.3797
6.6845	2.7612	3.0509	1.2261
8.0214	2.1493	3.7649	0.8346
9.1036	1.9475	4.5001	1.9317
9.9949	1.2276	5.3972	0.7256
10.7588	1.1410	5.6384	3.8267
11.9684	0.5956	6.1352	0.4821

Datos con los que se hizo la gráfica de la figura III.14

Permeación con NPs

**Tabla F.3. Resultados obtenidos del análisis de las cintas adhesivas después de la permeación por 3 horas con carvacrol en NPs tomando en cuenta la profundidad normalizada.**

Celda 1		Celda 2		Celda 3		Celda 4		Celda 5	
( $\mu\text{m}$ ) Profund Normalizada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Normalizada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Normalizada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Normalizada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Normalizada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q
0.2105	4.3978	0.1364	3.3570	0.1395	9.5256	0.2667	0.6909	0.0909	0.6909
0.3158	2.3607	0.3636	5.9818	0.3023	3.7001	0.3333	4.6541	0.1364	6.3138
0.4211	2.5788	0.4545	1.9215	0.3953	3.0197	0.4333	3.9535	0.3636	6.2589
0.5263	4.1060	0.5000	3.0753	0.4651	3.5720	0.4667	1.6291	0.4545	2.1734
0.5789	2.8523	0.5909	2.9097	0.5814	6.7532	0.5000	1.9246	0.5909	5.5402
0.6316	2.2502	0.7273	3.1916	0.6744	2.3398	0.5333	2.3849	0.6364	3.5555
0.7895	2.1075	0.7727	1.9898	0.7442	2.8871	0.6333	1.6329	0.7727	2.6946
0.8421	1.8426	0.9091	7.8881	0.8605	4.1290	0.9000	0.6909	0.8636	1.3962
0.9474	2.8659	0.9545	3.2056	0.9535	4.2829	0.9333	0.6909	0.9091	4.7337
1.0000	1.8553	1.0000	3.4589	1.0000	0.0000	1.0000	3.3439	1.0000	0.6909

Promedio	Promedio	DE	DE
( $\mu\text{m}$ ) Profund Normalizada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Normalizada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q
0.1688	3.7324	0.0695	3.6279
0.2903	4.6021	0.0891	1.6335
0.4136	3.5465	0.0352	1.6865
0.4825	2.9112	0.0298	1.0099
0.5684	3.9960	0.0386	2.0473
0.6406	2.7444	0.0712	0.5905
0.7425	2.2624	0.0632	0.5176
0.8751	3.1894	0.0283	2.9255
0.9396	3.1558	0.0190	1.5750
1.0000	1.8698	0.0000	1.5479

Permeación con emulsión

Tabla F.4. Resultados obtenidos del análisis de las cintas adhesivas después de la permeación por 3 horas con carvacrol en emulsión tomando en cuenta la profundidad normalizada.

Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5					
( $\mu\text{m}$ ) Profund Normalizada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{m}$ ) Profund Normalizada	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q	( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) Q					
0.167	5.595	0.167	4.170	0.227	5.165	0.184	4.024	0.071	2.915
0.292	2.810	0.292	3.517	0.364	3.717	0.306	2.940	0.329	2.212
0.458	4.516	0.458	3.793	0.455	2.406	0.388	2.321	0.357	2.633
0.542	3.104	0.542	3.337	0.500	2.504	0.490	1.873	0.457	2.083
0.583	3.717	0.583	3.873	0.545	2.293	0.612	2.282	0.500	1.641
0.792	2.067	0.792	2.848	0.591	1.700	0.714	2.314	0.614	1.818
0.875	2.712	0.875	2.043	0.682	1.792	0.755	2.065	0.743	1.126
0.917	1.475	0.917	1.646	0.727	1.026	0.796	1.991	0.871	0.000

0.958	0.736	0.958	2.276	0.773	1.486	0.918	1.207	0.900	0.000
1.000	0.000	1.000	0.845	1.000	1.291	1.000	0.842	1.000	0.000

<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>	<b>DE</b>
<b>(<math>\mu\text{m}</math>) Profund Normalizada</b>	<b>(<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>) Q</b>	<b>(<math>\mu\text{m}</math>) Profund Normalizada</b>	<b>(<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>) Q</b>
0.1631	4.3738	0.0569	0.8572
0.3163	3.0394	0.0304	0.4890
0.4232	3.1337	0.0476	0.7944
0.5061	2.5803	0.0362	0.5164
0.5649	2.7612	0.0433	0.8013
0.7006	2.1493	0.0952	0.3727
0.7860	1.9475	0.0859	0.4667
0.8456	1.2276	0.0825	0.6281
0.9016	1.1410	0.0764	0.6926
1.0000	0.5956	0.0000	0.4684

## ANEXO G

### Cuantificación del carvacrol no unido a NPs

Para determinar la concentración de carvacrol no unido a las NPs, se utilizaron otras dos técnicas además de la descrita en la sección II.2. Las técnicas empleadas fueron:

- 1) Filtración con Millex de Millipore. Se prepararon NPs cargadas con carvacrol (1.5 mg/mL) (sección II.2). Los lotes de NPs se realizaron por triplicado. Se tomaron 5 mL de la suspensión de las NPs cargadas con carvacrol, se colocaron en el filtro Millex (poro de 200 nm). El filtrado se diluyó con agua Mili-Q (dilución 1:70), se tomaron 7.5 mL de esta solución y se le agregó 75  $\mu$ L de una solución de mentol (50  $\mu$ g/mL). Se cuantificó por cromatografía de gases con HS-SPME. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla D.1.
- 2) Filtración-ultracentrifugación con Microcone de Millipore. Los lotes de NPs se realizaron por triplicado. Se tomaron 500  $\mu$ L de la suspensión de las NPs cargadas con carvacrol se colocaron en los tubos con el microfiltro Microcone (poro de 100 nm). Se sometieron a ultracentrifugación a 10,000 g durante 12 minutos a 25 °C (Centrífuga refrigerada, Heraeus modelo Biofuge) para obtener el filtrado y el retentato. Al filtrado de cada lote se le realizó una dilución 1:70 con agua Mili-Q y se sometió a HS-SPME para la cuantificación del carvacrol por CG. En la tabla D.2 se muestran los resultados obtenidos y el análisis de los datos. A lo recuperado del retentato se le realizó una dilución 1:50 con metanol, se le agregó 500  $\mu$ L de mentol (1000  $\mu$ g/mL) y se llevó a un volumen final de 5 mL con metanol. Se analizó por inyección directa con CG. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla D.3.

A continuación se muestran las tablas de resultados:

**Tabla G.1. Cuantificación del carvacrol no unido a las NPs por filtración con Millex.**

Lote	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment Medida	[ ] carv/ [ ] ment Calculada	(ppm) [ ] Carv Calculado	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [ ] Carv total Multipor Factores de dil	% de carv cuantificado en el sobrenadante de NPs	Media	DE	DER (%)
1	50398.93	20413.72	2.4689	3.4610	1.7305	121.1343	8.0756	8.0849	0.0526	0.6512
2	49104.51	19984.32	2.4572	3.4447	1.7223	120.5630	8.0375			
3	51821.39	20818.66	2.4892	3.4893	1.7446	122.1238	8.1416			

**Tabla G.2. Cuantificación del carvacrol no unido a las NPs en el filtrado obtenido por filtración-ultracentrifugación con Microcone**

Lote	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment Medida	[ ] carv/ [ ] ment Calculada	(ppm) [ ] Carv Calculado	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [ ] Carv total Multipor Factores de dil	% de carv cuantificado en el sobrenadante de NPs	Media	DE	DER (%)
1	4787.64	20426.19	0.2344	0.3497	0.1749	12.2411	0.8161	1.1151	0.2745	24.6156
2	8427.17	21043.72	0.4005	0.5810	0.2905	20.3343	1.3556			
3	6853.4	19898.79	0.3444	0.5029	0.2515	17.6030	1.1735			

**Tabla G.3. Cuantificación del carvacrol unido a las NPs en el retentado obtenido por filtración-ultracentrifugación con Microcone**

Lote	Área pico Carv ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área pico Ment ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Área carv/Área ment Medida	[ ] carv/ [ ] ment Calculada	(ppm) [ ] Carv Calculado	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [ ] Carv total Multipor Factores de dil	% de carv cuantificado en el sobrenadante de NPs	Media	DE	DER (%)
1	576.78	810.94	0.7112	0.7879	9.8487	492.4338	32.8289	45.0858	10.6320	23.5817
2	854.43	732.49	1.1665	1.2437	15.5458	777.2910	51.8194			
3	927.77	815.65	1.1375	1.2146	15.1827	759.1365	50.6091			



### **Asistencia a congresos**

45° Congreso Mexicano de Química, Riviera Maya, Quintana Roo, México. Del 18 al 22 de septiembre, 2010. Ponente de cartel “Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de un aceite esencial en nanopartículas poliméricas”.

### **Presentaciones en congresos internacionales y nacionales**

Presentación en modalidad de Cartel Profesional. “Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de un aceite esencial en nanopartículas poliméricas”. 45° Congreso Mexicano de Química, Riviera Maya, Quintana Roo, México.

Aceptación de presentación en modalidad de Cartel Profesional. “Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con un aceite esencial”. Congreso Internacional de Química Industrial 2011. Monterrey, Nuevo León, México.

### **Publicaciones *in extenso***

Cavazos Rodríguez, M. R., Galindo Rodríguez, S. A., Castro Ríos, R., Waksman de Torres, N., Álvarez Román, R. (2010). “Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de un aceite esencial en nanopartículas poliméricas”. *Bol. Soc. Quím. Méx. Memorias en extenso del 45° Congreso Mexicano de Química, Riviera Maya, Quintana Roo, México*. Pág. 141.

Cavazos Rodríguez, M. R., Galindo Rodríguez, S. A., Álvarez Román, R., Waksman de Torres, N., Salazar Aranda, R. (2011). “Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con un aceite esencial”. *Memorias en extenso del Congreso Internacional de Química Industrial 2011*, Aceptada.

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

**Martha Rebeca Cavazos Rodríguez**

Candidato para el grado de

**Maestro en Ciencias con Orientación Terminal en Química Biomédica**

Título de Tesis

**ENCAPSULACIÓN DE MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA SU APLICACIÓN DERMATOLÓGICA**

**Campo de estudio:** Química Analítica

### **Biografía:**

#### **Datos personales:**

Nacida en: Monterrey, Nuevo León, México, el 19 de septiembre de 1983.

Hija de: Luis Gerardo Cavazos Guerra y Rebeca Rodríguez Marroquín.

#### **Escolaridad:**

Egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Grado obtenido: Químico Clínico Biólogo.

#### **Experiencia profesional**

2006-2007. Químico analista/supervisor. Centro Médico Magallanes, Monterrey, Nuevo León.

2006. Químico supervisor. Pérez-Lab, Allende, Nuevo León.

2006-2008. Químico analista. Hospital y Clínica OCA. Monterrey, Nuevo León.

2010. Personal no docente en la Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, Nuevo León.