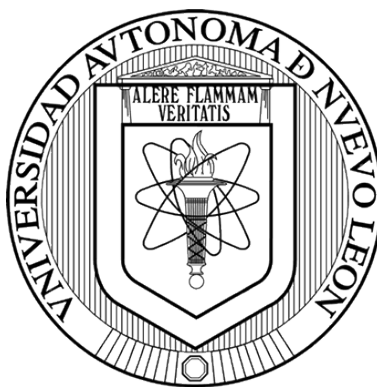


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO DE LA NANOENCAPSULACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE
Schinus molle L. Y *Thymus vulgaris* L. **SOBRE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50**
UTILIZANDO LOS MODELOS DE HEMÓLISIS ERITROCITARIA INDUCIDA Y
Artemia salina

POR

Q.B.P. ANAHÍ GUADALUPE ZAMORA MENDOZA

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

2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



Efecto de la nanoencapsulación de los aceites esenciales de *Schinus molle* L. y *Thymus vulgaris* L. sobre la concentración letal 50 utilizando los modelos de hemólisis eritrocitaria inducida y *Artemia salina*

COMITÉ DE TESIS

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Presidente

Dra. Mayra Zulema Treviño Garza

Secretario

Dra. Alicia Guadalupe Marroquín Cardona

Vocal

Dra. Catalina Leos Rivas

Vocal

Dr. David Mizaél Ortiz Martínez

Vocal

Dra. Katiushka Arévalo Niño



Subdirectora de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



Efecto de la nanoencapsulación de los aceites esenciales de *Schinus molle* L. y *Thymus vulgaris* L. sobre la concentración letal 50 utilizando los modelos de hemólisis eritrocitaria inducida y *Artemia salina*

Dirección de tesis

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Director

Dra. Rocío Álvarez Román

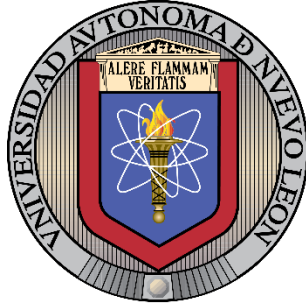
Directora externa

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS



A la Universidad Autónoma de Nuevo León, la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Subdirección de Posgrado por las facilidades otorgadas en el transcurso de mi formación académica, permitiéndome realizar la Maestría en Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado (No. CVU 1082670).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida durante estos años de pandemia, así como por otorgarme la fortaleza y resiliencia necesaria para seguir adelante día con día.

A mis padres Ana Mendoza y Juan Zamora por los valores que me inculcaron y por el apoyo que me han brindado frente a cada decisión. A mi hermano Jesús Zamora por sus lecciones de vida, sus gratos consejos y su infinito apoyo tanto en los buenos como malos momentos.

En especial quiero agradecer al Dr. Sergio Galindo y la Dra. Roció Álvarez por su paciencia, enseñanzas y mentoría durante el desarrollo de este proyecto, contribuyendo a mi crecimiento académico y profesional. Les agradezco a ambos por la confianza que depositaron en mí al abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme ser parte de su equipo de trabajo, convirtiéndose en un ejemplo a seguir para mí.

Agradezco a mi mejor amigo y compañero de vida Erik Lara por siempre estar a mi lado apoyándome, aconsejándome e inclusive regañándome, pero sobre todo alentándome para aprender y lograr nuevas cosas.

Agradezco a mis amigos del Nanolab: a Sofía, Valentín, Romario, el Dr. Mizael y Michel que compartieron muchas mañanas de cafecitos, risas, anécdotas y discusiones científicas. Particularmente quiero agradecer a Nancy Espinosa quien siempre ha mostrado ser una gran amiga, gracias por siempre escucharme, aconsejarme y ayudarme, demostrándome que los momentos tristes y difíciles siempre se sobre llevan mejor con amigos.



“Cuando tengas miedo de lograr algo, recuerda que solo tienes una vida para alcanzar lo que te propones”

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Aceites esenciales (AE)	3
2.1.1. Composición y características fisicoquímicas.....	3
2.1.2. Propiedades biológicas.....	4
2.2. Nanotecnología.....	6
2.2.1. Nanopartículas poliméricas (NP).....	8
2.2.2. Aplicaciones biológicas.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVOS.....	14
5.1. Objetivo general.....	14
5.2. Objetivos específicos.....	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
6.1. Obtención y caracterización física y química de los AE.....	16
6.1.1. Obtención de los AE de <i>S. molle</i> L. y <i>T. vulgaris</i> L.....	16
6.1.2. Caracterización física de los AE de <i>S. molle</i> L. y <i>T. vulgaris</i> L.....	16
6.1.3. Caracterización química de los AE <i>S. molle</i> L. y AE <i>T. vulgaris</i> L. por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y detector de ionización de flama.....	16
6.2. Obtención y caracterización fisicoquímica de NP con los AE.....	18
6.2.1. Obtención de NP mediante la técnica de nanoprecipitación.....	18
6.2.2. Caracterización fisicoquímica de las NP con AE.....	18
6.3. Validación de los métodos de microextracción en fase solida modalidad <i>headspace</i> (HS-SPME) para cuantificar los componentes del AE de <i>S.</i> <i>molle</i> L. y <i>T. vulgaris</i> L. por cromatografía de gases con detección de ionización de flama (CG-FID)	20

6.3.1. Validación de los métodos analíticos por CG-FID para cuantificar los AE en NP.....	21
6.3.2. Validación de los sistemas de <i>HS-SPME</i> por CG-FID.....	21
6.3.3. Validación de los métodos de <i>HS-SPME</i> por CG-FID.....	21
6.4.Determinación de la CL ₅₀ de los AE de <i>S. molle</i> L. y AE de <i>T. vulgaris</i> L. libres y nanoencapsulados.....	24
6.4.1. Ensayos de hemólisis eritrocitaria inducida.....	24
6.4.2. Ensayo de <i>Artemia salina</i>	25
6.5.Análisis de datos.....	25
7. RESULTADOS.....	26
7.1. Caracterización física y química de los AE.....	26
7.1.1. Caracterización física de los AE <i>S. molle</i> L. y <i>T. vulgaris</i> L.....	27
7.1.2. Caracterización química de los AE <i>S. molle</i> L. y AE <i>T. vulgaris</i> L. por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y detector de ionización de flama.....	28
7.2. Obtención y caracterización fisicoquímica de NP con los AE.....	30
7.3. Validación de los métodos de microextracción en fase solida modalidad headspace (<i>HS-SPME</i>) para cuantificar los componentes del AE de <i>S. molle</i> L. y <i>T. vulgaris</i> L. por cromatografía de gases con detección de ionización de flama (CG-FID)	34
7.4.Determinación de la CL ₅₀ de los AE <i>S. molle</i> L. y AE <i>T. vulgaris</i> L. libres y nanoencapsulados.....	38
7.4.1. Ensayo de hemólisis eritrocitaria inducida.....	38
7.4.2. Ensayo de <i>Artemia salina</i>	39
8. DISCUSIÓN.....	40
9. CONCLUSIÓN.....	50
10. PERSPECTIVAS.....	51
11. BIBLIOGRAFÍA.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁG
1	Propiedades biológicas de AE de <i>T. vulgaris</i> L. y <i>S. molle</i> L.	6
2	Formas de aplicación de aceites esenciales	7
3	Actividad biológica de nanopartículas de aceites esenciales y/o sus componentes incorporados en nanopartículas poliméricas.	12
4	Condiciones óptimas para la extracción de los componentes de seguimiento con <i>HS-SPME</i> por CG-FID.	21
5	Caracterización física de los AE de <i>T. vulgaris</i> L. y AE de <i>S. molle</i> L. y del anetol (control)	27
6	Composición química de los AE de <i>T. vulgaris</i> L. y AE de <i>S. molle</i> L. analizados por CG-MS	29
7	Características fisicoquímicas de NP obtenidas por la técnica de nanoprecipitación	30
8	Porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación de los AE de <i>T. vulgaris</i> L. y AE de <i>S. molle</i> L. obtenidos por con <i>HS-SPME</i> por CG-FID	34
9	Parámetros de validación del método analítico para el AE de <i>S. molle</i> L.	37
10	Parámetros de validación del método analítico para el AE de <i>T. vulgaris</i> L.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁG
1	Estructura de nanoformulaciones de aceites esenciales.	7
2	Etapas de desarrollo del estudio.	15
3	Comparación de los espectros de FT-IR de AE <i>S. molle</i> L. del 2022 y 2016.	26
4	Comparación de los espectros de FT-IR de AE <i>T. vulgaris</i> L. del 2022 y 2016.	26
5	Espectro del AE de <i>S. molle</i> L. analizado por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-MS).	28
6	Espectro del AE de <i>T. vulgaris</i> L. analizado por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-MS).	28
7	Espectros de FT-IR de AE <i>S. molle</i> L.	31
8	Espectros de FT-IR de AE <i>T. vulgaris</i> L.	32
9	Cromatograma de las NP con AE de <i>S. molle</i> L. obtenido con HS-SPME por CG-FID.	33
10	Cromatograma de las NP con AE de <i>T. vulgaris</i> L. obtenido con HS-SPME por CG-FID.	33
11	Cromatograma del AE de <i>S. molle</i> L. (200 µg/mL) obtenido con HS-SPME por CG-FID.	35
12	Cromatograma del AE de <i>T. vulgaris</i> L. (200 µg/mL) obtenido con HS-SPME por CG-FID.	35
13	Cromatogramas obtenidos de la curva de calibración de la mezcla de estándares de seguimiento para el del AE de <i>S. molle</i> L.: mirceno, α -felandreno y limoneno (4-64 µg/mL) con HS-SPME por CG-FID.	36
14	Cromatogramas obtenidos de la curva de calibración de la mezcla de estándares de seguimiento para el AE de <i>T. vulgaris</i> L.: p-	36

cimeno, γ -terpineno y timol (8-128 $\mu\text{g/mL}$) con *HS-SPME* por CG-FID.

- | | | |
|----|---|----|
| 15 | Valores de CL_{50} de AE de <i>T. vulgaris</i> L. y AE de <i>S. molle</i> L. mediante el ensayo de hemólisis. | 38 |
| 16 | Valores de CL_{50} de AE de <i>T. vulgaris</i> L. y AE de <i>S. molle</i> L. mediante el ensayo de <i>Artemia salina</i> . | 39 |

RESUMEN

Los aceites esenciales (AE) de *Thymus vulgaris* L. y *Schinus molle* L. han sido ampliamente utilizados debido a sus propiedades biológicas. Sin embargo, factores como su baja estabilidad, alta volatilidad, así como sus reducidos rangos de concentraciones en su administración, limitan su uso. Debido a ello, se ha propuesto su incorporación en nanopartículas poliméricas (NP), las cuales permiten mejorar la biodisponibilidad y bioeficacia de los AE. No obstante, aunque los AE incorporados en NP han sido reconocidos por sus propiedades biológicas, actualmente no existen estudios suficientes que determinen que el empleo de estas permite aumentar los rangos de concentraciones de administración de los AE. De tal manera, en el presente trabajo, se determinaron los efectos de la nanoencapsulación sobre los valores de Concentración letal 50 (CL₅₀) de los AE *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. a través de los modelos de hemólisis eritrocitaria inducida y *Artemia salina*. Se determinó que los compuestos mayoritarios del AE de *S. molle* L. fueron mirceno (28.73 %), α -felandreno (18.85 %) y limoneno (37.77 %); mientras que para el AE de *T. vulgaris* L. fueron el ρ -cimeno (20.29%), γ -terpineno (18.29 %) y timol (51.46 %). Posteriormente, se validaron los métodos analíticos para la cuantificación de ambos AE mediante HS-SPME-GC, obteniendo que los métodos fueron lineales, exactos y precisos. Así mismo, en este estudio se obtuvieron NP con AE de un tamaño de partícula de alrededor de 100 a 200 nm, un índice de polidispersidad menor a 0.2, un potencial ζ negativo y un porcentaje de eficiencia de encapsulación menor al 77%. En cuanto a la determinación de los valores de CL₅₀ de los AE libres y nanoencapsulados, tanto el ensayo de hemólisis eritrocitaria inducida y *Artemia salina* mostraron comportamientos similares, observando que el AE de *S. molle* L. incorporado en la NP presentó una CL₅₀ mayor; mientras que el AE de *T. vulgaris* L. nanoencapsulado presentó una menor CL₅₀. Obteniendo que la diferencia de la CL₅₀ de los AE incorporados en las NP con respecto al libre se podría deber principalmente a los componentes encapsulados en mayor proporción.

ABSTRACT

The essential oils (EO) of *Thymus vulgaris* L. and *Schinus molle* L. have been widely used due to their biological properties. However, its use is limited due to its high volatility, low stability, as well as its reduced concentration ranges in its administration. Therefore, its incorporation into polymeric nanoparticles (NP) has been proposed, which allow improving the bioavailability and bioefficacy of EO. Although the EO incorporated into NP have been recognized for their biological properties, at the present time there are not enough studies to determine that the use of these allows to increase the concentration ranges for the EO administration. In the present work, first the effects of nanoencapsulation on the lethal dose 50% (LD₅₀) values of the EO *S. molle* L. and *T. vulgaris* L. were determined through the models of induced erythrocyte hemolysis and *Artemia salina* (brine shrimp). It was determined that the main compounds of the EO of *S. molle* L. were myrcene (28.73%), α -phellandrene (18.85%) and limonene (37.77%); while for the EO of *T. vulgaris* L. were p-cymene (20.29%), γ -terpinene (18.29%) and thymol (51.46%). Second, a quantification method was validated for each EO by HS-SPME-GC. The results of the validation indicated that the methods were linear, precise, and accurate. Then, in this study, EO-loaded NP were obtained, and they have a mean size around 100 to 200 nm, a polydispersity index of less than 0.2, a negative zeta potential and an encapsulation efficiency percentage of less than 77%. Finally, the determination of the LD₅₀ values of NP without EO and EO-loaded NP, in the induced erythrocyte hemolysis assay and *Artemia salina* (brine shrimp), showed similar behaviors, observing that the EO of *S. molle* L. incorporated into NP presented a higher LD₅₀; while the EO of *T. vulgaris* incorporated into NP presented a lower LD₅₀. In general, the difference in the LD₅₀ of the EO incorporated into NP with respect to the NP without EO could be mainly due to the encapsulated components in a greater proportion.

1. INTRODUCCIÓN

Existe una amplia cantidad de aceites esenciales (AE) con actividades biológicas relevantes, razón por la cual en los últimos años se ha observado un especial interés en su empleo en distintas áreas tales como la de alimentos, cosmética (*e.g.* cremas, jabones y perfumes), agrícola (*e.g.* insecticidas) y farmacéutica (Naeem *et al.* 2018; Herman *et al.* 2019); en esta última, se ha observado un aumento considerable, ya que, actualmente en la atención primaria alrededor del 70-80% de la población mundial emplea el uso de medicamentos no convencionales, principalmente, de origen vegetal (Hamidi *et al.* 2014). En particular, los AE de *T. vulgaris* L. y *S. molle* L. destacan en esta área por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Hamid *et al.* 2011; Piña-Barrera 2018). Sin embargo, algunas características estructurales como su baja estabilidad química y alta volatilidad limitan su uso (Turek y Stintzing 2013). Así mismo, se ha determinado, dentro de una evaluación de la concentración letal 50 (CL₅₀) de distintos AE (*i.e.* AE de *T. vulgaris* L., *Origanum majorana*, *Eucalyptus tereticornis*, *Lavandula dentata*, *Rosmarinus officinalis* y *S. molle* L.), que los AE de *T. vulgaris* L. y *S. molle* L. mostraron CL₅₀ más bajas que el resto de los AE, lo que indica reducidos rangos de concentraciones de administración (Zamora-Mendoza 2020), es decir, que a concentraciones por arriba de estos valores podrían causar efectos adversos (*e.g.* fotosensibilización e irritación) (Bilia *et al.* 2014).

Debido a ello, y dada la importancia y valoración de los AE, se ha propuesto su incorporación en formulaciones que hagan viable su administración, tanto en seres vivos, como en el medio ambiente (Pedro *et al.* 2013). Específicamente, la encapsulación de los AE en nanopartículas poliméricas (NP) ha dado buenos resultados, siendo mayormente efectiva debido a que permite mejorar la biodisponibilidad y bioeficacia de los AE y/o sus componentes (De Matos *et al.* 2019). Sin embargo, no solo se han realizado estudios en cuanto a las sustancias activas incorporadas en NP y su contribución al aumento de efectividad de sus propiedades biológicas, si no que en los últimos años se han desarrollado investigaciones sobre el empleo de nanoformulaciones en un gran número de fármacos observando que, además de mejorar su actividad terapéutica, han reducido las dosis necesarias, así como las reacciones adversas que ocasionan; esto abre un amplio campo de estudio para la evaluación de la administración de agentes terapéuticos incorporados en nanopartículas (Bhunchu y Rojsitthisak 2014). No

obstante, es importante destacar que pese al desarrollo de estos estudios los riesgos asociados específicamente con la incorporación de AE en NP, no son bien conocidos. De hecho, algunos estudios sugieren que el empleo de nanopartículas podría interferir con las funciones biológicas celulares, incluso a niveles genéticos (Begines *et al.* 2020). Por ello, la valoración del efecto de la CL₅₀ de los AE incorporados en NP representa un campo interesante de desarrollo, necesario para un futuro establecimiento efectivo de administración de los AE. En este contexto, el presente estudio se orienta a determinar los efectos de la nanoencapsulación sobre los valores de CL₅₀ de los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L., utilizando como modelos biológicos la hemólisis eritrocitaria inducida y la *Artemia salina*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Aceites esenciales (AE)

Los AE, también conocidos como aceites volátiles o etéreos, son definidos por la Organización Internacional de Normalización (ISO) como productos obtenidos de materia prima vegetal, a través de métodos de destilación de baja o alta presión, destilación seca, extracción con disolventes orgánicos, prensado, extracción de fluidos supercríticos o microondas (Bilia *et al.* 2014; Rai *et al.* 2018). Entre sus principales características destacan que son una mezcla de compuestos aromáticos volátiles y líquidos, hidrofóbicos, solubles en disolventes orgánicos y con una densidad generalmente menor que la del agua. Los AE presentan un aroma fuerte y penetrante, siendo la mayoría incoloros o de color amarillo translúcido (Bilia *et al.* 2014; Andrade-Ochoa *et al.* 2017).

En cuanto a la síntesis y su localización, los AE se encuentran en mayor proporción en plantas angiospermas dicotiledóneas donde se sintetizan en el exterior de la planta, en los cepillos glandulares y en las papilas; mientras que, en el interior de la planta se sintetizan en las células secretoras, en los espacios intercelulares (canales secretores) y bolsas secretoras (Butnariu y Sarac 2018). En cuanto a su almacenamiento, los AE se acumulan en todos los órganos vegetales en cantidades variables, por ejemplo, en brotes, hojas, semillas, flor, tallos, ramas, cáscara, bayas, rizoma, raíz, corteza, madera, resina, pétalos y frutos (Hamid *et al.* 2011).

Los AE se encuentran solo en el 10% del reino vegetal, con un rendimiento total generalmente muy bajo, superando rara vez el 1% (Djilani y Dicko 2012). Este rendimiento puede verse afectado debido a distintos factores como la especie, condiciones climáticas, estacionales y geográficas, período de cosecha y técnicas de extracción; otros factores incluyen las etapas de desarrollo de crecimiento de la planta y la parte de la planta de la que se extrae (Hamid *et al.* 2011).

2.1.1. Composición y características fisicoquímicas

Referente a su composición, los AE son generalmente mezclas complejas de alrededor de 20 a 60 componentes, dentro de las cuales sólo dos o tres componentes están presentes en una

concentración alta (20-70%), en comparación con el resto de los componentes que están presentes en trazas (Bilia *et al.* 2014; Adalakun *et al.* 2016). Estos componentes mayoritarios son los que determinan las propiedades biológicas de los AE, ya que, incluyen la presencia de diferentes grupos de origen biosintético como son terpenos, fenilpropanoides, componentes nitrogenados o sulfurados y moléculas fotoactivas.

2.1.2. Propiedades biológicas

Dada la composición de los AE existe una amplia cantidad de ellos que han demostrado presentar interesantes actividades biológicas como, por ejemplo, antidepresivas, estimulantes, desintoxicantes, antibacterianas, antivirales y calmantes. Debido a ello, en los últimos años se ha observado un especial interés en su empleo en distintas áreas tales como la de alimentos, cosmética (*e.g.* cremas, jabones y perfumes), agrícola (*e.g.* insecticidas) y farmacéutica (Naeem *et al.* 2018; Herman *et al.* 2019); en esta última, se ha observado un aumento considerable, ya que, actualmente en la atención primaria alrededor del 70-80% de la población mundial emplea el uso de medicamentos no convencionales, principalmente de origen vegetal (Hamidi *et al.* 2014).

Particularmente, los AE de *T. vulgaris* L. y *S. molle* L. han mostrado tener una amplia cantidad de propiedades biológicas. Por ejemplo, Hamid *et al.* (2011) demostraron que el AE de *T. vulgaris* inhibe bacterias patógenas, tales como, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*. En otro estudio, Balanta *et al.* (2013) estudiaron el empleo del AE de *T. vulgaris* contra *Fusarium oxysporum*, obteniendo resultados favorables para la actividad fungicida y fungistática a concentraciones de 6250 mg/L y 1560 mg/L, respectivamente. De igual manera, Rojas *et al.* (2015) mostraron que el AE de *T. vulgaris* presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Cándida albicans*, el cual se incrementa en presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Así mismo, dentro de nuestro grupo de trabajo, Piña-Barrera (2018) analizó el AE de *T. vulgaris* L. para determinar su potencial como preservador de productos hortofrutícolas, demostrando que los componentes con actividad antioxidante pudieron haber influido en la reducción del estrés oxidativo causado por la postcosecha, mientras que, los componentes con actividad antimicrobiana evitaron el crecimiento de microorganismos.

Con respecto al AE de *S. molle* L., autores como Gutiérrez *et al.* (2009) evaluaron el efecto de la actividad insecticida de AE obtenidos de hoja y fruto, así como, su efecto repelente en ninfas II de *Nezara viridula*, obteniendo que ambos AE presentaron un alto potencial para ser empleados como una herramienta alternativa para el manejo integrado de *N. viridula*. De igual manera, Guala *et al.* (2009) evaluaron las características antioxidantes de distintas fracciones del AE de *S. molle*, observando que la fracción más pesada presentó mayor potencial antirradical. Por otro lado, Benzi *et al.* (2009) evaluaron la bioactividad repelente e insecticida del AE de *S. molle* contra el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*), observando resultados favorables. En otro estudio, Rivadeneira-Cajas y Álvarez-Velazco (2015) evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del AE de *S. molle* en cepas de *Streptococcus mutans*, observando la presencia de actividad antimicrobiana del AE contra la cepa estudiada. Así mismo en nuestro equipo de trabajo, Villegas-Ramírez (2017) reportó que los AE *S. molle* L. de hoja y fruto presentaban actividad contra larvas de *Musca doméstica* L., a través del modelo de caja petri con salvado, reportando valores de CL₅₀ de 1232 µg/mL y 1276 µg/mL, respectivamente. Los autores concluyeron que los AE estudiados podían ser considerados como productos efectivos en el control biológico, ya que, no sobrepasan los límites establecidos por la Agencia de Cooperación Técnica Alemana (GTZ) de una concentración máxima de 5000 µg/mL. Otros estudios, sobre la actividad biológica de ambos AE, se muestran en la Tabla 1.

Así, en la actualidad, se han reportado enfoques prometedores utilizando AE, en productos de distintas áreas. Sin embargo, algunas características estructurales como su baja estabilidad química y alta volatilidad, desencadenadas por factores como la exposición directa al calor, la humedad, la luz y oxígeno limitan su uso (Turek y Stintzing 2013). Así mismo, estudios realizados en nuestro equipo han determinado que dentro de una evaluación de los valores de concentración letal 50 (CL₅₀) de los AE de *T. vulgaris* L., *Origanum majorana*, *Eucalyptus tereticornis*, *Lavandula dentata*, *Rosmarinus officinalis* y *S. molle* L., los AE de *T. vulgaris* L. y *S. molle* L. mostraron CL₅₀ más bajas que el resto de los AE, lo que indica reducidos rangos de concentraciones de administración, es decir, que a concentraciones por encima de estos valores podrían causar efectos adversos (Zamora-Mendoza, 2020).

Tabla 1. Propiedades biológicas de los AE de *T. vulgaris* L. y *S. molle* L.

AE	Propiedad biológica	Referencias
<i>T. vulgaris</i> L.	Actividad antifúngica contra <i>Rhizopus oryzae</i>	De Lira <i>et al.</i> 2012
	Actividad antifúngica contra <i>Aspergillus niger</i>	Moghtader 2013
	Evaluación de potencial para ser utilizado como un agente citotóxico natural, antioxidante y antimicrobiano en el procesamiento de alimentos	Miladi <i>et al.</i> 2013
	Actividad antiparasitaria contra larvas del género <i>Anisakis</i>	Giarratana <i>et al.</i> 2014
	Evaluación de actividad antimicrobiana para su uso como conservador de alimentos	Maksimov 2017
	Evaluación de actividad antidermatofítica para el tratamiento de micosis superficiales	Velázquez-Dávila 2017
	Actividad insecticida para la protección de semillas de frijol contra <i>Acanthoscelides obtectus</i>	Lazarević <i>et al.</i> 2020
<i>S. molle</i> L.	Evaluación de actividades anticancerígenas y antioxidantes	Bendaoud <i>et al.</i> 2010
	Evaluación de actividad antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	De Mendonça <i>et al.</i> 2012
	Evaluación de actividad antimicótica contra <i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>Fusarium moniliforme</i>	López-Meneses <i>et al.</i> 2015
	Actividad larvicida y repelente en el control de <i>Aedes aegypti</i>	Lugo 2018

2.2. Nanotecnología

Considerando la importancia y valoración biológica de los AE, se ha propuesto su incorporación en formulaciones que hagan viable su administración, tanto en seres vivos, como en el medio ambiente (Tabla 2). No obstante, tales preparaciones presentan importantes desventajas como son una dispersión desigual, inestabilidad, efectos indeseables sobre el sabor en alimentos, no permiten alcanzar la orientación de tejidos o células específicos y, en la mayoría de los casos, la actividad *in vivo* de las formas de dosificación convencionales sigue limitada a sus propiedades fisicoquímicas (Prakash y Kiran 2016; Martínez *et al.* 2017).

Tabla 2. Formas de aplicación de aceites esenciales (Pedro *et al.* 2013).

Semisólidas	Sólidas	Líquidas
Pomadas Ungüentos Pastas Cremas Espumas	Cápsulas Granulados Tabletas	Emulsiones Suspensiones Jarabes Lociones

Por lo anterior, investigaciones como la de Donsi *et al.* (2014) han sugerido que la nanotecnología podría ser una alternativa para la resolución de dichos problemas, permitiendo así:

1. Eficientizar la protección de los componentes de procesos de degradación química y física.
2. Contribuir en la dispersión de los AE en sistemas acuosos.
3. Disminuir el efecto sensorial de los AE en los alimentos.
4. Mejorar su actividad biológica a través de su liberación controlada.
5. Aumentar la bioeficacia y los mecanismos de absorción celular.

Considerando los sistemas de liberación controlada de moléculas con actividad biológica, existe una amplia variedad de sistemas nanométricos, que incluyen a las NP, nanopartículas de lípidos sólidos, acarreadores lipídicos nanoestructurados, sistemas de cristales líquidos, nano/microemulsiones y liposomas, entre otros (Figura 1).

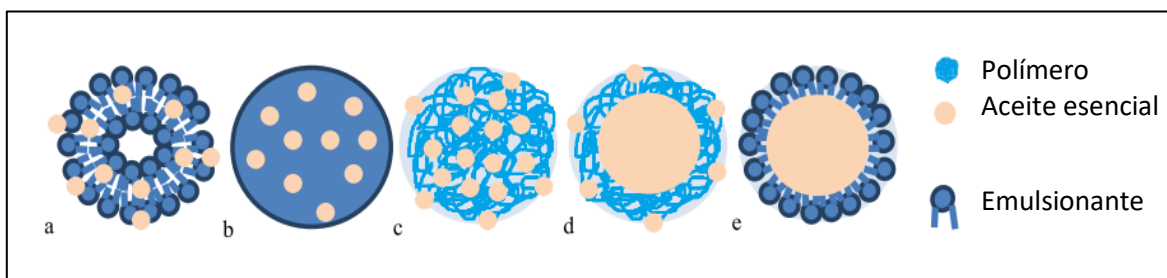


Figura 1. Estructura de nanoformulaciones de aceites esenciales: a) liposomas, b) nanopartículas lipídicas sólidas, c) nanoesferas poliméricas, d) nanocápsulas poliméricas, e) nanoemulsiones (Pedro *et al.* 2013).

Cada uno de estos sistemas posee sus propias limitaciones (*e.g.* estabilidad física y química, compatibilidad, costo de producción y posibilidad de escalamiento), por lo cual, antes de la

formulación o síntesis en el material de encapsulación, es necesario tener en cuenta la polaridad de los compuestos activos, la solubilidad, la volatilidad, la disponibilidad y la composición de la matriz de aplicación (Prakash *et al.* 2018). Considerando que los AE son un conjunto de componentes volátiles de carácter lipofílico, los sistemas basados en lípidos (*e.g.* nano/microemulsiones, nanopartículas lipídicas y liposomas) resultan en primera instancia una buena posibilidad para incorporarlos (Pedro *et al.* 2013). En segundo lugar, la encapsulación de los AE en NP también ha dado buenos resultados, siendo mayormente efectiva debido a que permite mejorar la biodisponibilidad y bioeficacia de los AE y/o sus componentes (De Matos *et al.* 2019). Particularmente, se ha determinado que la forma, el tamaño de partícula y propiedades de superficie de las nanopartículas tienen un importante papel en la captación de estos sistemas de liberación a través de las membranas mucosas (Bilia *et al.* 2014).

2.2.1. Nanopartículas poliméricas (NP)

Las NP se establecen como sistemas sólidos, formados de macromoléculas, con un tamaño menor a 600 nm (submicrónico), que funcionan como transportadores de compuestos con actividad biológica (Barreras-Urbina *et al.* 2016). Estructuralmente, las NP se clasifican en nanocápsulas y nanoesferas. Las nanocápsulas tienen dos compartimentos: una pared polimérica y un núcleo, que comúnmente es de carácter aceitoso; mientras que, las nanoesferas son sistemas matriciales. De tal forma, el AE puede asociarse de dos maneras, ya sea con el polímero (matriz o pared) o en el núcleo aceitoso (Bilia *et al.* 2014). En cuanto a la selección del polímero es necesario considerar la aplicación que se le dará al compuesto encapsulado. Por ejemplo, cuando se considera para una aplicación farmacéutica, o como conservadores de alimentos y cosméticos, estas partículas deben estar constituidas por polímeros biocompatibles, los cuales pueden ser sintéticos, como el ácido poliláctico-*co*-glicólico (PLGA), o naturales, como el quitosano y la gelatina (Pedro *et al.* 2013).

Dentro de las ventajas que ofrecen estos sistemas se encuentran (Armendáriz-Barragán *et al.* 2016):

1. Debido a su tamaño facilitan la interacción con diversos sistemas biológicos (*e.g.* células cancerígenas, virus, bacterias, células sanguíneas y parásitos).

2. Al tener una amplia área superficial, el número de moléculas de activo biológico presentes en la superficie de las NP se incrementa conforme disminuye el tamaño del sistema.
3. El tamaño nanométrico les confiere mayor estabilidad, permitiendo mantenerlas en suspensiones líquidas.
4. Su composición polimérica, permite proteger a los compuestos activos encapsulados de factores ambientales como luz, humedad, temperatura, así como, del entorno biológico en donde se aplican.
5. La morfología superficial permite la adhesión del sistema acarreador con el sistema biológico blanco (*e. g.* célula, tejido), debido al incremento de las fuerzas de Van der Waals entre ellos.
6. Debido a que permiten un aumento en la biodisponibilidad y bioeficacia, reducen la concentración del fármaco en la sangre, disminuyendo así los efectos adversos y mejorando los niveles de concentración en el tejido a tratar.

2.2.2. Aplicaciones biológicas

Debido a las ventajas que ofrecen los sistemas nanométricos, en los últimos años se ha investigado el uso de NP con el objetivo de proteger y mantener las propiedades de los AE. Por ejemplo, Mendoza *et al.* (2018) evaluaron las propiedades antimicrobianas del AE de orégano y sus componentes mayoritarios carvacrol y timol en nanopartículas de zeína contra *Listeria innocua*, reportando una reducción del 66% en la concentración inhibitoria en comparación con su forma libre. Por otro lado, Sotelo *et al.* (2015) evaluaron las propiedades antimicrobianas del AE de *T. vulgaris* en nanopartículas de quitosano, obteniendo un efecto inhibitorio contra *Pectobacterium carotovorum*. De igual forma, Correa *et al.* (2018) confrontaron el AE de *T. vulgaris* incorporado en NP de quitosano a seis aislamientos fúngicos para evaluar sus propiedades antimicóticas, reportando una inhibición total en la mayoría de los hongos en los tratamientos con NP de quitosano; por su parte, los hongos que crecieron en los tratamientos con el AE libre tuvieron un retraso de 6 h en la germinación. Otros estudios, sobre el efecto de la nanoencapsulación en las propiedades biológica de los AE, se muestran en la Tabla 3.

No obstante, no solo se han realizado estudios en cuanto el efecto de las NP en relación con las propiedades biológicas de las sustancias activas incorporadas, si no que, en los últimos años se han desarrollado investigaciones sobre el empleo de nanoformulaciones en un gran número de fármacos observando que, además de mejorar su actividad terapéutica, han reducido las dosis necesarias, así como las reacciones adversas que ocasionan, abriendo así un amplio campo de estudio para la evaluación de la administración de agentes terapéuticos incorporados en nanopartículas (Bhunchu y Rojsitthisak 2014).

En este contexto, algunos estudios han demostrado la relación de las características fisicoquímicas de las nanopartículas con sus propiedades de eficiencia en la dosificación de fármacos. Principalmente, se ha observado que el tamaño de las NP juega un papel importante en la mejora o empeoramiento de los rangos de dosificación, obteniendo que, partículas mayores de 200 nm no son muy utilizadas debido a que pueden activar el sistema inmunológico y ser aclaradas en la sangre por las células Kupffer (Oropesa y Jáuregui 2012); mientras que, un tamaño de NP con valores menores a 200 nm posee una superficie alta en relación con su masa total, lo que aumenta la posibilidad de interactuar con biomoléculas circundantes y, como consecuencia, a respuestas adversas (Shang *et al.* 2014). Por otro parte, referente al parámetro de densidad de carga superficial de las NP, estudios han establecido que NP a base de polímeros cargadas positivamente se incorporan más rápido que las NP cargadas negativamente; además, se ha visto que poseen valores de CL_{50} menores, lo cual se ha correlacionado con que las NP cargadas positivamente poseen una mayor absorción celular (Hühn *et al.* 2013). Así mismo, se han desarrollado estudios que han demostrado la disminución de las CL_{50} de algunos compuestos incorporados en nanopartículas. Por ejemplo, Xiao *et al.* (2016) observaron que NP sensibles al pH que contenían una combinación de curcumina-celecoxib reducían los valores de CL_{50} y la dosis total de celecoxib, proporcionando una eficacia mejorada para mitigar la colitis ulcerosa (UC), mediante la acción sinérgica de estos dos agentes. De igual manera, Campos *et al.* (2020) analizaron nanopartículas de zeína con eugenol, nanopartículas de zeína con aceite de ajo y nanopartículas de zeína cocargadas con eugenol y aceite de ajo, obteniendo valores de CL_{50} de 6.23, 61.22 y 5.82 mg/L, respectivamente; se observó que, para todas las formulaciones, cuando el activo se encapsuló en las NP hubo un aumento significativo en los valores de

CL₅₀. No obstante, es importante destacar que los riesgos asociados específicamente con la incorporación de AE en NP, no son bien conocidos y los resultados obtenidos hasta ahora no son concluyentes. De hecho, algunos estudios sugieren que el empleo de NP podría interferir con las funciones biológicas celulares, incluso a niveles genéticos (Begines *et al.* 2020). Debido a esto, la valoración del efecto de la CL₅₀ de los AE incorporados en NP representa un campo interesante de desarrollo, necesario para un futuro establecimiento efectivo de administración de los AE.

Tabla 3. Actividad biológica de nanopartículas de aceites esenciales y/o sus componentes incorporados en NP.

AE/compuesto	Composición polimérica de las nanopartículas	Aplicación	Referencias
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Poli ϵ -caprolactona	Actividad antimicrobiana para tratamiento de heridas por quemaduras crónicas coinfectadas	Kalita <i>et al.</i> 2017
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Poli ϵ -caprolactona	Actividad antifúngica para tratamiento de onicomicosis	Flores <i>et al.</i> 2013
α - bisabolol	Galactomanano cetilado	Evaluación como tratamiento antinociceptivo	Teixeira <i>et al.</i> 2017
Farnesol	DMAEMA-co-BMA-co-PAA ¹	Actividad antimicrobiana en biopelícula oral	Horev <i>et al.</i> 2015
Timol	Caseinato de sodio y zeína	Eficiencia de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella spp.</i>	Li <i>et al.</i> 2012
Cinamaldehído y eugenol	Ácido polilático-co-glicólico	Eficiencia de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>Salmonella spp.</i> y <i>Listeria spp.</i>	Gomes <i>et al.</i> 2011
Carvacrol	Quitosano	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Escherichia coli</i>	Keawchaon y Yoksan 2011
Carvacrol	Poli ϵ -caprolactona	Aplicación dermatológica	Cavazos-Rodríguez 2011; Espinosa-Carranza 2021
<i>S. molle</i> L.	Eudragit L 100-55	Larvicida en el control de <i>Aedes aegypti</i>	Salas-Cedillo 2016
<i>T. vulgaris</i> L.	Eudragit L 100-55	Aumento de la vida útil de <i>Vitis vinefera</i>	Piña-Barrera <i>et al.</i> 2019

¹2- (dimetilamino) etil metacrilato, butil metacrilato y ácido 2-propilacrilico-bp.

3. JUSTIFICACIÓN

Los AE poseen una alta cantidad de atributos que les permiten ser empleados en distintas áreas tales como la alimenticia, agrícola, cosmética y farmacológica. No obstante, dada su compleja constitución, su empleo presenta limitaciones, ya que tienen baja estabilidad química, alta volatilidad, baja solubilidad y algunos de ellos presentan CL_{50} bajas. Por lo cual, se ha propuesto su incorporación en formulaciones que permitan controlar o reducir tales limitaciones. De tal manera, la nanotecnología se ha empleado como una alternativa, ya que permite mejorar la actividad biológica de los AE, evitando su degradación química y física, controlando la liberación y contribuyendo en la dispersión de los AE en sistemas acuosos. Particularmente, la formulación con nanopartículas ha sido mayormente efectiva debido a que permite mejorar la biodisponibilidad y bioeficacia de los AE, reduciendo así los efectos adversos y permitiendo un aumento de los niveles de concentración en el tejido a tratar. Debido a esto, en los últimos años se ha investigado el uso de NP con el objetivo de proteger y mantener las propiedades de los AE; así mismo, el desarrollo de investigaciones sobre el empleo de nanoformulaciones con un gran número de fármacos han mostrado efectos sobre la reducción de las dosis necesarias, así como de las reacciones adversas que estos ocasionan. Sin embargo, es fundamental destacar que a pesar del desarrollo de estas investigaciones los riesgos asociados a la incorporación de AE en NP no son bien conocidos, razón por la cual la valoración del efecto de la CL_{50} de los AE incorporados en NP representa un campo interesante de desarrollo, muy necesario para un futuro establecimiento efectivo de administración de los AE.

4. HIPÓTESIS

La incorporación de los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. en NP aumenta sus valores de CL₅₀.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los efectos de la nanoencapsulación sobre los valores de CL₅₀ de los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. a través de los ensayos de hemólisis eritrocitaria inducida y *Artemia salina*.

Objetivos específicos

1. Obtener los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. mediante hidrodestilación y realizar su caracterización por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas.
2. Obtener y caracterizar fisicoquímicamente formulaciones de NP para cada uno de los AE.
3. Validar un método analítico de microextracción en fase sólida en modalidad *headspace* (HS-SPME) para la cuantificación de los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. por cromatografía de gases con detección de ionización de flama (CG-FID).
4. Determinar la CL₅₀ de los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L., libres y nanoencapsulados, a través de los ensayos de *Artemia salina* y hemólisis eritrocitaria inducida.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

La realización del trabajo se llevó a cabo siguiendo la estructura señalada en la Figura 2 y se especificará en las siguientes secciones.

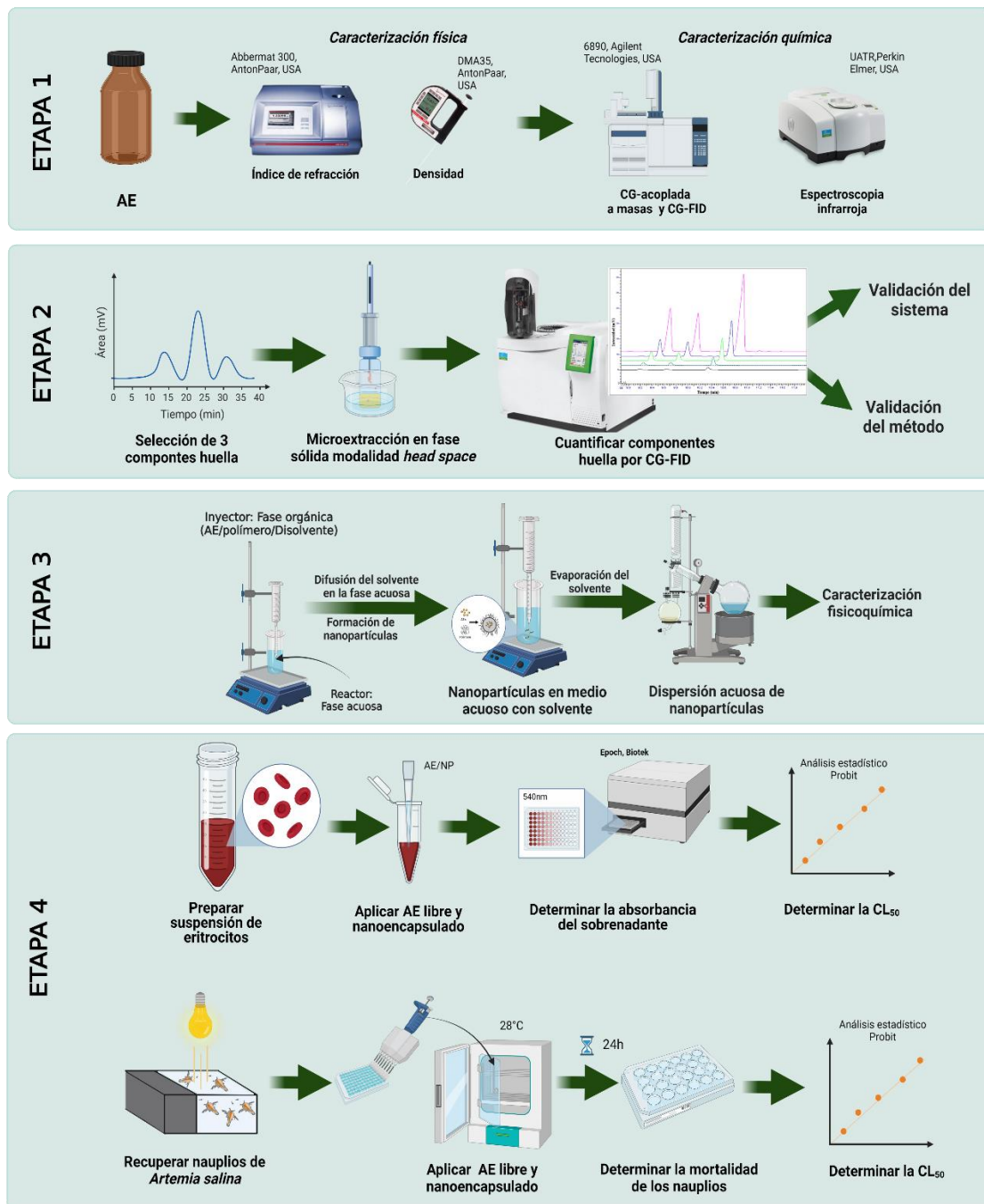


Figura 2. Etapas de desarrollo de la investigación.

6.1. Obtención y caracterización física y química de los AE

6.1.1. Obtención de los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L.

Los AE utilizados se obtuvieron, previamente, en nuestro equipo de trabajo mediante la técnica de hidrodestilación (Lugo 2018). El material vegetal fresco se colocó en un hidrodestilador tipo Clevenger (100 g/L de agua) durante 4 h. Posteriormente, se recolectaron los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. y se mantuvieron en viales de vidrio ámbar a 4 °C hasta su uso.

6.1.2. Caracterización física de los AE *S. molle* L. y *T. vulgaris* L.

Índice de refracción

El índice de refracción se determinó de acuerdo con el método general de análisis (MGA) 0741 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), empleando un refractómetro marca AntonPaar® modelo Abbermat 300, el cual se calibró con agua destilada a 25°C. Seguido a ello, se colocó una gota de cada AE en el área de muestra y se obtuvo el resultado por triplicado de manera independiente. Como control se utilizó un estándar (grado CG) de anetol.

Densidad relativa

Se determinó en base al método MGA 0251 de la FEUM empleando un densímetro marca AntonPaar® modelo DMA35. En el cual se colocó 1 mL de cada AE, determinando la densidad relativa del mismo a 25°C, por triplicado de manera independiente. Como control se utilizó un estándar (grado CG) de anetol.

6.1.3. Caracterización química de los AE *S. molle* L. y AE *T. vulgaris* L. por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y detector de ionización de flama

La identificación de los componentes volátiles del AE de *T. vulgaris* L. y AE *S. molle* L. fue determinada mediante un cromatógrafo de gases (6890N, Agilent Technologies, USA) equipado con un espectrómetro de masas selectivo (5973 INERT, Agilent Technologies, USA) con una energía de ionización de 70 eV y una columna capilar (HP-5MS, Agilent

Technologies, USA) (5 % de fenilmetilpolisiloxano, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, Agilent J&W). Las condiciones cromatográficas se establecieron en base a lo reportado por Silva-Flores (2019), aplicando los siguientes parámetros: la temperatura de fuente de ionización fue de 230 °C, la temperatura del cuádruplo de 150 °C y la temperatura del inyector de 220 °C en modo *splitless*. En cuanto al programa de temperatura del horno este inició a 35 °C y se mantuvo durante 9 min. Posteriormente, se incrementó la temperatura en intervalos de 3 °C/min, hasta llegar a una temperatura de 150 °C en la cual se mantuvo durante 10 min. Luego, se incrementó la temperatura en intervalos de 10 °C/min hasta alcanzar los 250 °C y finalmente se incrementó la temperatura en intervalos de 3 °C/min hasta 270°C manteniéndose durante 10 min. En cuanto al flujo del gas acarreador helio (99.999 % de pureza, INFRA®) este fue de 0.5 mL/min (Silva-Flores *et al.* 2019). De tal manera, los espectros de masas fueron adquiridos en modo scan, empleando esta rampa de temperatura para el análisis de ambos AE e inyectando 2 μL del AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L., de forma independiente, en una concentración de 2 mg/mL en cloruro de metileno.

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

Para determinar el área de los componentes de cada uno de los AE, se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de flama (CG-FID) con una columna capilar (HP-5MS, Agilent Technologies, USA) (5 % de fenilmetilpolisiloxano, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, Agilent J&W), aplicando el mismo programa de calentamiento del horno de CG-MS. Se calcularon los porcentajes de abundancia (%A) de los componentes del AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. relativo al área de la señal obtenida. Posteriormente, se seleccionaron tres componentes de seguimiento con respecto a su %A y actividad biológica para ser monitoreados en las formulaciones de NP. Así mismo, se calculó la proporción de cada componte en base a la normalización de áreas.

6.2. Obtención y caracterización fisicoquímica de NP con los AE

6.2.1. Obtención de NP mediante la técnica de nanoprecipitación

Las NP de ambos AE se prepararon mediante la técnica de nanoprecipitación descrita por Fessi *et al.* (1989). Para el AE de *S. molle* L. se preparó una fase orgánica compuesta por el polímero Eudragit S100 disuelto en una mezcla de acetona:isopropanol, mientras que, para el AE de *T. vulgaris* L. la fase orgánica estuvo compuesta por el polímero Eudragit L100-55 disuelto en una mezcla de acetona:isopropanol:metanol. Posteriormente, la fase orgánica se inyectó en una fase acuosa en condiciones de agitación moderada, utilizando una barra magnética. La difusión de la fase orgánica en la fase acuosa indujo la agregación del polímero y la encapsulación de los AE en las NP. Finalmente, el disolvente se eliminó a presión reducida (Evaporador rotativo, Control Laborota 4003, Heidolph Instruments, GER). Las NP sin AE (NP-BCO) se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

6.2.2. Caracterización fisicoquímica de las NP con AE

La caracterización fisicoquímica de las formulaciones se determinó en una dispersión acuosa de NP-AE.

Distribución de tamaño de partícula

Como parámetro principal a seguir se estableció un valor de diámetro promedio de NP alrededor de 200 nm. Con el fin de conseguir una formulación versátil para diferentes vías de administración (Armendáriz-Barragán 2016). Este parámetro se midió en un ángulo de dispersión de 90 grados utilizando la técnica de dispersión dinámica de la luz, en un Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA).

Índice de polidispersidad (IP)

Por otro lado, en cuanto al IP, parámetro asociado a la homogeneidad de la dispersión de NP, se estableció un valor a seguir menor a 0.200, debido a que este valor es indicador de una distribución homogénea del tamaño de nanopartículas (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004). Este parámetro se midió en un ángulo de dispersión de 90 grados utilizando la dispersión dinámica de la luz, en un Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA).

Potencial zeta

Así mismo se evaluaron las propiedades electrocinéticas a través de la medición del potencial zeta. Para este parámetro se estableció como valor a seguir un resultado negativo, esto debido a las características químicas del polímero Eudragit L 100-55 y Eudragit S100, los cuales son copolímeros aniónicos conformados por ácido metacrílico y acrilato de etilo que poseen carga negativa (Piña-Barrera, 2018). Este parámetro se midió por la técnica de microelectroforesis Láser Doppler (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, UK).

Análisis de las NP por medio de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

La obtención de los espectros infrarrojo se dio en un intervalo de 400-4000 cm^{-1} y con 1 cm^{-1} de resolución, mediante el empleo de las formulaciones de NP-BCO, las NP con AE, los polímeros Eudragit L 100-55 y Eudragit S100. Cada formulación fue colocada en el prisma del ATR del espectrómetro FT-IR (UATR, Perkin Elmer, USA) y se le realizaron 64 barridos utilizando un accesorio universal de punta de diamante.

Contenido del AE en las NP

Se empleó la técnica de microextracción en fase sólida modalidad *headspace* (HS-SPME), previamente establecida por (Lugo 2012, 2019) con un método por cromatografía de gases detector de ionización de flama (CG-FID) (Lugo 2018; Piña-Barrera, 2018). Posterior a ello, se calcularon los porcentajes de encapsulación (% E) y el porcentaje de eficiencia de encapsulación (% EE) con las Fórmulas 1 y 2, respectivamente.

Fórmula 1

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

Fórmula 2

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

6.3. Validación de los métodos de microextracción en fase sólida modalidad *headspace* (HS-SPME) para cuantificar los componentes del AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. por cromatografía de gases con detección de ionización de flama (CG-FID)

El método analítico de HS-SPME por CG-FID para la cuantificación de los componentes del AE de *S. molle* L. se realizó a partir de las condiciones cromatográficas previamente establecidas por Lugo (2018). Donde el programa del horno inició en 60 °C durante 1 min, después se calentó hasta 120 °C aumentando en intervalos de temperatura de 8 °C/min y se mantuvo durante 1 min. Posteriormente se elevó a una temperatura de 150 °C en intervalos de 25 °C/min y se mantuvo por 1 min, para finalmente aumentar la temperatura en intervalos de 8 °C/min hasta llegar a 250 °C y se mantuvo durante 1 min. La temperatura del inyector fue de 280 °C en modo *Split* (1:20), mientras que, la temperatura del detector fue de 280 °C. Se empleó helio como gas acarreador (99.999 % de pureza, INFRA®) con un flujo de 1 mL /min.

Para la técnica de HS-SPME, se emplearon las condiciones de extracción previamente establecidas en nuestro equipo de trabajo las cuales se señalan en la Tabla 4 (Lugo 2018).

Tabla 4. Condiciones óptimas para la extracción de los componentes de seguimiento con HS-SPME por CG-FID.

Parámetro	Condición óptima
Fibra para el AE de <i>S. molle</i> L.	Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)
Fibra para el AE de <i>T. vulgaris</i> L.	Poliacrilato (PA)
Volumen HS	4 mL
Velocidad de agitación	250 rpm
Distancia fibra-muestra	6 mm
Tiempo de equilibrio	10 min
Temperatura de extracción	70 °C
Tiempo de extracción	10 min

Por otro lado, para la cuantificación del AE de *T. vulgaris* L. se partió de las condiciones cromatográficas previamente establecidas por Piña-Barrera (2018). Donde la temperatura del inyector fue de 280 °C y la temperatura del detector fue de 260°C. En cuanto el

programa de calentamiento se inició en 70 °C durante 1 min. Posteriormente, se incrementó a 116 °C en intervalos de 4 °C/min y se mantuvo esta temperatura durante 1 min. Seguido a esto se incrementó en intervalos de 20 °C/min hasta alcanzar 200 °C y, posteriormente, se aumentó en intervalos de 14 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 230 °C. En cuanto a la técnica de *HS-SPME* para el aceite AE *T. vulgaris* L. se utilizaron las mismas condiciones mencionadas en la Tabla 4.

6.3.1. Validación de los métodos analíticos por CG-FID para cuantificar los AE en NP

Los métodos analíticos se validaron bajo los criterios establecidos en la Guía para la Validación de Métodos Físicoquímicos de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de la Cobertura de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P058, 2011). Se realizó a partir de métodos analíticos de ambos AE, previamente validados en nuestro equipo de trabajo (Lugo 2018; Piña-Barrera 2018). Para la validación del sistema se determinaron los parámetros de linealidad, límite de detección y de cuantificación, mientras que, para la validación del método, se determinaron los parámetros de precisión intradía y precisión interdía.

6.3.2. Validación de los sistemas de *HS-SPME* por CG-FID

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

➤ Linealidad

La determinación de la linealidad del sistema se realizó a través de la construcción de la curva de calibración, para el AE de *S. molle* L. los niveles de concentración total de estándares fueron de 4, 8, 16, 32 y 64 µg/mL y para el AE de *T. vulgaris* L. de 8, 16, 32, 64 y 128 µg/mL por triplicado. En donde la mezcla de estándares se sometió a la técnica de *HS-SPME* (Tabla 4) y analizado por CG-FID. Con las áreas obtenidas en función de la

concentración se graficó la respuesta cromatográfica y se realizó un análisis de regresión lineal. Los criterios de linealidad determinados para la curva de calibración fueron:

Coefficiente de determinación (r^2): indica la variación de la respuesta cromatográfica respecto a la variación de la concentración. Este parámetro debe ser mayor a 0.99 (CCAYAC-P058, 2011).

Coefficiente de correlación (r): indica que tanto los datos obtenidos de los estándares se ajustan a una línea recta, obteniendo que un valor cercano a 1, posee un mayor grado de correlación lineal de la respuesta cromatográfica obtenida con las concentraciones analizadas. Este parámetro debe ser mayor a 0.99 (CCAYAC-P058, 2011).

➤ Límite de detección

La pendiente y la ordenada al origen que se obtuvieron del análisis de regresión de la linealidad fueron utilizadas para calcular el límite de detección con la Fórmula 3:

$$\text{LDD} = \frac{3.3 * sb_o}{m} \qquad \text{Fórmula 3}$$

Dónde:

Sb_o : desviación estándar de la ordenada al origen.

m : pendiente de la curva de calibración.

➤ Límite de cuantificación

La pendiente y la ordenada al origen que se obtuvieron a partir del análisis de regresión de la linealidad fueron utilizadas para calcular el límite de cuantificación con la Fórmula 4:

$$\text{LDC} = \frac{10 * sb_o}{m} \qquad \text{Fórmula 4}$$

Dónde:

Sb₀: desviación estándar de la ordenada al origen.

m: pendiente de la curva de calibración.

6.3.3. Validación de los métodos de *HS-SPME* por *CG-FID*

Para la validación de los métodos se emplearon las NP de los dos AE de forma independiente y se llevó a cabo mediante la determinación de la precisión intradía (repetibilidad) y precisión interdía (precisión intermedia) siguiendo la siguiente metodología.

➤ Precisión intradía (repetibilidad)

La determinación de la precisión intradía se realizó analizando las NP cargadas con los respectivos AE, por sextuplicado y de forma independiente, el mismo día y por el mismo analista. Posteriormente, se calculó la desviación estándar relativa (DER) de los datos de área y tiempo de retención. Se estableció un criterio de aceptación de DER < 6% (AOAC Internacional, 2012).

➤ Precisión interdía

La determinación de la precisión interdía se realizó analizando las NP cargadas con los respectivos AE, por sextuplicado y de forma independiente, en tres días no consecutivos y por el mismo analista. Posteriormente, se calculó la desviación estándar relativa (DER) de los datos de área y tiempo de retención. Se estableció un criterio de aceptación de DER < 10% (AOAC Internacional, 2012).

6.4. Determinación de la CL₅₀ de los AE de *S. molle* L. y AE de *T. vulgaris* L. libres y nanoencapsulados

La determinación de la CL₅₀ de los AE libres y nanoencapsulados fue evaluada por dos métodos.

6.4.1. Ensayo de hemólisis eritrocitaria inducida

La determinación de la CL₅₀ de los AE de *S. molle* L. y AE de *T. vulgaris* L. libres y nanoencapsulados se evaluaron a través del ensayo modificado de Rodríguez *et al.* (2015). Inicialmente, a la muestra de sangre total se le realizaron lavados con solución salina inyectable (SSI), para obtener una suspensión de eritrocitos. Así mismo, se preparó un sistema de trabajo (ST) de los AE y NP utilizando SSI como diluyente.

Posteriormente, se elaboraron sistemas de prueba por triplicado se colocaron cada una de las cinco concentraciones diferentes de los AEs y AEt libres y nanoencapsulados y 250µL de la suspensión de eritrocitos. Una vez elaborados los sistemas, se incubaron a 37°C por 30 min y posteriormente se centrifugaron. El sobrenadante, se transfirió a una placa de 96 pocillos donde se determinó la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 540 nm en un lector de microplacas (Espectrofotómetro Epoch, Biotek). Finalmente, se calculó el porcentaje de hemólisis de cada muestra (Fórmula 5). Los controles positivo y negativo fueron elaborados reemplazando la muestra con un volumen igual de agua destilada y SSI, respectivamente.

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(ABS_{Mta} - ABS_0)}{(ABS_C - ABS_0)} \times 100 \quad \text{Fórmula 5}$$

Dónde:

ABS_{Mta}: Absorbancia de la muestra problema.

ABS₀: Absorbancia de la solución salina inyectable.

ABS_C: Absorbancia del control positivo (agua destilada).

6.4.2. Ensayo de *Artemia salina*

La determinación de la CL₅₀ de los AE de *S. molle* L. y AE de *T. vulgaris* L. libres y nanoencapsulados se evaluó mediante el ensayo con *Artemia salina* modificado en microplaca descrito por Hamidi *et al.* (2014). Inicialmente, para la eclosión de los nauplios de *A. salina* se utilizó una cámara de dos compartimientos, uno oscuro y el otro iluminado. La cámara se acondicionó con solución salina al 3.8% y se oxigenó a través de un sistema de burbujeo constante. Una vez condicionadas las variables se adicionaron los quistes a la cámara en el compartimiento oscuro y se incubaron durante un periodo de 24 h. Tras la incubación en microplacas de 24 pocillos, se elaboraron sistemas de prueba de los AE y NP, en los cuales se colocaron 20 nauplios por pocillo y se expusieron a cinco concentraciones diferentes de AE de *S. molle* L. y AE de *T. vulgaris* L. libres y nanoencapsulados por un periodo de 24 horas. Al finalizar el tiempo de exposición, se contabilizaron el número de organismos muertos para determinar la tasa de mortalidad. El dicromato de potasio al 1% (p/v) y la solución salina fueron utilizados como controles positivo y negativo, respectivamente.

6.5. Análisis de datos

Para la etapa de formulación de NP se realizaron 3 repeticiones de cada uno de los sistemas. Posteriormente, para la caracterización de las NP los parámetros distribución de tamaño, índice de polidispersidad y potencial zeta se midieron tres veces a través del equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA).

Para evaluar la determinación de la CL₅₀ en el ensayo de hemólisis eritrocitaria y *Artemia salina* se realizó un análisis estadístico tipo PROBIT, utilizando el programa IRMA Qcal Versión 0.02.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización física y química de los AE

Con el propósito de determinar si existen nuevas interacciones entre los componentes de ambos AE se realizó un análisis por espectroscopia de infrarrojo. En la Figura 3 y 4, se observa la comparación de los espectros actuales con los reportados por Lugo (2018) y Piña-Barrera (2018), para los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L., respectivamente.

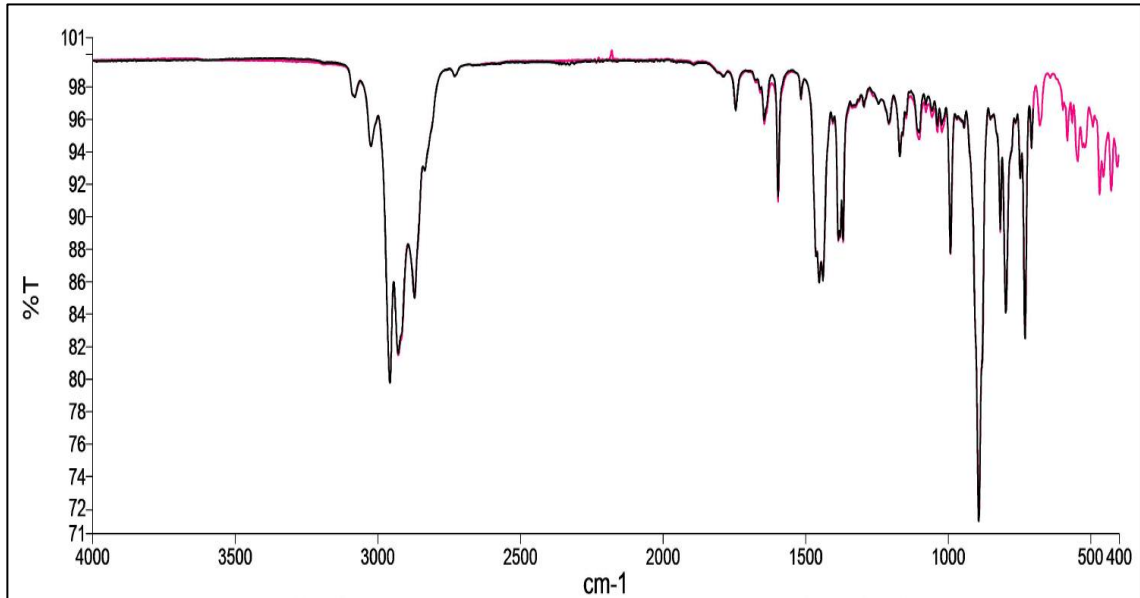


Figura 3. Comparación de los espectros de FT-IR de AE *S. molle* L. del 2022 (rosa) y 2016 (negro).

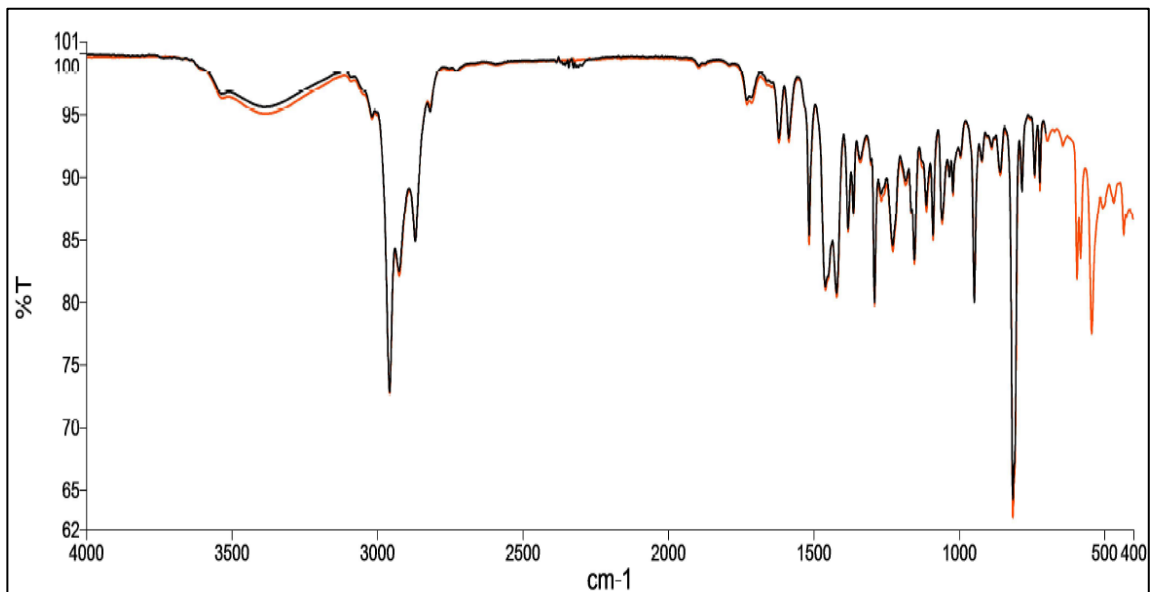


Figura 4. Comparación de los espectros de FT-IR de AE *T. vulgaris* L. del 2022 (naranja) y 2016 (negro).

7.1.1. Caracterización física de los AE *S. molle* L. y *T. vulgaris* L.

La caracterización física de los AE obtenidos se realizó de acuerdo con los Métodos Generales de Análisis descritos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), determinando el índice de refracción y la densidad relativa; se empleó el anetol como control en la determinación de las propiedades físicas considerando sus características fisicoquímicas descritas en la FEUM. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de los AE de *S. molle* L. y el AE de *T. vulgaris* L.

Tabla 5. Caracterización física de los AE de *T. vulgaris* L. y AE de *S. molle* L. y del anetol (control) ($\bar{X} \pm$ DE; n=3).

Parámetro físico	Índice de refracción 25°C	Densidad relativa (g/mL)
Anetol (Control)	1.559 \pm 0.000	0.987 \pm 0.001
Anetol (FEUM)	1.557 y 1.561	0.983 - 0.988
AE <i>T. vulgaris</i> L	1.494 \pm 0.000	0.914 \pm 0.004
AE <i>S. molle</i> L.	1.471 \pm 0.000	0.827 \pm 0.003

7.1.2. Caracterización química de los AE *S. molle* L. y AE *T. vulgaris* L. por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y detector de ionización de flama

La caracterización química de los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. se realizó por CG-MS y CG-FID, obteniendo así los espectros de ambos AE (Figura 5 y 6). Los componentes, tiempo de retención y porcentaje de abundancia se muestran en la Tabla 6.

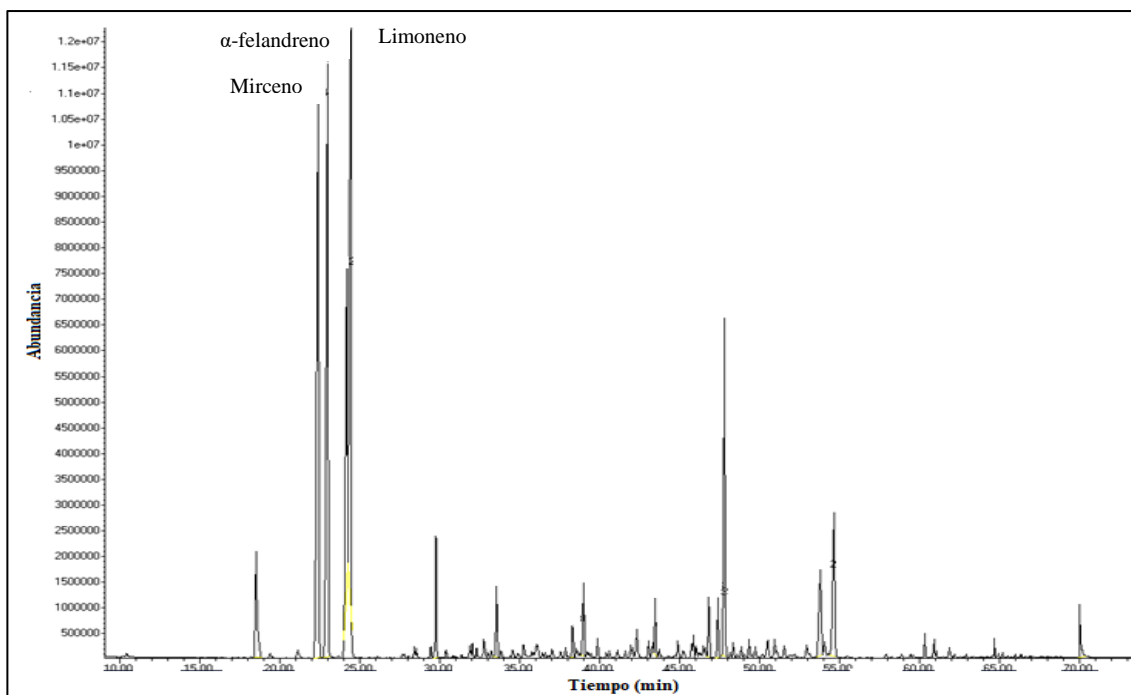


Figura 5. Espectro del AE de *S. molle* L. analizado por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-MS).

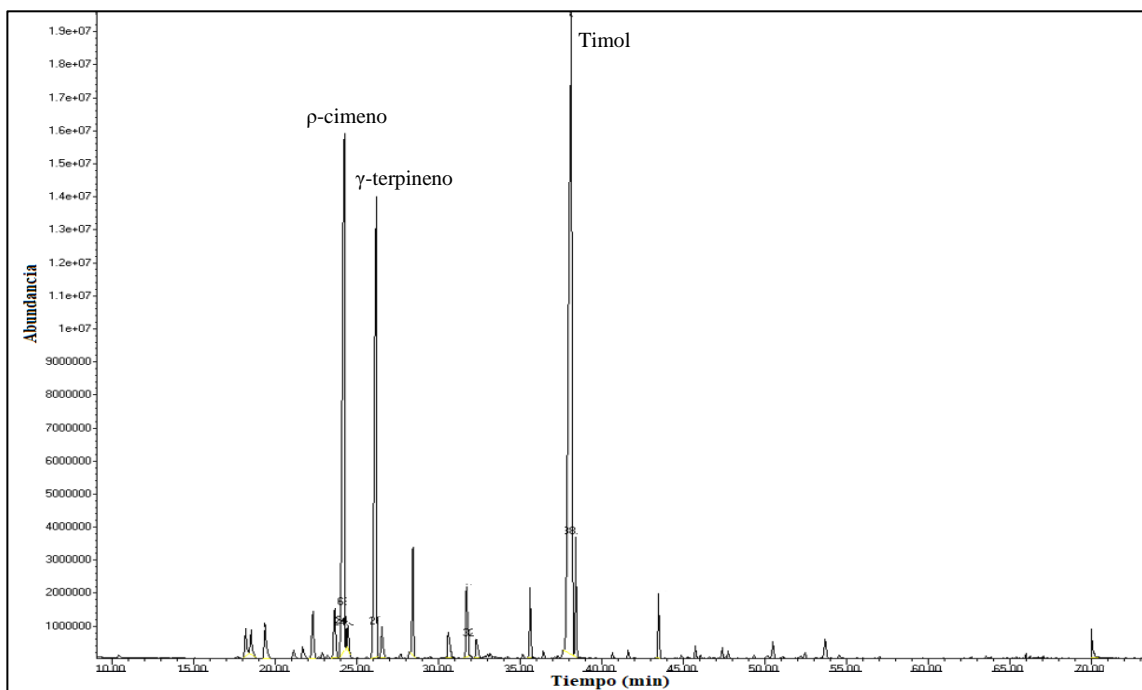


Figura 6. Espectro del AE de *T. vulgaris* L. analizado por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-MS).

Tabla 6. Composición química de los AE de *T. vulgaris* L. y AE de *S. molle* L. analizados por CG-MS.

Componentes	AE de <i>S. molle</i> L.		AE de <i>T. vulgaris</i> L.	
	tR (min)	% A	tR (min)	% A
Monoterpenos hidrocarbonados				
α -felandreno	23.02	18.85	---	---
α -pineno	18.54	0.30	18.54	0.07
α -terpineno	---	---	23.66	1.42
α -tujeno	---	---	18.22	0.28
β -mirceeno	22.44	28.73	22.32	1.64
Canfeno	---	---	19.41	0.06
Limoneno	24.22	37.77	---	---
ρ -cimeno	---	---	24.26	20.07
Silvestreno	---	---	24.39	0.01
γ -terpineno	---	---	26.21	18.09
Total		85.65		41.64
Monoterpenos oxigenados				
Alcanfor	---	---	30.61	0.10
Borneol	---	---	31.74	2.31
Carvacrol	38.31	0.24	38.42	1.72
1,8-cineol	---	---	24.51	0.12
cis- β terpineol	---	---	26.56	0.09
(-)-cis sabinol	33.55	0.15	---	---
Linalol	---	---	28.46	3.23
2,3-Pinanediol	38.99	0.11	---	---
Terpien-4-ol	---	---	32.33	0.06
Timol	---	---	38.16	49.18
Total		0.5		56.81
Sesquiterpenos hidrocarbonados				
α -muuroloeno	46.83	0.08	---	---
Cariofileno	43.48	0.21	43.49	0.01
δ -cadineno	47.82	7.67	---	---
γ -cadineno	47.39	0.16	---	---
Total		8.12		0.01
Sesquiterpenos oxigenados				
α -cadinol	54.66	4.86	---	---
Tau-muurolol	53.82	0.17	---	---
Total		5.03		0
Otros				
Adipato de dioctilo	70.03	0.22	70.03	1.25
Benceno, 1 methoxy-4methyl-2(1-methylethyl)	---	---	35.62	0.28
Metilo octanoato	28.779	0.47	---	---
Total		0.69		1.53

tR: tiempo de retención (min), %A: Porcentaje de abundancia relativo al área total.

7.2. Obtención y caracterización fisicoquímica de NP con los AE

En este estudio se obtuvieron NP con cada uno de los AE con las características fisicoquímicas distribución de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta, los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Características fisicoquímicas de NP obtenidas por la técnica de nanoprecipitación ($\bar{X} \pm DE$; n=3).

Sistema	Tamaño (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
NP-BCO Eudragit L100-55 ¹	156.67 \pm 1.45	0.120 \pm 0.010	-28.70 \pm 0.85
NP-AE <i>T. vulgaris</i> L.	187.77 \pm 4.80	0.100 \pm 0.030	-32.93 \pm 2.28
NP-BCO Eudragit S100 ²	89.62 \pm 5.65	0.142 \pm 0.010	-16.40 \pm 2.43
NP-AE <i>S. molle</i> L.	98.71 \pm 4.48	0.156 \pm 0.015	-20.56 \pm 1.61

¹ NP-BCO que corresponden a formulación empleada para el AE de *T. vulgaris* L.

² NP-BCO que corresponden a formulación empleada para el AE de *S. molle* L.

En cuanto al análisis por FT-IR se utilizaron los componentes de las NP para cada AE, en el caso de la formulación del AE de *S. molle* L. se empleó el polímero Eudragit L100-55 y el AE; mientras que para la otra formulación se utilizó el polímero S100, Poloxamer 188 y el AE de *T. vulgaris* L. En la Figura 7 y 8 se muestran los espectros infrarrojos de los componentes, así como el de las NP de cada uno de los AE.

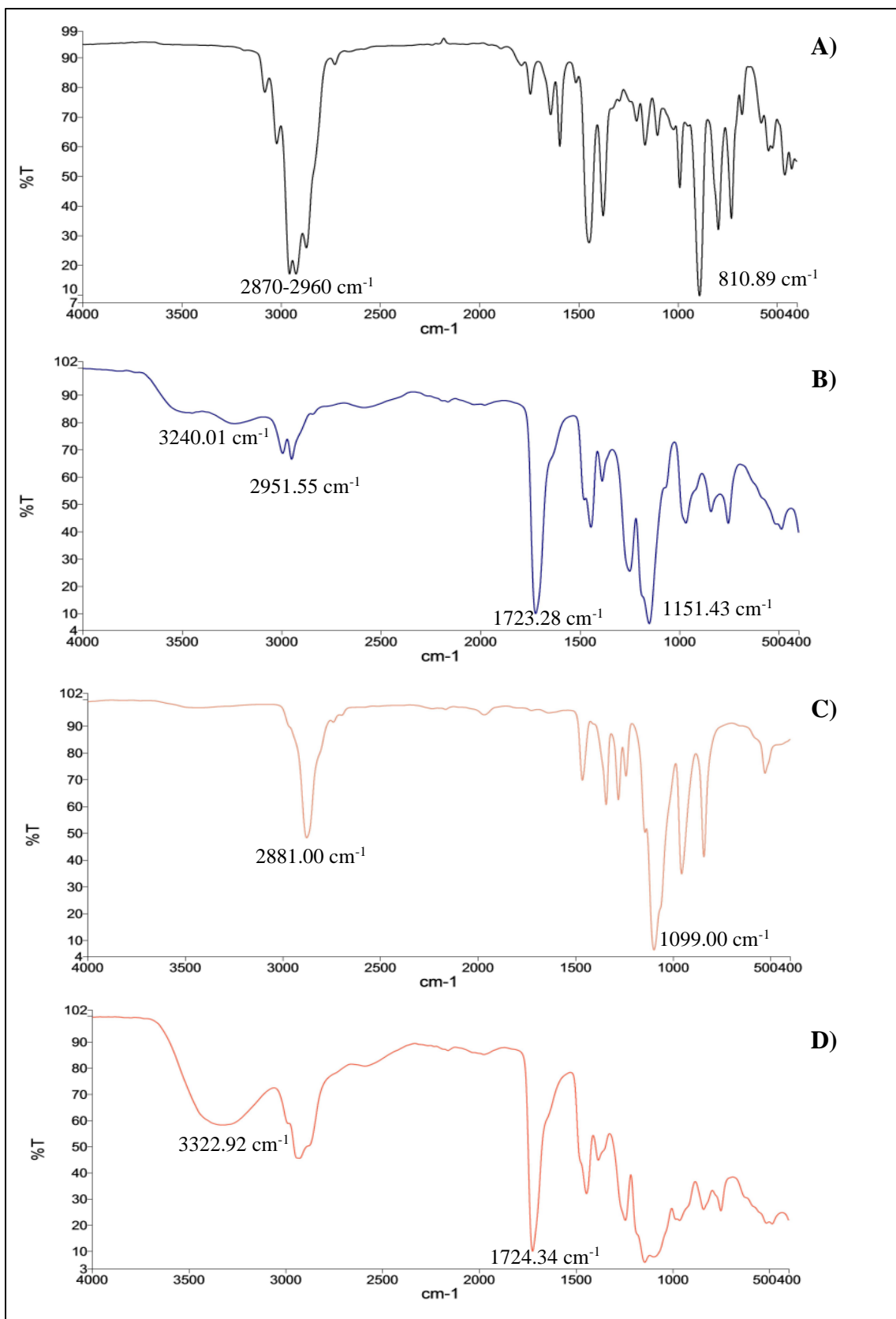


Figura 7. Espectros de FT-IR de AE *S. molle* L. (A), Eudragit S100 (B), Poloxamer 88 (C) y NP-AE (D)

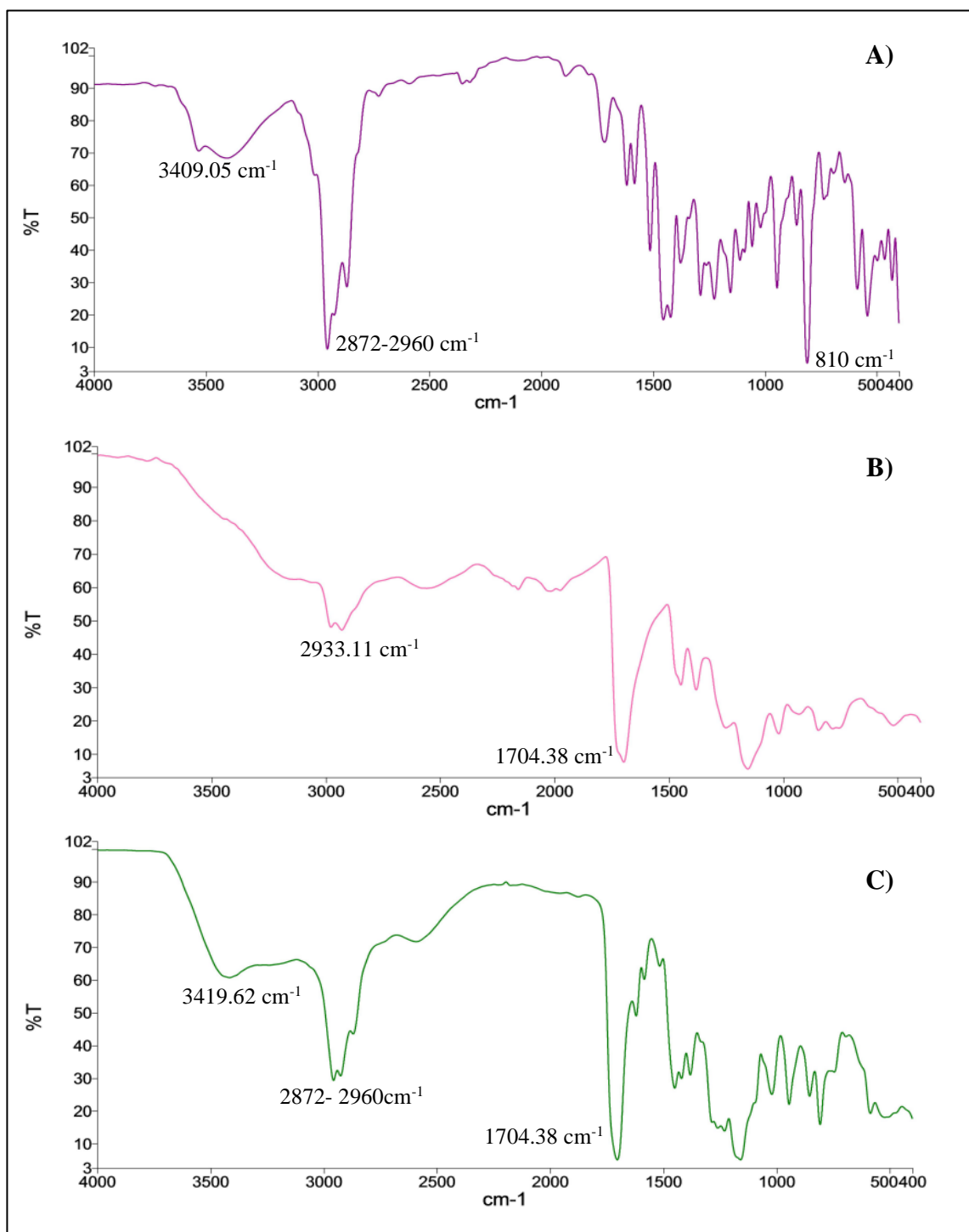


Figura 8. Espectros de FT-IR de AE *T. vulgaris* L. (A), Eudragit L100-55 (B) y NP-AE (C)

Las NP con ambos AE fueron sometidas a la técnica de *HS-SPME* y analizadas por el método de CG-FID previamente validado. En las Figuras 9 y 10 se muestran los cromatogramas obtenidos de las NP del AE de *S. molle* L. y AE de *T. vulgaris* L.

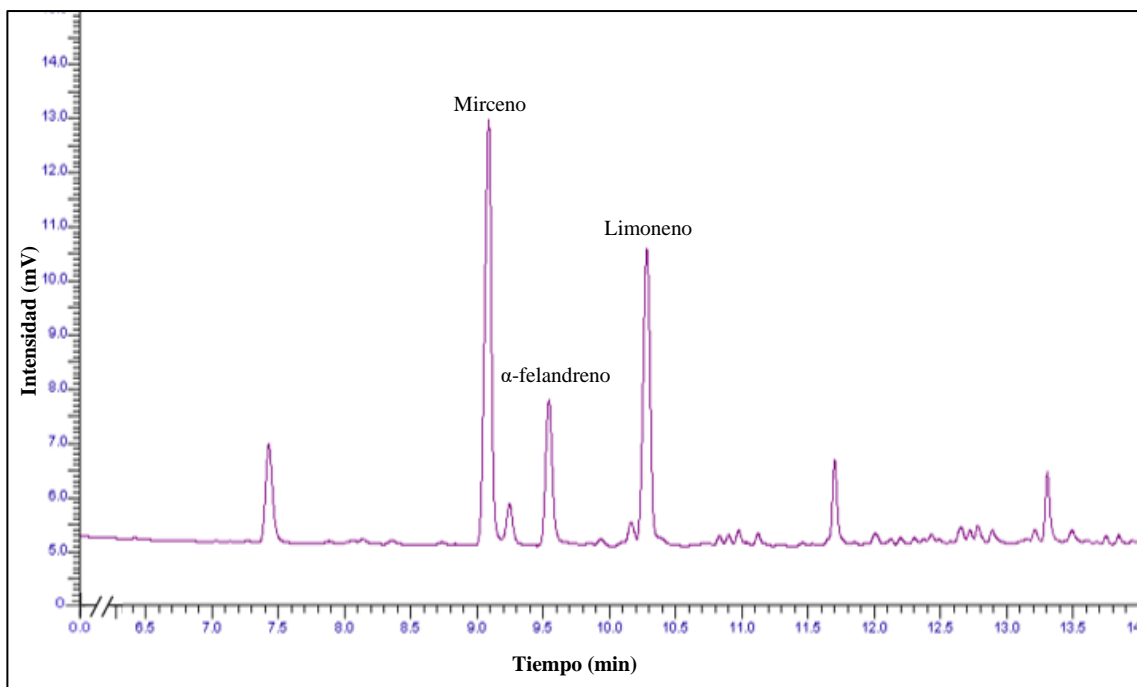


Figura 9. Cromatograma de las NP con AE de *S. molle* L. obtenido con *HS-SPME* por *CG-FID*.

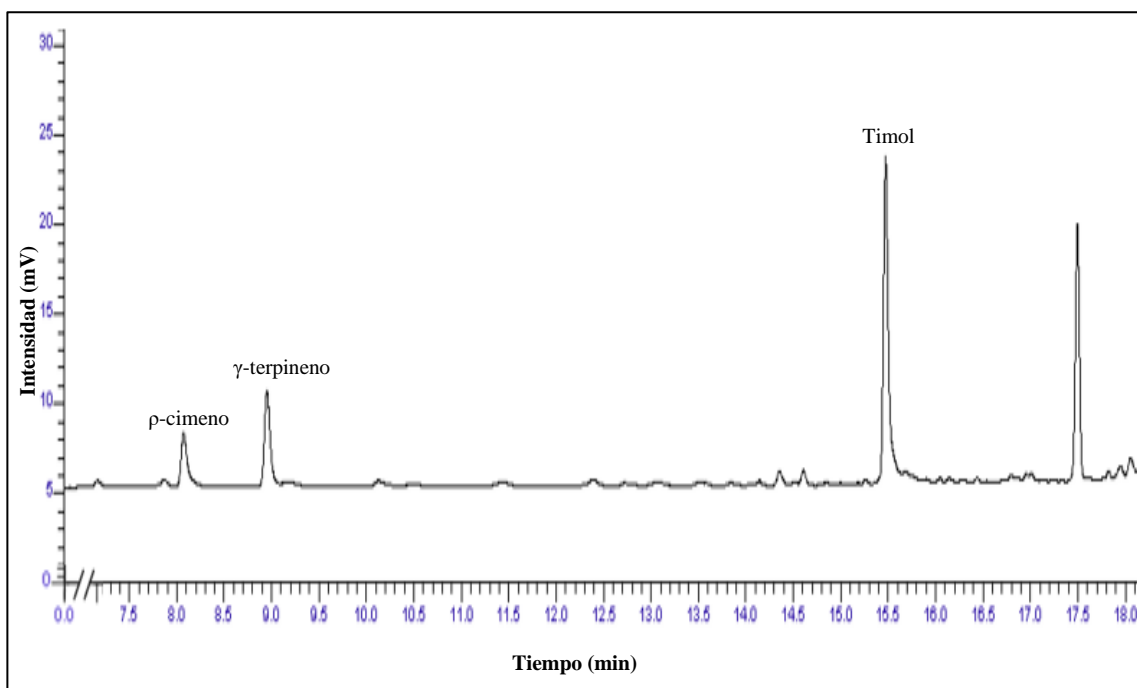


Figura 10. Cromatograma de las NP con AE de *T. vulgaris* L. obtenido con *HS-SPME* por *CG-FID*.

Posteriormente, se cuantificó el AE incorporado en las NP, valores con los que se calculó el % E y el % EE con las Fórmulas 1 y 2, respectivamente. En la Tabla 8 se presentan los % E y % EE de cada uno de los tres componentes de seguimiento de cada AE.

Tabla 8. Porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación de los AE de *T. vulgaris* L. y AE de *S. molle* L. obtenidos por con *HS-SPME* por *CG-FID* (\bar{X} ; n=3).

AE	Compuesto	Porcentaje de encapsulación (%E)	Porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE)
<i>S. molle</i> L.	Mirceno	0.17 %	1.11 %
	α -felandreno	0.04 %	0.38 %
	Limoneno	0.11 %	0.61 %
<i>T. vulgaris</i> L.	ρ -cimeno	1.59 %	8.86 %
	γ -terpineno	2.59 %	9.41 %
	Timol	27.95 %	77.60 %

7.3. Validación de los métodos de microextracción en fase sólida modalidad *headspace* (HS-SPME) para cuantificar los componentes del AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. por cromatografía de gases con detección de ionización de flama (CG-FID)

El método analítico para el AE de *S. molle* L. se desarrolló bajo las condiciones establecidas por Lugo (2018), mientras que, el método analítico del AE de *T. vulgaris* L. se desarrolló bajo las condiciones establecidas por Lugo (2012) y Piña-Barrera (2018). Los cromatogramas obtenidos para el AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. realizados con *HS-SPME* y los correspondientes programas cromatográficos, se visualizan en las Figuras 11 y 12.

Para la cuantificación de los componentes de seguimiento del AE *T. vulgaris* L. y el AE de *S. molle* L., se realizó una curva de calibración con cinco niveles de concentración total de la mezcla de estándares de los componentes de seguimiento que fueron seleccionados previamente para su cuantificación en las NP (Figura 13 y 14).

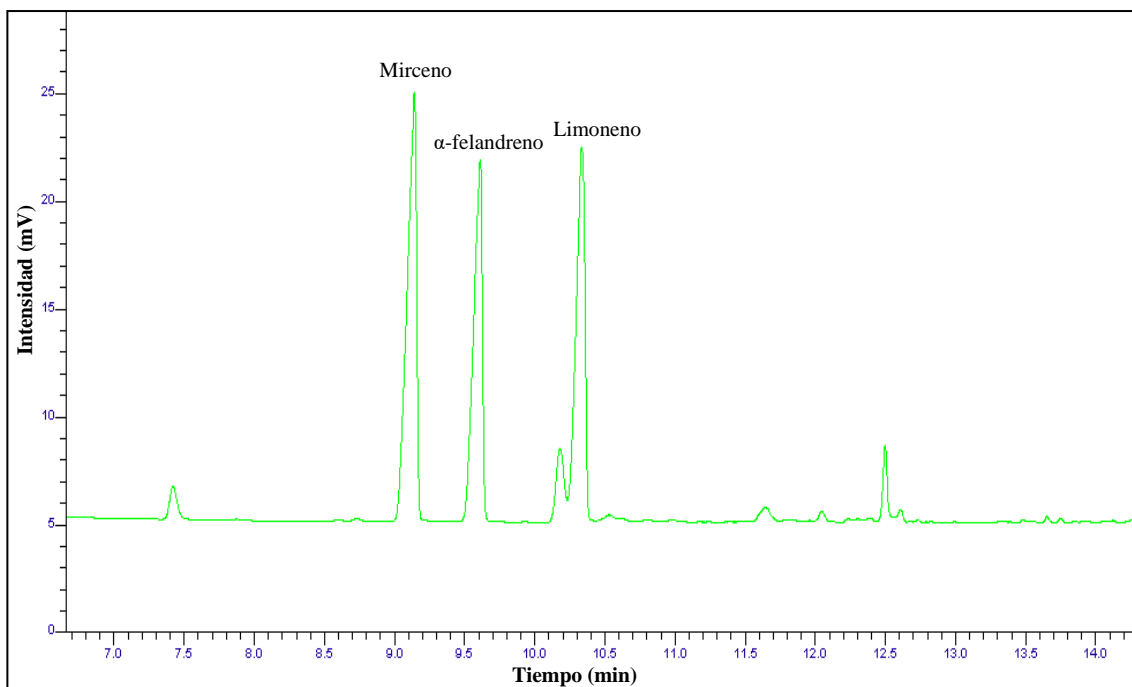


Figura 11. Cromatograma del AE de *S. molle* L. (200 µg/mL) obtenido con *HS-SPME* por *CG-FID*.

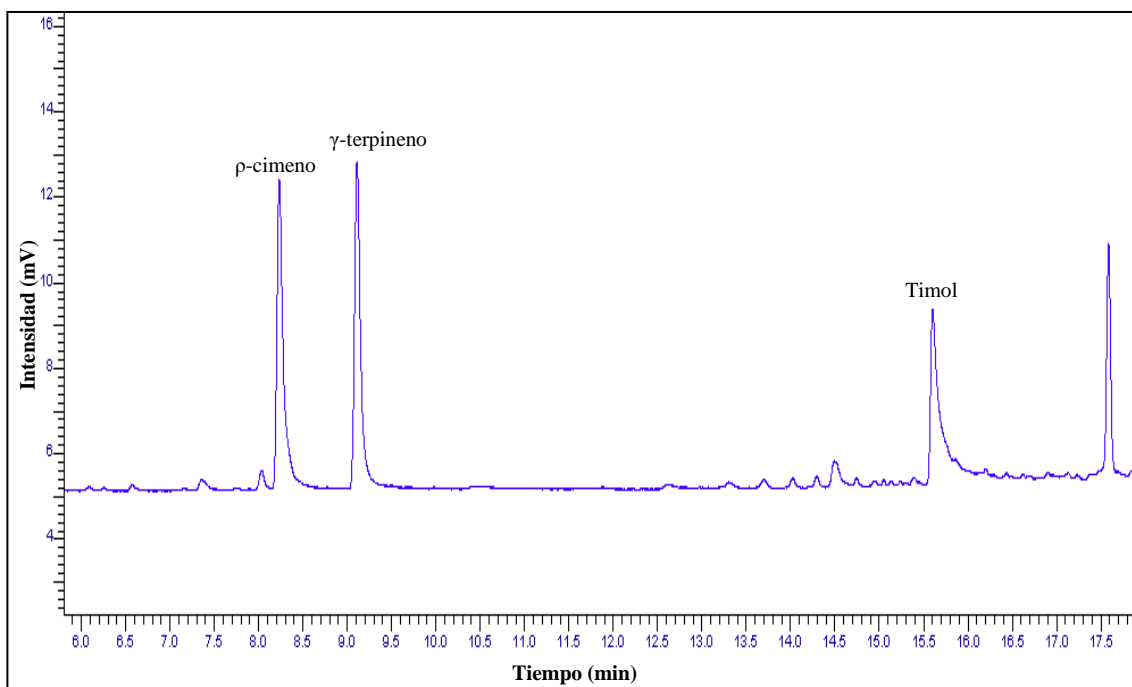


Figura 12. Cromatograma del AE de *T. vulgaris* L. (200 µg/mL) obtenido con *HS-SPME* por *CG-FID*.

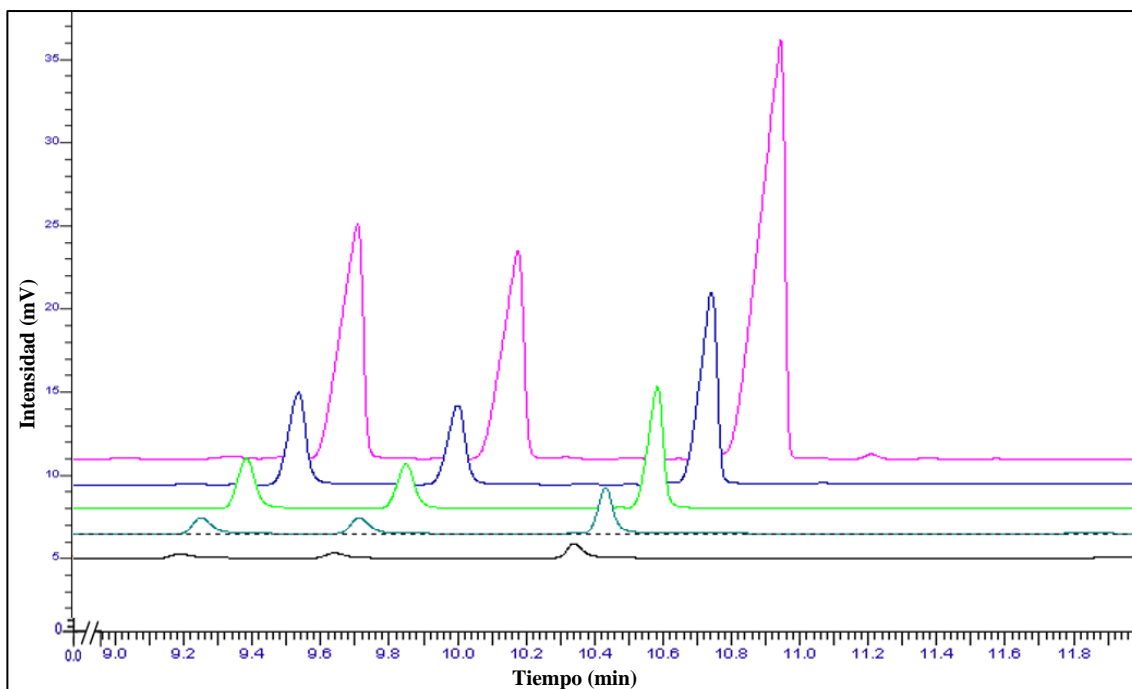


Figura 13. Cromatogramas obtenidos de la curva de calibración de la mezcla de estándares de seguimiento para el AE de *S. molle* L.: mirceno, α -felandreno y limoneno (4-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con *HS-SPME* por CG-FID.

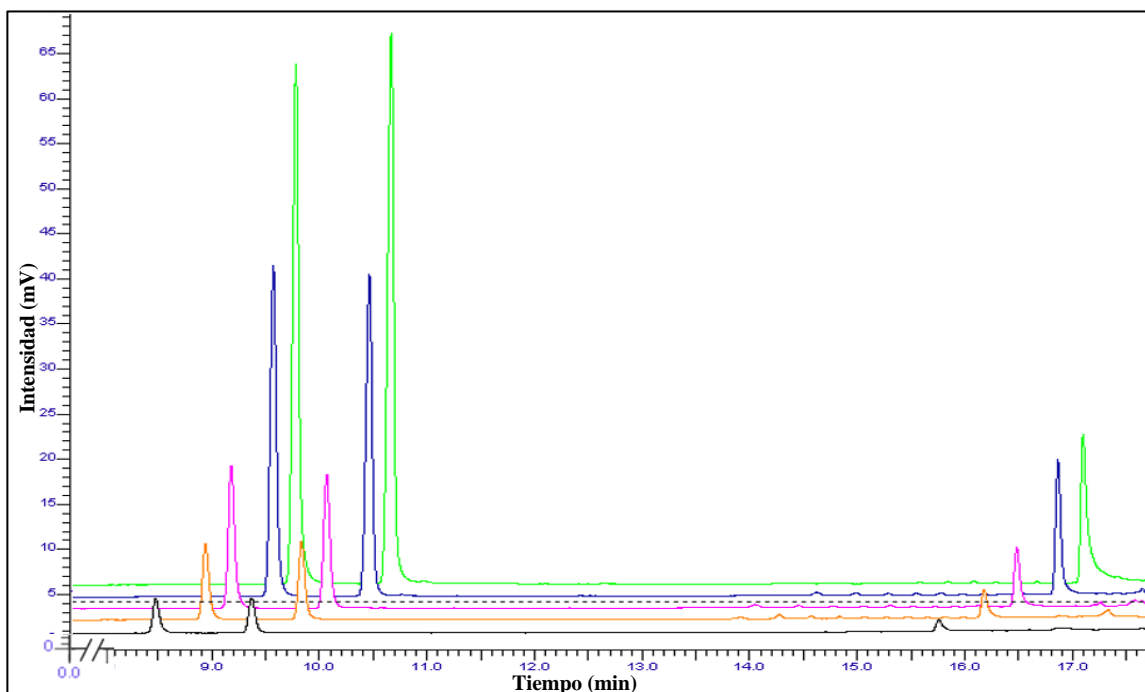


Figura 14. Cromatogramas obtenidos de la curva de calibración de la mezcla de estándares de seguimiento para el AE de *T. vulgaris* L.: ρ -cimeno, γ -terpineno y timol (8-128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con *HS-SPME* por CG-FID.

En la Tabla 9 se muestran los parámetros de validación del método evaluados para cuantificar los componentes de seguimiento del AE de *S. molle* L. En la Tabla 10 se observan los parámetros de validación del método del AE. *T. vulgaris* L.

Tabla 9. Parámetros de validación del método analítico para el AE de *S. molle* L.

Validación del método analítico para el AE de <i>S. molle</i> L.			
Validación del sistema			
Parámetro	Mirceno	α-felandreno	Limoneno
Coeficiente de determinación (r^2)	0.992	0.993	0.994
Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)	0.36	0.20	0.45
Límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)	1.10	0.60	1.35
Validación del desempeño del método			
Precisión intradía del tiempo (D.E.R)	0.24 %	0.22 %	0.15 %
Precisión interdía del tiempo (D.E.R)	1.19 %	1.15 %	0.86 %
Precisión intradía del área (D.E.R)	2.67 %	4.18 %	2.39 %
Precisión interdía del área (D.E.R)	4.39 %	4.81 %	4.20 %

Tabla 10. Parámetros de validación del método analítico para el AE de *T. vulgaris* L.

Validación del método analítico para el AE de <i>T. vulgaris</i> L.			
Validación del sistema			
Parámetro	ρ-cimeno	γ-terpineno	Timol
Coeficiente de determinación (r^2)	0.994	0.992	0.993
Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)	0.36	0.47	0.29
Límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)	1.10	1.41	0.87
Validación del desempeño del método			
Precisión intradía del tiempo (D.E.R)	0.17 %	0.14 %	0.04 %
Precisión interdía del tiempo (D.E.R)	1.71 %	1.63 %	0.72 %
Precisión intradía del área (D.E.R)	5.01 %	4.82 %	0.95 %
Precisión interdía del área (D.E.R)	4.92 %	4.94 %	2.08 %

7.4. Determinación de la CL₅₀ de los AE *S. molle* L. y AE *T. vulgaris* L. libres y nanoencapsulados

7.4.1. Ensayo de hemólisis eritrocitaria inducida

En la Figura 15 se muestran la determinación de la CL₅₀ de los AE libres y encapsulados en el ensayo de hemólisis eritrocitaria inducida.

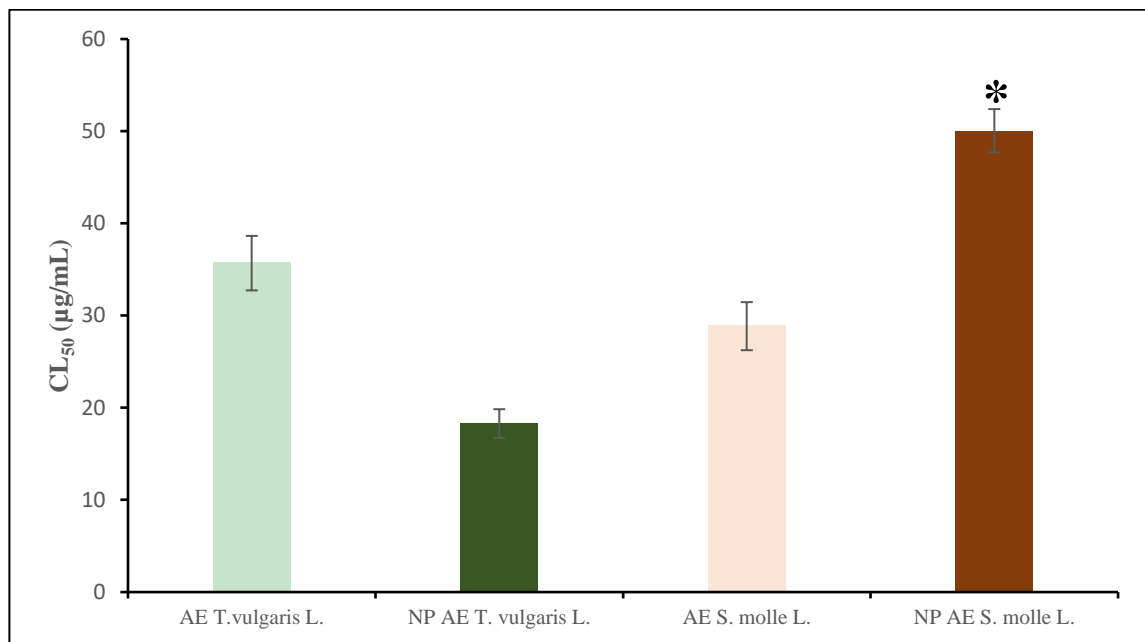


Figura 15. Valores de CL₅₀ de AE de *T. vulgaris* L. y AE de *S. molle* L. mediante el ensayo de hemólisis ($\bar{X} \pm DE$; n=3). *Concentración máxima utilizada (no corresponde a la CL₅₀).

7.4.2. Ensayo de *Artemia salina*

En la Figura 16 se muestran la determinación de la CL_{50} de los AE libres y encapsulados en el ensayo de *Artemia salina*.

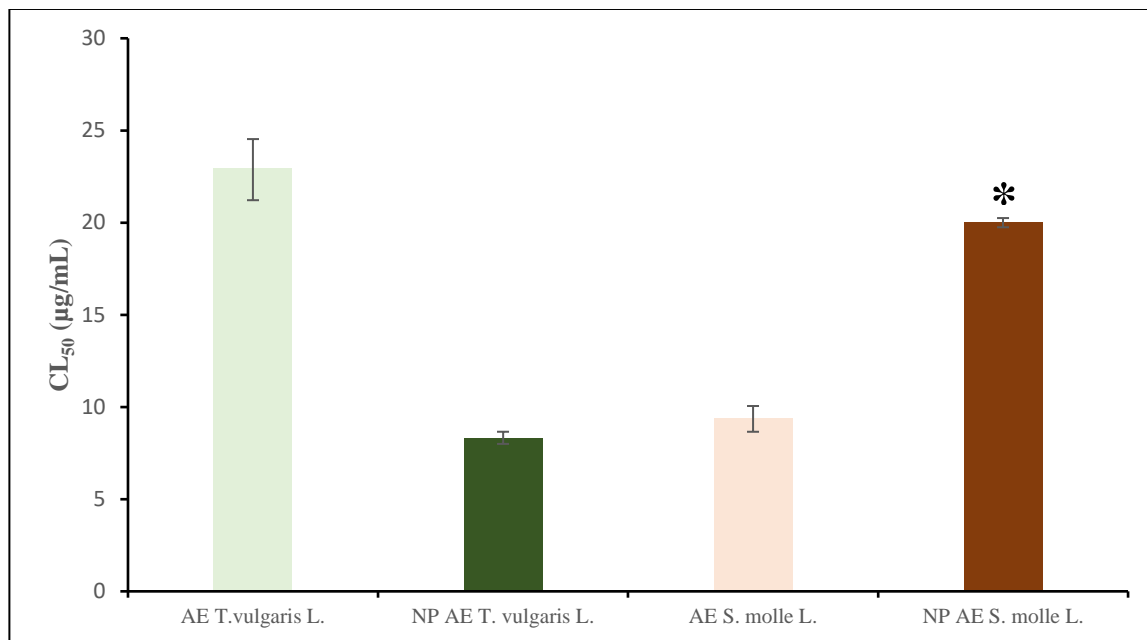


Figura 16. Valores de CL_{50} de AE de *T. vulgaris* L. y AE de *S. molle* L. mediante el ensayo de *Artemia salina* ($\bar{X} \pm DE$; n=3). *Concentración máxima utilizada (No corresponde a la CL_{50}).

8. DISCUSIÓN

Con el propósito de determinar si los AE mantenían su estabilidad química, se realizó un análisis por espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier. En la Figura 3 y 4, se observan los espectros actuales de los AE obtenidos en 2022 y los de 2018 para realizar una comparación. En ambas figuras de los AE, no se observa la presencia de nuevas bandas, lo que indica que no hay formación de nuevos componentes ni interacciones entre los componentes, asegurando así que ambos AE fueron estables en ese periodo de tiempo.

La caracterización física de los AE obtenidos se realizó determinando el índice de refracción y la densidad relativa, empleando el anetol como estándar de control en la determinación de las propiedades físicas en base a sus características fisicoquímicas descritas en la FEUM. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de los AE de *S. molle* L. y el AE de *T. vulgaris* L., observando que para el parámetro de índice de refracción se obtuvo un valor de 1.471 ± 0.000 para AE de *S. molle* L. y 1.494 ± 0.000 para el AE de *T. vulgaris* L., mientras que, para el parámetro de densidad relativa se obtuvo un valor de 0.827 g/mL para AE de *S. molle* L. y 0.914 g/mL para el AE de *T. vulgaris* L. Estos valores fueron comparados con los obtenidos por Piña-Barrera (2018) y Lugo (2018), quienes reportaron valores del índice de refracción de 1.481 ± 0.006 para el AE de *S. molle* L. y 1.412 ± 0.007 para el AE de *T. vulgaris* L. En cuanto a la densidad reportaron un valor de 0.840 ± 0.006 g/mL para el AE de *S. molle* L. y 0.904 ± 0.004 g/mL para el AE de *T. vulgaris* L., observando en ambos casos que no hay diferencia significativa.

Así mismo, los resultados coinciden con lo mencionado en la literatura, ya que se han reportado valores de índice de refracción de 1.479 y densidad de 0.901 g/mL para el AE de *S. molle* L. (Plaza y Ricalde 2015) y para el AE de *T. vulgaris* L. se indican valores de índice de refracción de 1.491 y densidad de 0.800 g/mL (Balanta *et al.* 2013). Por otro lado, el índice de refracción y la densidad relativa son medidas de calidad de los AE, las cuales están directamente relacionadas con la composición del AE (Delgado *et al.* 2016). Por lo cual, al analizar los valores obtenidos del AE de *T. vulgaris* L., se observó que sus valores de índice de refracción y densidad coinciden parcialmente con los valores reportados del timol (1.5204 y 0.9699 g/mL, respectivamente) (NCBI 2022d), ya que, si

bien es el componente principal del AE, contiene 18 componentes más. De igual forma, en el caso del AE de *S. molle* L., al ser el limoneno el componente principal, los valores obtenidos de índice de refracción y densidad relativa son ligeramente menores a 1.473 y 0.841 g/mL, valores reportados para este compuesto (NCBI 2022b). Así mismo, ambos AE reportaron valores de índice de refracción mayores a 1.4700 lo que indica la presencia de compuestos alifáticos y/o aromáticos oxigenados (SSA 2011) y una alta calidad de ambos AE (Belkhodja *et al.* 2016), lo cual coincide con lo obtenido en la caracterización química de ambos AE.

La caracterización química de los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. se realizó por CG-MS y CG-FID. Al analizar los resultados, el AE de *S. molle* L. mostró la presencia de 15 componentes (Tabla 6, Figura 5), con una composición general de 85.65% de monoterpenos hidrocarbonados, 0.5% de monoterpenos oxigenados, 8.12% de sesquiterpenos hidrocarbonados, 5.03% de sesquiterpenos oxigenados y un 0.69% de otros componentes. Identificando como compuestos mayoritarios al α -felandreno (18.85 %), mirceno (28.73 %) y limoneno (37.77 %). Resultados que coinciden parcialmente con lo reportado por Alnawari *et al.* (2018) y Osman *et al.* (2021) quienes señalan que el AE de *S. molle* L. posee una mayor cantidad de monoterpenos (67.81 %). Además, de identificar como principales monoterpenos al α -felandreno (26.24 %), mirceno (21.57 %), D-limoneno (7.93 %), β -felandreno (7.28 %) y α -pineno (2.69 %). En contraste, Muhl *et al.* (2015) reportaron que el AE de *S. molle* se caracterizó principalmente por la presencia de biclogermacreno (20.5 %), β -cariofileno (19.7 %), espafitano (19.2 %), globulol (9.5 %), germacreno-D (7.4 %), óxido de cariofileno (5.3 %) y terpinen-4-ol (1.2 %). Cabe mencionar que la composición de los AE puede presentar gran variabilidad, aún entre individuos de la misma especie, debido a diversos factores como el método de extracción, clima, composición del suelo, zona geográfica de recolección, entre otros (Delgado *et al.* 2016).

Por otro lado, el análisis del AE de *T. vulgaris* L. mostró la presencia de 19 componentes (Tabla 6, Figura 6), dentro de los cuales se identificaron como componentes mayoritarios al γ -terpineno (18.29 %), *p*-cimeno (20.29 %) y timol (49.18 %). Además, de identificar una composición general de 41.64 % de monoterpenos hidrocarbonados, 56.81% de

monoterpenos oxigenados, 0.1 % de sesquiterpenos hidrocarbonados y el 1.53% de otros componentes. Tales resultados coinciden con lo reportado por Borugă *et al.* (2014) quienes reportaron que para el AE de *T. vulgaris*, los principales componentes fueron *p*-cimeno (8.41%), γ -terpineno (30.90%) y timol (47.59%). De igual manera, Abdulrahman *et al.* (2017) mencionan que los principales componentes fueron timol, canfeno, cariofileno, humuleno, α -terpeniol y *p*-cimeno. En contraste, Ballester-Costa *et al.* (2013), reportaron la presencia de linalool (44%) como componente principal, seguido de terpineol-4 (11.84%), γ -terpineno (8.91%) y β -mirceno (6.89%). No obstante, estas diferencias se deben principalmente a que las especies de *Thymus* poseen seis quimiotipos diferentes los cuales pueden contener como componente principal un derivado fenólico (*e.g.* timol o carvacrol) o un alcohol (*e.g.* linalool, geraniol, tujanol-4 o α -terpineol), la distinción de estos quimiotipos se realiza de acuerdo con el compuesto principal detectado en el AE, lo cual sugiere que el AE de *T. vulgaris* L. analizado en este trabajo pertenece al quimiotipo timol (Satyal *et al.* 2016).

En este estudio se obtuvieron NP con AE con las características fisicoquímicas presentadas en la Tabla 7. Dentro de las características evaluadas la distribución del tamaño de partícula fue uno de los más importantes, debido a que es un parámetro que forma parte de las “tres D” (dimensión, dosis y durabilidad), parámetros evaluados para la determinación de los efectos adversos para la salud de los sistemas nanométricos (Crisponi *et al.* 2017). De tal manera, en el presente estudio se obtuvo un tamaño promedio de 187.77 y 98.71 nm, para NP-AE de *T. vulgaris* L. y NP-AE de *S. molle* L., respectivamente, lo que es adecuado debido a que se ha reportado que el tamaño influye directamente en el área superficial y, a su vez, con el efecto biológico específico de la(s) sustancia(s) ya sea, favoreciéndolo o disminuyéndolo. De esta forma, cuanto más pequeñas sean las partículas, mayor será la relación superficie/volumen y, por lo general, más pronunciada será su interacción con el sistema biológico (Zoroddu *et al.* 2014). Por ejemplo, se ha observado que NP con valores menores a 100 nm poseen una mayor superficie en relación con su masa total, lo que aumenta la posibilidad de interactuar con biomoléculas circundantes e inducir un efecto no deseado (Shang *et al.* 2014). A su vez, se ha observado que la adhesión de opsonina aumenta en relación con el tamaño de la NP, obteniendo que en NP pequeñas la activación eficiente del complemento se logra con

menor facilidad que en NP más grandes, favoreciendo su fagocitosis (Hillaireau 2016). En particular, Oropesa y Jáuregui (2012) establecen que partículas con tamaños mayores a 200 nm pueden activar el sistema inmunológico y ser aclaradas en la sangre por las células Kupffer.

Con relación al potencial zeta en ambos casos se obtuvo un potencial zeta negativo lo cual puede ser beneficioso. Se ha observado que en NP con carga negativa poseen interacciones débiles con las biomembranas a pesar de la formación de coronas de proteínas, ya que las membranas poseen carga negativa, llevando así a una baja toxicidad. Por otro lado, con NP con carga positiva, las coronas de proteínas pueden ser más estables, viéndose reducida su interacción con las membranas plasmáticas. Sin embargo, las coronas de proteínas pueden degradarse en los lisosomas y las superficies positivas de las NP quedarían expuestas nuevamente, lo que genera una fuerte interacción entre las membranas lisosomales y una citotoxicidad significativa (Shao *et al.* 2015). De igual manera, Cho *et al.* (2014) determinaron que partículas cargadas positivamente interactúan más intensamente con las membranas celulares cargadas negativamente, mostrando actividad hemolítica. En contraste, partículas cargadas negativamente no mostraron actividad hemolítica detectando así una respuesta dependiente de la dosis para partículas cargadas positivamente con una excelente correlación del potencial hemolítico y el potencial zeta. En cuanto al parámetro de IP se obtuvo un valor a 0.200 lo cual indica una distribución homogénea del tamaño de nanopartículas (Galindo-Rodríguez *et al.* 2004), permitiendo que las interacciones individuales de las NP (*e.g.* bioadhesión, liberación) también sean homogéneas (Piña-Barrera 2019).

Por otro lado, para identificar los grupos funcionales y las interacciones químicas entre los componentes de las formulaciones, se utilizó espectroscopia infrarroja (IR) en la región media del espectro infrarrojo (MID-FTIR). Los gráficos de correlación IR obtenidos expresan las frecuencias de vibración en número de onda, las cuales se atribuyen al estiramiento y flexión de vibraciones que caracterizan a los grupos funcionales (Bañuelos-Valenzuela 2017). Para el AE de *S. molle* L. el espectro de IR muestra tres bandas en la región $2870\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$ que se refieren a las deformaciones axiales de enlaces CH dobles y pueden representar alquenos aromáticos (De Conto *et al.* 2021). En cuanto a

la banda en la región 810 cm^{-1} es característica de la deformación del carbono trisustituído en alquenos; mientras que la banda de la región 1447 cm^{-1} indica la deformación angular CH_2 , señales presentes en compuestos como el limoneno, α -pineno y mirceno (França *et al.* 2021). En cuanto al polímero S100 se observaron bandas en la región $3240\text{-}2951\text{ cm}^{-1}$ los cuales pertenecen a la presencia de O-H (ácido carboxílico), mientras que, las bandas de la región 1724 cm^{-1} se deben a la presencia de O-C=O (éster) (Mehta *et al.* 2013). En el caso del poloxamer este se caracterizó por la presencia de bandas en la región 2881 cm^{-1} pertenecientes al estiramiento C-H alifático y 1099 cm^{-1} correspondientes al estiramiento C-O (Garala *et al.* 2013). Con respecto a las NP con el AE de *S. molle* L. se observó un decremento en las señales de banda de $2870\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$ y un incremento en las bandas de la región 3322 cm^{-1} , lo que se debe a que el AE está encapsulado en la NP (Piña-Barrera 2018).

Por otra parte, para el AE de *T. vulgaris* L. el espectro IR muestra un pico a 3409 cm^{-1} , el cual se debe al estiramiento de los grupos O-H (Begines *et al.* 2020), uniones fuertes de hidrógeno en agua de hidratación o alcohol y fenol, relacionadas principalmente con los componentes carvacrol, timol, linalol y terpineno (Bañuelos-Valenzuela 2017). En cuanto a las bandas que se muestran en la región de $2872\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$, estas se relacionan con los estiramientos C-H asimétricos y simétricos en grupos alifáticos $-\text{CH}_3$ (Chaib *et al.* 2021), presentes en compuestos como el carvacrol, timol y terpineno (Bañuelos-Valenzuela 2017). Por otro lado, las bandas observadas en las regiones de $860\text{ a }810\text{ cm}^{-1}$ están relacionadas con el plano aromático C-H y la flexión fuera del plano, lo que comprueba la presencia de anillos aromáticos (Catauro *et al.* 2017). En el espectro del polímero Eudragit 100-55 se observó la presencia de bandas en la región 3419 cm^{-1} que indica la presencia de grupos (O-H) (Begines 2020). Así mismo, se observaron bandas en la región 2960 cm^{-1} , que pertenecen a grupos de estiramientos CH_2 , mientras que, los picos en la región de 2872 cm^{-1} indicaron vibraciones simétricas y asimétricas del grupo CH_3 alifático (Bañuelos-Valenzuela 2017). En la región 1723 cm^{-1} se observa la banda característica de las vibraciones del grupo carbonilo (C=O) pertenecientes al ácido carboxílico, así como vibraciones pertenecientes al grupo éter (C-O-C) en la región $1155\text{-}1251\text{ cm}^{-1}$ (Piña-Barrera 2018). En el caso de la NP con el AE de *T. vulgaris* L. se observó una diferencia

en la intensidad de las bandas. Particularmente, se observó un aumento en la región 3419 cm^{-1} y un decremento en la región 2872-2960 cm^{-1} , lo cual se debe a que el AE está incorporado en la NP (Piña-Barrera 2018). Además, no se presentó ninguna banda nueva, lo que indica que no se produjo ninguna interacción directa entre los componentes del AE y la cadena del polímero (Moustafine *et al.* 2006).

Posteriormente, se cuantificó el AE incorporado en las NP con *HS*-SPME por CG-FID y se calculó el % E y el % EE (Tabla 8). Se determinó el % E de los tres componentes de seguimiento de cada uno de los AE, obteniendo para el AE de *S. molle* L. un 0.17 % para el mirceno, un 0.04 % para el α -felandreno y 0.11 % para el limoneno, teniendo así un % E total de 0.32 %; mientras que para el AE de *T. vulgaris* L. se obtuvo un % E de 1.59 % para el p -cimeno, un 2.59 % para el γ -terpineno y un 27.95 % para el timol, teniendo un % E total de 32.13 %, lo que indica que un 0.32 % de las NP del AE de *S. molle* L. y un 32.13 % de la NP de *T. vulgaris* L. están conformadas por los componentes de seguimiento, mientras que, el resto corresponde al Eudragit S100 y Eudragit E100-55, respectivamente. Por otra parte, para las NP del AE de *S. molle* L., se obtuvo un % EE de 1.11 % para el mirceno, un 0.38 % para el α -felandreno y 0.61 % para el limoneno, con un % EE total de 2.10 %. En las NP del AE de *T. vulgaris* L. se obtuvo un % EE de 8.86 % para el p -cimeno, un 9.41 % para el γ -terpineno y un 77.60 % para el timol, con un % EE total de 95.86 %, lo que indica que los componentes de ambos AE fueron encapsulados en un 2.10 % para el AE de *S. molle* L. y un 95.87 % para el AE de *T. vulgaris* L. La diferencia en cuanto al % EE total de las NP para cada uno de los AE se puede deber a diversos factores como el pH del medio, características superficiales de la NP o la naturaleza del polímero, relación AE-polímero en la formulación, orden de adición del AE a la formulación, tipo de tensoactivo utilizado, así como, a las propiedades fisicoquímicas de los componentes del AE (Zielińska *et al.* 2020). En el caso de las NP del AE de *T. vulgaris* L., se observó que entre mayor sea la presión de vapor del componente menor fue su % EE. Teniendo así que el timol con una presión de vapor baja (0.016 mmHg a 25 °C) (NCBI 2022d) fue el componente con mayor % EE (77.60%); mientras que el p -cimeno con una presión de vapor alta (1.550 mmHg a 25 °C) (NCBI 2022c) fue el componente con menor % EE (8.86 %). Por otro lado, en las NP del AE de

S. molle L. se observó un bajo % EE para los tres compuestos esto podría deberse a que poseen valores de presión de vapor altos, por lo que, al momento de la purificación de las NP por evaporación a presión reducida, se podría favorecer su pérdida, lo cual coincide con Lammari *et al.* (2020) quienes evaluaron tres métodos de eliminación del solvente de las NP, obtenido que la evaporación del solvente a presión reducida a 40 °C y a temperatura ambiente condujo a la pérdida del 50 % del AE, mientras que, con la evaporación del solvente a presión normal a temperatura ambiente se observó una pérdida insignificante del AE. De igual manera, Salas-Cedillo (2016) reportó porcentajes de eficiencia de encapsulación mayores para los tres componentes de seguimiento (mirceno, α -felandreno y limoneno) que los obtenidos en este trabajo, lo cual podría deberse principalmente a que el método de purificación de NP utilizado por Salas-Cedillo fue por diálisis. Sin embargo, otros factores como el tamaño de partícula y la afinidad de los componentes con el polímero también pudieron influir. Particularmente, se ha observado que los monoterpenos oxigenados (*e.g.* timol) son más polares que otros componentes, por lo que, son mayormente atraídos por las partes polares de los compuestos tensoactivos y el material polimérico de la cubierta de la NP; mientras que los componentes apolares (*e.g.* mirceno, α -felandreno, γ -terpineno y limoneno) de los AE son atraídos a la cadena hidrocarbonada del surfactante (Chaib *et al* 2021).

Debido a que los métodos analíticos de ambos AE ya se habían validado previamente en nuestro equipo de trabajo (Lugo 2018; Piña-Barrera 2018) se realizó la confirmación del desempeño del método analítico. Se evaluaron los parámetros de linealidad, límite de detección y límite de cuantificación, mientras que para el método se evaluó la precisión intradía e interdía.

Con respecto a la linealidad se observó que para ambos AE las curvas de calibración de los componentes huella fueron lineales en los intervalos de concentración probados, ya que los valores de r^2 son mayores que 0.990, lo que indica que los resultados son directamente proporcionales a la cantidad de analito en una muestra, dentro del intervalo de concentración definido en el método (ICH, 2005).

En cuanto, a los límites de detección y cuantificación de los componentes analizados se observó que en todos los casos los valores obtenidos fueron menores que el nivel inferior empleado en las curvas de calibración de ambos AE, lo que indica que los métodos optimizados poseen una sensibilidad adecuada para los análisis (Pico *et al.* 2022).

Por otro lado, para la validación del método de *HS-SPME-CGFID* se emplearon NP cargadas con los respectivos AE. En las Tablas 6 y 7 se observa la presión del desempeño de método la cual se evaluó en términos de precisión intradía (repetibilidad) y precisión interdía (precisión intermedia) obteniendo valores de % D.E.R en un intervalo de 0.03 a 5.01, lo que concuerda con lo establecido por la Health Canadá (HC) quien señala que el % D.E.R deber ser $\leq 5\%$, aunque en algunos casos puede alcanzar valores del 10 % (Shabir 2004). De igual forma, la AOAC (2011) establece que los % D.E.R deben ser menores al 15 %, lo que indica que para ambos AE el desempeño de los métodos es preciso durante el mismo día, así como, en distintos días no consecutivos.

El ensayo de hemólisis eritrocitaria inducida es empleado para evaluar la hemocompatibilidad del material en el huésped (Radulović 2017). Los resultados para este ensayo mostraron para el AE de *S. molle* L. una CL_{50} de 28.95 $\mu\text{g/mL}$, lo que podría estar relacionado con sus componentes mayoritarios. Sin embargo, tanto el mirceno como el α -felandreno han sido reportados como componentes con baja toxicidad oral aguda, razón por la cual son empleados como aditivos alimentarios en una amplia variedad de productos de consumo (National Toxicology Program 2010; Surendran *et al.* 2021). No obstante, en el caso del limoneno, componente que se encuentra en una mayor proporción en el AE de *S. molle* L. se ha reportado inducción de síntomas de toxicidad, tales como ataxia, sedación, mareos, hiperventilación y pérdida de peso (De Almeida *et al.* 2012). Además, se ha demostrado que algunas propiedades fisicoquímicas de los monoterpenos se encuentran relacionadas con la interacción en las membranas de los eritrocitos. Particularmente, se ha relacionado que existe una relación directa de la lipofilicidad con el aumento de la habilidad de traspasar membranas biológicas por medio de difusión simple. De tal manera, el limoneno al ser un compuesto hidrofóbico (LogP 4.5), posee

mayor capacidad de difusión a través de la membrana de los eritrocitos que otros componentes (Comini *et al.* 2006). Así mismo, Zamora (2020) reportó que el limoneno posee una CL_{50} de 27.52 $\mu\text{g/mL}$, valor cercano al presentado en este estudio para el AE de *S. molle* L., por lo que se le podría atribuir la actividad citotóxica del AE.

Con relación al AE de *S. molle* L. incorporado en las NP, se reportó una CL_{50} mayor a 50 $\mu\text{g/mL}$, reflejando así un aumento en el valor de CL_{50} del AE encapsulado con respecto al libre (Figura 15). Además, se evaluaron las NP sin AE a las concentraciones empleadas, observando que la NP sin AE no mostraba actividad hemolítica, por lo que no interfería en la determinación del valor de CL_{50} de la NP con el AE. De tal manera, el aumento del valor de la CL_{50} se puede atribuir a la cantidad de limoneno presente en las NP, ya que tuvo un % EE bajo (0.61 %), modificando así su proporción presente en el AE libre, al ser 162 veces menor la cantidad de limoneno presente en las NP. Cabe mencionar que se ha reportado que el limoneno posee una relación directamente proporcional entre la mortalidad del modelo de estudio y la dosis administrada (De Almeida *et al.* 2012).

Por otro lado, el AE de *T. vulgaris* L. presentó un valor de CL_{50} de 35.80 $\mu\text{g/mL}$, lo cual puede estar relacionado con sus componentes mayoritarios el *p*-cimeno, timol y γ -terpineno. Sin embargo, se ha reportado que el *p*-cimeno y γ -terpineno presentan valores de concentración letal altos en determinaciones de toxicidad aguda (NCBI 2022a, 2022c). Siendo el timol el único componente que, en administración oral, podría provocar efectos adversos, tales como dolor gástrico, náuseas, vómitos, hiperactividad central, ocasionalmente convulsiones, coma, colapso cardíaco y respiratorio (NCBI 2022d). Además, se ha reportado que el timol posee una CL_{50} en el modelo de hemólisis eritrocitaria de 111.95 $\mu\text{g/mL}$ (Zamora 2020), observando una diferencia significativa con la CL_{50} del AE libre, lo cual se podría atribuir a que este componente contribuye solo parcialmente al efecto citotóxico del AE. Siendo probable que algunos otros componentes presentes en menores cantidades pudieran ejercer un efecto de sinergia o aditivo con el timol, provocando un efecto de citotoxicidad mayor (Lorenzo-Leal y López-Malo 2018). En cuanto al AE incorporado en la NP se obtuvo una CL_{50} de 18 $\mu\text{g/mL}$ observando una disminución del valor de CL_{50} con respecto al obtenido en el libre, lo cual podría ser

debido a que el timol fue el componente que tuvo un mayor %EE, lo que aumento su proporción presente en el AE. Además, se observó el aumento de otro componente el cual de acuerdo con el espectro del AE de *T. vulgaris* L. (Figura 6) podría ser el cariofileno, componente reportado con una CL₅₀ de 96.3 µg/mL en el ensayo de hemólisis, así como bajos valores de CL₅₀ en diferentes líneas celulares (Da Silva *et al.* 2008), razón por la cual este componente podría contribuir a la disminución del valor de CL₅₀ del AE incorporado en las NP.

El ensayo de *Artemia salina* se usa para determinar el efecto letal de los materiales en larvas de *Artemia salina*., permitiendo la obtención de CL₅₀ (Ávalos *et al.* 2014). Los resultados para este ensayo mostraron comportamientos similares a los reportados en hemólisis, obteniendo así que el AE de *S. molle* L. presentó una CL₅₀ de 9.38 µg/mL, como se había mencionado antes dentro de su composición química se ha descrito la presencia de limoneno componente que ocasiona efectos antinociceptivos, los cuales ocasionan un efecto depresor en el sistema nervioso central (Bhowal y Gopal 2016). Además, de ser catalogado como neurotóxico debido a que inhibe la enzima acetilcolinesterasa (Andrade-Ochoa *et al.* 2017). Efectos que pudieron ser disminuidos debido a que el % EE de este componente fue bajo cambiando la proporción en la que se encontraba en el AE libre, y, por ende, un incremento del valor de CL₅₀ del AE nanoencapsulado (> 20 µg/mL).

Por otro lado, para el AE de *T. vulgaris* L. libre se reportó una CL₅₀ de 22.94 µg/mL, atribuido al timol, monoterpeneo fenólico de carácter lipofílico que posee un alto grado de toxicidad al permeabilizar las membranas mitocondriales donde los iones de metales de transición Fe⁺⁺ y Cu⁺⁺ están secuestrados en el espacio intermembrana (Bakkali *et al.* 2008). Estos iones son de gran importancia en el nauplio de *Artemia salina*, debido a que permiten la formación de la hemoglobina, la cual interviene en la captación y transportación de oxígeno a las células (Castro-B. *et al.* 2003), por lo cual se le podría atribuir el efecto tóxico del AE. Cabe mencionar que el timol fue incorporado en las NP con un mayor % EE. Además, se observó la incorporación del cariofileno, componente que pertenece a los sesquiterpenos, los cuales han mostrado mayor actividad inhibitoria

de la acetilcolinesterasa que los monoterpenos (Arya *et al.* 2021), lo que podría haber favorecido la disminución de la CL_{50} , ya que, se ha reportado que componentes aislados de AE que presenta una alta toxicidad contra *Artemia salina* reportaron una mayor actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa (Radulović 2017).

9. CONCLUSIÓN

- La caracterización física y química de los AE de *S. molle* L. y *T. vulgaris* L. permitieron establecer que ambos AE no presentaban degradación ni formación de nuevos componentes. Además, de cumplir con los controles de calidad establecidos por la FEUM.
- La técnica de nanoprecipitación permitió obtener NP para cada AE adecuadas para su aplicación en los ensayos de hemólisis eritrocitaria inducida y *Artemia salina*. Presentando en ambos casos un tamaño promedio menor a 200 nm, un potencial zeta negativo y una distribución homogénea.
- Los métodos analíticos de microextracción en fase sólida en modalidad *headspace* (HS-SPME) por CG-FID, para la cuantificación de los componentes de seguimiento de cada AE, demostraron ser lineales, precisos, exactos y reproducibles.
- Con respecto a la determinación de los valores de CL₅₀ de los AE libres y nanoencapsulados, tanto el ensayo de hemólisis eritrocitaria inducida, como el de *Artemia salina* mostraron comportamientos similares, observando que para el AE de *S. molle* L. al ser incorporado en la NP presentó un aumento en el valor de CL₅₀, mientras que, para el AE de *T. vulgaris* L. al ser incorporado en la NP se observó un decremento en el valor de la CL₅₀. Estableciendo así, que la variación de los valores de la CL₅₀ de los AE incorporados en las NP con respecto al AE libre se debe, principalmente, a las características toxicológicas de los componentes encapsulados en mayor proporción.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de formulación para el AE de *S. molle* L. con diferentes polímeros para aumentar el % EE total.
- Realizar estudios para determinar la CL₅₀ de los componentes timol y limoneno libres y nanoencapsulados mediante hemólisis eritrocitaria inducida y *Artemia salina* para evaluar de manera directa el efecto que juega la nanoencapsulación.
- Realizar otros ensayos de toxicidad (*e.g.* teratogenicidad, genotoxicidad, inhibición de la acetilcolinesterasa, etc.) que permitan complementar los mecanismos de acción y el efecto de los AE incorporados en las NP.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adelakun OE, Oyelade OJ y Olanipekun, BF. 2016. Use of essential oils in food preservation. *Essential Oils in Food Preservation. Flavor and Safety*. 71–84.
- Alnawari, H, Demirci B, Hanoğlu A, Hanoğlu D, Çalış İ y Hüsnü Can Başer K. 2018. Chemical characterization of *S. molle* L. Essential oils from North Cyprus. *Natural Volatiles and Essential Oils*. 3: 7–12.
- Andrade-Ochoa S, Sánchez-Torres LE, y Nevárez-Moorillón GV. 2017. Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades. *Biomédica*. 37: 224–267.
- AOAC International. 2012. Guideline for Dietary Supplements and Botanical (Appendix K). *AOAC Official Method Analysis*. 8: 9,11.
- Armendáriz-Barragán B, Álvarez-Román R y Galindo-Rodríguez SA. 2016. Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro- y nanoparticulados. En: *Investigación en plantas de importancia médica*, Rivas-Morales C, Oranday-Cardenas MA & Verde-Star MJ (Eds.). OmniaScience; Barcelona, pp. 411-436.
- Arya A, Chahal R, Rao R, Rahman MH, Kaushik D, Akhtar MF, Saleem A, Khalifa SMA, El-Seedi HR, Kamel M, Albadrani GM, Abdel-Daim MM, Mittal V. 2021. Acetylcholinesterase inhibitory potential of various sesquiterpene analogues for alzheimer's disease therapy. *Biomolecules*. 11: 1–30.
- Ávalos-Soto J, Treviño-Neávez JF, Verde-Star MJ, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Moran-Martínez J, Serrano-Gallardo LB, Morales-Rubio ME. 2014. Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. *Rev. Mex. Ciencias Farm*. 45: 39–44.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol*. 46: 446–475.
- Balanta JF, Ramirez L, Caicedo LD. 2013. Características fisicoquímicas y actividad antimicótica del extracto de tomillo sobre cepas *Fusarium oxysporum*. *Ingenium* 17: 29-35

- Ballester-Costa C, Sendra E, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M. 2013. Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Ind. Crops Prod.* 50: 304–311.
- Bañuelos-Valenzuela R, Delgadillo-Ruiz L, Echavarría-Cháirez F, Delgadillo-Ruiz O, Meza-López C, 2018. Composición química y FTIR de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Agrociencia.* 52: 309–321.
- Barreras-Urbina CG, Ramírez-Wong B, López-Ahumada GA, Burruel-Ibarra SE, Martínez-Cruz O, Tapia-Hernández JA y Rodríguez FF. 2016. Nano- and Micro-Particles by Nanoprecipitation: Possible Application in the Food and Agricultural Industries. *International Journal of Food Properties.* 19: 1912–1923.
- Begines B, Ortiz T, Pérez-Aranda M, Martínez G, Merinero M, Argüelles-Arias F, Alcudia A. 2020. Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. *Nanomaterials.* 10: 1–41.
- Belkhdja H, Meddah B, Touil AT, Şekeroğlu N. 2016. Chemical Composition and Properties of Essential Oil. *World J. Pharmaceutical Sci.* 5: 108–119.
- Bendaoud H, Romdhane M, Souchard JP, Cazaux S, Bouajila J. 2010. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *S. molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. *J. Food Sci.* 75: 466–472.
- Benzi V, Stefanazzi N, Ferrero AA. 2009. Biological Activity of Essential Oils from Leaves and Fruits of Pepper Tree (*S. molle* L.) to Control Rice Weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Chil. J. Agric. Res.* 69: 154–159.
- Bhowal M, y Gopal M. 2016. Eucalyptol: Safety and Pharmacological Profile. *Journal Pharm Sci*, 4: 125–131.
- Bhunchu S, Rojsitthisak P. 2014. Biopolymeric alginate-chitosan nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *Pharmazie* 69:563–570.
- Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, y Bergonzi MC. 2014. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful

- therapeutic approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014: 1-14.
- Borugă O, Jianu C, Mișcă C, Goleț I, Gruia A, y Horhat FG. 2014. *T. vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. Journal of Medicine and Life. 3: 56–60.
- Butnariu M, y Sarac I. 2018. Essential Oils from Plants. Journal of Biotechnology and Biomedical Science 1: 35–43.
- Campos VR, Oliveira JL, De Guilger-casagrande M, Luis IS, Lima R, Castanha RF, Castro VL y Fraceto LF. 2020. Zein Nanoparticles Impregnated with Eugenol and Garlic Essential Oils for Treating Fish Pathogens. ACS Omega 5: 15557–15566.
- Castro-B., Thalía, Castro M, Castro J, Miramontes, B. 2003. Microelementos en nauplios de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) de seis poblaciones mexicanas y su relación con peces y crustáceos. Hidrobiológica, 13: 317-320.
- Catauro M, Bollino F, Tranquillo E, Sapio L, Illiano M, Caiafa I, Naviglio S. 2017. Chemical analysis and anti-proliferative activity of Campania *T. vulgaris* essential oil. J. Essent. Oil Res. 29: 461–470.
- Chaib S, Benali N, Arhab R, Sadraoui Ajmi I, Bendaoued H, Romdhane M. 2021. Preparation of *T. vulgaris* Essential Oil Microcapsules by Complex Coacervation and Direct Emulsion: Synthesis, Characterization and Controlled Release Properties. Arab. J. Sci. Eng. 46: 5429–5446.
- Chaib S, Benali N, Arhab R. 2021. Preparation of *T. vulgaris* Essential Oil Microcapsules by Complex Coacervation and Direct Emulsion: Synthesis, Characterization and Controlled Release Properties. Arab J Sci Eng. 46: 5429–5446.
- Cho WS, Thielbeer F, Duffin R, Johansson EM, Megson IL, Macnee W, Bradley M, y Donaldson K. 2014. Surface functionalization affects the zeta potential, coronal stability and membranolytic activity of polymeric nanoparticles. Nanotoxicology. 8: 202–211.
- Comini LR, Núñez SC, Argüello GA, Cabrera JL. 2006. Determinación del coeficiente de

- partición (log P) para derivados antraquinónicos aislados de *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiáceas). *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 25: 252–255.
- Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, Hernández-López M, y Marquina-Valle MÁ. 2018. Evaluación de nanoformulaciones en el desarrollo *in vitro* de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 36: 457–467.
- Crisponi G, Nurchi VM, Lachowicz JI, Peana M, Medici S, Zoroddu M.A. 2017. Toxicity of Nanoparticles: Etiology and Mechanisms, Antimicrobial Nanoarchitectonics: From Synthesis to Applications. In the book of Polymer Nanoparticles for nanomedicines (eds) Springer: Paris, pp 512-535.
- Da Silva SL, Chaar JDS, Figueiredo PD, Yano T. 2008. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amaz*. 38: 107–112.
- De Almeida AAC, Costa JP, De Carvalho RBF, De Sousa DP, De Freitas RM. 2012. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. *Brain Res*. 1448: 56–62.
- De Conto D, Dos Santos V, Zattera AJ, Santana RMC. 2021. Swelling of biodegradable polymers for the production of nanocapsules and films with the incorporation of essential oils. *Polym. Bull*. 78: 7261–7278.
- De Lira KS, De Oliveira Pereira F, De Oliveira WA, Lima IO, De Oliveira Lima E. 2012. Antifungal activity of *T. vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *rhizopus oryzae*: Interaction with ergosterol. *Molecules*. 17: 14418–14433.
- De Matos SP, Teixeira HF, De Lima AA, Veiga-Junior VF y Koester LS. 2019. Essential oils and isolated terpenes in nanosystems designed for topical administration: A review. *Biomolecules*. 9: 1–19.
- De Mendonça PM, Rodilla JM, Díez D, Elder H, Guala MS, Silva LA, Pombo EB. 2012. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (*S. molle* L.). *Molecules*. 17: 12023–12036.
- Delgado J, Grande C, Menjívar J, y Sánchez S. 2016. Relationship between refractive

- index and thymol concentration in essential oils of *Lippia organoides* Kunth. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*. 32: 127–133.
- Djilani A, y Dicko A. 2012. The Therapeutic Benefits of Essential Oils. *Nutrition, Well-Being and Health*. 155-178.
- Donsì F, Cuomo A, Marchese E y Ferrari G. 2014. Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 22: 212–220.
- Espinosa-Carranza. 2021. Valoración biofísica del carvacrol nanoencapsulado para su uso como dermoprotector. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55: 1-4.
- Flores FC, de Lima JA, Ribeiro RF, Alves SH, Rolim CM, Beck RR y da Silva CB. 2013. Antifungal Activity of Nanocapsule Suspensions Containing Tea Tree Oil on the Growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*. 175: 281–286.
- França MRD, Oliveira CBD, Franciscato LMS, Dos S, Barbosa VA, Andrich F, Barros BCB, Moritz CMF, Sakai OA. 2021. Infrared spectroscopy, chemical composition and physical-chemical characteristics of the essential oil of red aroeira seeds (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and its antimicrobial and antioxidant activities. *Research, Society and Development*. 10: 1-12.
- Galindo-Rodriguez S, Alle E, Fessi H, Doelker E. 2004. Associated with nanoparticle formation in the salting-out, nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research* 21: 1428–1439.
- Garala K, Joshi P, Patel J, Ramkishan A, Shah M. 2013. Formulation and evaluation of periodontal in situ gel. *Int. J. Pharm. Investig.* 3: 29-41.
- Giarratana F, Muscolino D, Beninati C, Giuffrida A, Panebianco A. 2014. Activity of *T. vulgaris* essential oil against Anisakis larvae. *Exp. Parasitol.* 142: 7–10.

- Gomes C, Moreira RG y Castell-Perez E. 2011. Poly (DL-lactide-*co*-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. *Journal of Food Science*. 76: 16–24.
- Guala MS, Elder HV, Perez G, Chiesa A. 2009. Evaluación del poder antioxidante de fracciones de aceite esencial crudo de *S. molle* L. obtenidas por destilación al vacío. *Inf. Tecnol*. 20: 83–88.
- Gutiérrez MM, Stefanazzi N, González JW, Benzi V, Ferrero AA. 2009. Actividad fumigante de aceites esenciales de *S. molle* (Anacardiaceae) y *Tagetes terniflora* (Asteraceae) sobre adultos de *Pediculus humanus capitis* (Insecta; Anoplura; Pediculidae). *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas*. 8: 176–179.
- Hamid AA, Aiyelaagbe O y Usman LA. 2011. Essential oils : Its medicinal and pharmacological uses Research article essential oils : its medicinal and pharmacological uses. *Int J Curr Res*. 33: 86-98.
- Hamidi, MR, Jovanova, B, Kadifkova T. 2014. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 60:9–18
- Herman RA, Ayepa E, Shittu S, Fometu SS, Wang J. 2019. Essential Oils and Their Applications -A Mini Review. *Adv. Nutr. Food Sci*. 4: 1-13.
- Hillaireau H. 2016. Investigating Interactions Between Nanoparticles and Cells: Internalization and Intracellular Trafficking. In: Vauthier, C., Ponchel, G. (eds) *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*. Springer: Paris, pp 291–323.
- Horev B, Klein MI, Hwang G, Li Y, Kim D, Koo H, y Benoit DS. 2015. PH-Activated nanoparticles for controlled topical delivery of farnesol to disrupt oral biofilm virulence. *ACS Nano*. 9: 2390–2404.
- Keawchaon L y Yoksan R. 2011. Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 84: 163–171.

- Lammari N, Louaer O, Meniai AH, Elaissari A. 2020. Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects. *Pharmaceutics*. 12: 1–21.
- Lazarević J, Jevremović S, Kostić I, Kostić M, Vuleta A, Jovanović SM, Jovanović DŠ. 2020. Toxic, oviposition deterrent and oxidative stress effects of *T. vulgaris* essential oil against *acanthoscelides obtectus*. *Insects*. 11: 1–19.
- Li KK, Yin SW, Yang XQ, Tang CH y Wei ZH. 2012. Fabrication and characterization of novel antimicrobial films derived from thymol-loaded zein-sodium caseinate (SC) nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 11592–11600.
- López-Meneses AK, Plascencia-Jatomea M, Lizardi-Mendoza J, Rosas-Burgos EC, Luque-Alcaraz, AG, Cortez-Rocha MO. 2015. Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *T. capitatus* and *S. molle*. *Food Science and Technology*. 3:664–671.
- Lorenzo-Leal AC, López-Malo A. 2018. Aplicación en alimentos y sistemas modelo de aceites esenciales con potencial antimicrobiano. *Temas Selectos de Ingenieria en Alimentos*. 1: 1-25.
- Lugo L. 2018. Nanoencapsulación de aceites esenciales para el control de *Aedes aegypti*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Lugo-Estrada L, Galindo-Rodriguez SA, Perez-Lopez LA, Waksman de Torres N, Álvarez-Róman, R. 2019. *Headspace–Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography Method to Quantify T. vulgaris Essential Oil in Polymeric Nanoparticles*. *Pharmacogn*. 15: 473–478.
- Maksimov O, 2017. *T. vulgaris* L. Thymol CT Essential Oil as Natural Preservative. *Am. J. Essent. Oils Nat. Prod*. 5: 19–22.
- Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, Galindo Rodríguez S. A, Román R. Á, Fessi H, Elaissari A. 2017. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 532: 66–81.

- Mendoza J, Ganem A, Camacho B y Álvarez C. 2018. Actividad bactericida del aceite esencial de orégano y dos derivados fenólicos sobre *Listeria innocua*. Revista Iberoamericana de Ciencias. 5: 19–31.
- Mehta R, Chawla A, Sharma P, Pawar P. 2013. Formulation and in vitro evaluation of Eudragit S-100 coated naproxen matrix tablets for colon-targeted drug delivery system. Journal Pharm. Technol. 4: 31–41.
- Miladi H, Slama RB, Mili D, Zouari S, Bakhrouf A, Ammar E. 2013. Essential oil of *T. vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. Nat. Sci. 05: 729–739.
- Moghtader M. 2013. *In vitro* antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. African J. Plant Sci. 7: 521–527.
- Moustafine RI, Zaharov IM, Kemenova VA. 2006. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit E PO/Eudragit L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. Eur J Pharm Biopharm. 63: 26-36.
- Muhd PS, Cuelho CH, Brondani JC, y Manfron MP. 2015. Composición química y actividad biológica del aceite esencial de *S. molle* L. Revista Cubana de Farmacia. 49: 132–143.
- Naeem A, Abbas T, Ali TM. y Hasnain A. 2018. Essential Oils: Brief Background and Uses. Annals of Short Reports. 1: 1–3.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. PubChem Compound Summary for CID 7461, gamma-Terpinene. Retrieved June 1, 2022. from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gamma-Terpinene>.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. PubChem Compound Summary for CID 22311, Limonene. Retrieved June 1, 2022. from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Limonene>.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. PubChem Compound Summary for

- CID 7463, p-Cymene. Retrieved June 1, 2022. from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/p-Cymene>.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. PubChem Compound Summary for CID 6989, Thymol. Retrieved June 1, 2022. from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thymol>.
- National Toxicology Program. 2010. Toxicology and carcinogenesis studies of beta-myrcene (CAS NO. 123-35-3).
- Oropesa R y Jáuregui U. 2012. Las nanopartículas como portadores de fármacos : características y perspectivas. CENIC Ciencias Biológicas 43:1-10.
- Osman EEA, Morsi EA, El-Sayed MM, Gobouri A, Abdel-Hameed ESS. 2021. Identification of the volatile and nonvolatile constituents of *S. molle* (L.) fruit extracts and estimation of their activities as anticancer agents. J. Appl. Pharm. Sci. 11: 163–171.
- Pedro AS, Santo IE, Silva CV, Detoni C y Albuquerque E. 2013. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 2: 1364–1374.
- Pico J, Gerbrandt EM, Castellarin SD. 2022. Optimization and validation of a SPME-GC/MS method for the determination of volatile compounds, including enantiomeric analysis, in northern highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). Food Chem. 368: 1-12.
- Piña-Barrera A. 2018. Desarrollo de nanoingredientes funcionales a base de productos naturales para preservar productos hortofrutícolas. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Piña-Barrera AM, Alvarez-Roman R, Baez-Gonzalez JG, Amaya-Guerra CA, Rivas-Morales C, Gallardo-Rivera CT, Galindo-Rodriguez SA. 2019. Application of a Multisystem Coating Based on Polymeric Nanocapsules Containing Essential Oil of *T. Vulgaris* L. To Increase the Shelf Life of Table Grapes (*Vitis Vinifera* L.). IEEE

Trans. Nanobioscience. 18: 549–557.

Plaza M, Ricalde M. 2015. Establecer parámetros de control de calidad físico-químicos del aceite esencial del *S. molle* L. obtenido por arrastre de vapor Setting Physico-Chemical Quality Parameters from Essential Oil of Schinus. Rev. Ciencia, Tecnol. e Innovación.1: 693–696.

Prakash B, Kujur A, Yadav A, Kumar A, Singh PP y Dubey NK. 2018. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. Food Control. 89: 1–11.

Prakash B, Kiran S. 2016. Essential oils: A traditionally realized natural resource for food preservation. Current Science 110:1890-1892.

Radulović NS, Genčić MS, Stojanović NM, Randjelović PJ, Stojanović-Radić ZZ, Stojiljković NI. 2017. Toxic essential oils. Part V: Behaviour modulating and toxic properties of thujones and thujone-containing essential oils of *Salvia officinalis* L., *Artemisia absinthium* L., *Thuja occidentalis* L. and *Tanacetum vulgare* L. Food Chem Toxicol. 105:355-369.

Rai M, Paralikar P, Jogee P, Agarkar G, Ingle AP, Derita M, Zacchino S. 2017. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. International Journal of Pharmaceutics. 519: 67-78.

Rivadeneira-Cajas D, Álvarez-Velasco P. 2015. Aceite esencial de *S. molle* L. (Molle) como potencial antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans*. KIRU. 12: 8–14.

Rojas J, Ortiz J, Jáuregui J, Ruiz J, Almonacid R. 2015. Aceite esencial de *T. vulgaris* L. (tomillo), su combinación con EDTA contra *Cándida albicans* y formulación de una crema. An. la Fac. Med. 76: 235-240.

Salas-Cedillo H. 2016. Desarrollo de un potencial insecticida nanoparticulado de *S. molle* para el control de *Aedes aegypti*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Satyral P, Murray BL, McFeeters RL, Setzer WN. 2016. Essential Oil Characterization of *T. vulgaris* from Various Geographical Locations. Foods. 5: 1-12.

- Shabir, G. 2004. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *Journal of validation technology*. 10: 314-324.
- Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU 2014. Engineered nanoparticles interacting with cells: Size matters. *Journal of Nanobiotechnology* 12:1–11.
- Shao XR, Wei XQ, Song X, Hao LY, Cai XX, Zhang ZR, Peng Q, Lin YF. 2015. Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Prolif.* 48: 465–474.
- Silva-Flores A. 2019. Desarrollo y evaluación dermatocinética de nanopartículas con aceites esenciales para su aplicación en piel. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Silva-Flores PG, Pérez-López LA, Rivas-Galindo VM, Paniagua-Vega D, Galindo-Rodríguez SA & Álvarez-Román R. 2019. Simultaneous GC-FID quantification of main components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula dentata* essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 1–9.
- Silva P, Souza S, Bezerra E, Helena E, Sidrim C, Maia S, Linkoln A, Medeiros H, Magno A., Emídio C, Oliveira R y Silva H. 2020. Atividade Antifúngica e Efeito Sinérgico contra *Trichophyton rubrum* e *Candida spp.* do Óleo Essencial das Partes Aéreas de *Lippia alba*. *Revista Virtual de Química*, September. 12: 1- 12.
- Singh R, Singh KP, Singh SP. 2017. Nanotechnology and its applications in agriculture. *Eng. Pract. Agric. Prod. Water Conserv. An Interdiscip. Approach*. 5: 81-89.
- SSA. 2011. Guía para la validación de métodos fisicoquímicos de la comisión de control analítico y ampliación de la cobertura de la secretaria de Salud (CCAYAC-P-058).
- Surendran S, Qassadi F, Surendran G, Lilley D, Heinrich M. 2021. Myrcene—What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? *Front. Nutr.* 8: 1–14.
- Teixeira GF, Vieira-Neto AE, Da Costa FN, Silva AR y Campos AR. 2017. Antinociceptive effect of (-)- α -bisabolol in nanocapsules. *Biomedicine and*

- Pharmacotherapy. 91: 946–950.
- Turek C y Stintzing FC. 2013. Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12: 40–53.
- Velázquez Dávila LA .2017. Evaluaciones dermatocinéticas y antimicóticas de productos naturales incorporados en nanocápsulas biodegradables. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Villegas-Ramírez H. 2017. Actividad larvicida de aceites esenciales para el control de *Musca doméstica* L. (Díptera, *Muscidae*). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Zamora-Mendoza. 2020. Valoración toxicológica de aceites esenciales mediante los modelos de *Artemia salina* y de hemólisis eritrocitaria inducida. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Zielinska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN, Durazzo A, Lucarini M, Eder P, Silva A, Santini A, Souto E. 2020. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* 25: 1-20.
- Zoroddu M, Medici S, Ledda A, Nurchi V, Lachowicz J, Peana M. 2014. Toxicity of Nanoparticles. *Curr. Med. Chem.* 21: 3837–3853.