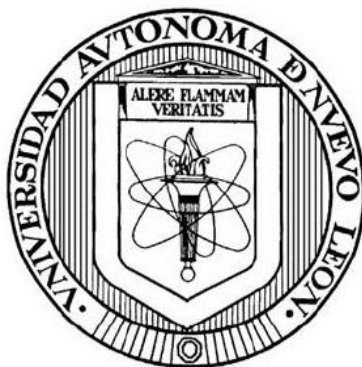


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



NANOFORMULACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia graveolens*) COMO POTENCIAL NANOMEDICINA EN EL TRATAMIENTO DEL HERPES LABIAL

POR

M.C. NANCY NALLELY ESPINOSA CARRANZA

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

2025



**NANOFORMULACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO
(*Lippia graveolens*) COMO POTENCIAL NANOMEDICINA EN EL
TRATAMIENTO DEL HERPES LABIAL**



Comité de Tesis

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Director de Tesis

Dra. Catalina Leos Rivas
Secretaria

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Vocal 1

Dra. Catalina Rivas Morales
Vocal 2

Dr. Juan Gabriel Báez González
Vocal 3



Dra. Katiuska Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO



**NANOFORMULACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO
(*Lippia graveolens*) COMO POTENCIAL NANOMEDICINA EN EL
TRATAMIENTO DEL HERPES LABIAL**



Dirección de Tesis

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Director de Tesis

Dra. Rocío Álvarez Román
Directora externa

Octubre, 2025

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme el apoyo necesario para llevar a cabo mi doctorado en Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos.

Al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL, por las facilidades otorgadas para la realización de las pruebas *in vitro* incluidas en este trabajo.



Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (SECIHTI) por el respaldo financiero a través de la beca No. 792777, que hizo posible la culminación de mis estudios de posgrado.



CONAHCYT

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Gracias Dios, por guiarme, protegerme y darme la salud y la fortaleza necesarias para alcanzar esta meta.

A mi prometido y compañero de vida, **Miguel Muro**, gracias por caminar a mi lado en este viaje lleno de sueños. Gracias por tu amor, tu paciencia, tus palabras de ánimo y tu compañía, que han hecho más ligeras las dificultades. Gracias porque nuestra familia es mi motivación diaria para seguir superándome. Te amo.

A mi papá, **Jaime Espinosa** y mi mamá **Claudia Carranza**, por ser mi ejemplo de constancia, esfuerzo y entrega. Gracias por su amor incondicional, por su guía, apoyo y por enseñarme que los sueños se cumplen con trabajo y perseverancia.

A mi hermana, **Verónica**, y a mi cuñado, **Iván**, por estar siempre presentes, escucharme y apoyarme incondicionalmente en cada paso de este camino.

A mi sobrina, **Anya**, le dejo un mensaje para cuando sea mayor: que sepas que siempre vale la pena luchar por tus sueños y que has llegado a una familia que te alentará a perseguirlos.

A mi director de tesis, el **Dr. Sergio Galindo**, le expreso mi más sincero agradecimiento por su confianza y por haberme permitido formar parte de sus proyectos desde el inicio de mi formación. Gracias por brindarme siempre la oportunidad de aprender haciendo, por considerar mis ideas y por fomentar en mí la curiosidad científica. Agradezco su apoyo constante, sus consejos y estos siete años compartidos en el mundo de la ciencia. Mi respeto, aprecio y reconocimiento a su labor como investigador.

A mi directora de tesis, la **Dra. Rocío Álvarez**, le agradezco su acompañamiento en mi formación profesional. Su dedicación, sus observaciones y su guía fueron fundamentales para fortalecer este trabajo y para convertirme en una profesional más preparada. Reconozco su compromiso con la ciencia y su excelencia como investigadora, cualidades de las cuales he aprendido mucho a lo largo de estos años.

Al comité de tesis, **Dra. Catalina Rivas, Dra. Catalina Leos, Dr. Juan Báez y Dr. Xristo Zarate** por sus valiosas observaciones que contribuyeron a enriquecer este proyecto.

A los maestros del doctorado en Recursos Bióticos, especialmente a la **Dra. Mayra Treviño** y la **Dra. Claudia Gallardo**, gracias por sus sugerencias durante los seminarios internos, las cuales fortalecieron este trabajo.

Al **Dr. David Silva**, gracias por compartir sus conocimientos sobre los ensayos antivirales, por su paciencia cuando los resultados no salían como esperábamos y por permitirme proponer ideas y aprender de cada experiencia. Adicionalmente, gracias por las excelentes recomendaciones musicales.

A la **Dra. Yazmín Solís**, gracias por tus enseñanzas en el manejo de ensayos con células y por dedicar tiempo y paciencia a guiarme, compartiendo tus conocimientos con profesionalismo.

A mis compañeras y compañeros del **Laboratorio de Nanotecnología**, a quienes ya no están y a quienes continúan, gracias por su apoyo, entusiasmo y por compartir sus conocimientos, que enriquecieron mi aprendizaje. Gracias también por los momentos divertidos, las risas, las fiestas y la colaboración que hicieron más amenas las horas de trabajo.

A **Anahí Zamora**, gracias por las risas, los cafés, las charlas, las horas de estrés y también las lágrimas. Gracias por todos los momentos que compartimos y que marcaron esta etapa. Porque incluso cuando los vientos cambian, las amistades genuinas se reinventan y continúan.

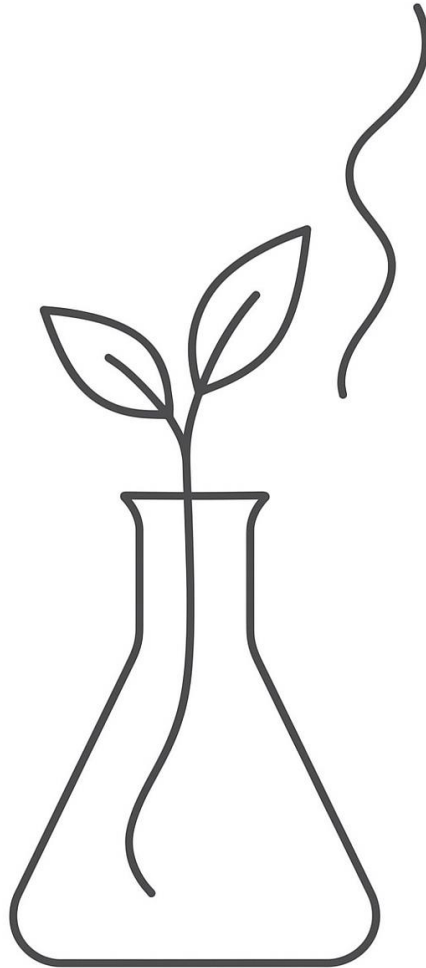
No soy solo por mí, soy gracias a quienes han estado conmigo:

• Humberto Moreno • Alexia Martínez • Cynthia Garza • Mizael Ortiz • Elva Calvillo • Carmen Campillo • Karen Vega • Gabriela Pérez • Pamela Cura • Rubí Alvarado • Vanesa Cantú • Maru Nasser • Romario García • Sebastián González • Jesús Torres • Natalia Carreón • Sofía Cruz • Valentín Moreno • Sofía Galindo • Michel Heya • Mariela de los Santos • Mike Castillo • Jerry Rodríguez • Damián Dávila • Joel Trujillo • Melissa Soto • Liliana Martínez • Andrés Piña • Brenda Armendáriz •

A mis fieles compañeros de cuatro patas: Pelusa, Cuba, Ringo y Rem, gracias por recordarme cada día la importancia de las pausas y el cariño.

DEDICATORIA

A los pilares de mi vida, mi familia



Dejo aquí no solo palabras, sino huellas de todo lo que aprendí

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
JUSTIFICACIÓN	3
HIPÓTESIS	4
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO I: Aceites esenciales como alternativa terapéutica contra el virus del herpes simple	6
1.1.Introducción	7
1.2.Evaluación de la actividad antiviral de los aceites esenciales	8
1.3.Conclusiones	13
CAPÍTULO II: Nanoparticles loaded with <i>Lippia graveolens</i> essential oil as a topical delivery system: <i>In vitro</i> antiherpetic activity and biophysical parameters evaluation	18
2.1.Introduction	19
2.2.Materials and methods	22
2.3.Results	26
2.4.Discussion	29
2.5.Conclusions	40
CAPÍTULO III: Validación de un método HS-SPME-GC para la cuantificación de nanopartículas con aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i> y su análisis en muestras de piel para un tratamiento potencial contra el herpes	49
3.1.Introducción	50
3.2.Materiales y métodos	52
3.3.Resultados y discusión	58
3.4.Conclusiones	72
CAPÍTULO IV: Perfil de liberación in vitro de nanopartículas poliméricas con aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i> y su incorporación en gel tópico	81
4.1.Introducción	82
4.2.Materiales y métodos	83

4.3.Resultados	86
4.4.Discusión	91
4.5.Conclusiones	97
CONCLUSIONES GENERALES	101
PERSPECTIVAS	102
ANEXO I	103

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 1	Contenido	Página
1	Aceites esenciales obtenidos de plantas con potencial actividad antiviral contra el virus del herpes simple	9
2	Compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antiviral contra el virus del herpes simple	11
Capítulo 2		
1	Physicochemical characterization of EOL-loaded NPs ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$)	26
2	Cytotoxic effect against Vero cell lines, using MTT assay, and antiherpetic activity of polymeric nanoparticles loaded with EOL	28
Capítulo 3		
1	Caracterización física del anetol (estándar de referencia y FEUM) y del EO de <i>Lippia graveolens</i>	59
2	Parámetros analíticos de los principales componentes del EO de <i>Lippia graveolens</i> en soluciones estándar.....	64
3	Parámetros analíticos de precisión y exactitud de los principales componentes del EO de <i>Lippia graveolens</i> incorporado en NPs	65
4	Estudios relacionados con la cuantificación de los componentes del EO en diferentes matrices.....	66
5	Contenido de β -mirceno, p -cimeno y carvacrol en NPs de EO <i>Lippia graveolens</i> purificadas por evaporación a presión reducida y por diálisis.....	70
Capítulo 4		
1	Caracterización fisicoquímica de las formulaciones en gel ($\bar{x} \pm SD$, $n=6$)	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2	Contenido	Página
1	Stability of the NP-EOL-R (A) and NP-EOL-D (B) as a function of particle size, PDI and zeta potential ($\bar{x} \pm SD, n=3$). The dashed line corresponds to a visual guide to indicate the general direction of the data	26
2	FT-IR spectra of Eudragit® L100 (A), NP-BCO-R (B), NP-BCO-D (C), NP-EOL-R (D), NP-EOL-D I, and EO <i>Lippia graveolens</i> (F)	27
3	Evaluation of the size and homogeneity of nanoparticles loaded with <i>Lippia graveolens</i> essential oil, obtained by the nanoprecipitation technique and purified through evaporation, using scanning electron microscopy (SEM) at a magnification of $\times 30,000$	27
4	<i>Ex vivo</i> biophysical effect on transepidermal water loss (A), pH (B), stratum corneum water content (C), melanin (D), and erythema I after the contact of EOL-loaded NPs compared with untreated skin ($\bar{x} \pm SD, n=5$). *** Indicates significant differences $p < 0.001$, compared to untreated skin	29
Capítulo 3		
1	Cromatograma por cromatografía de gases con detector de ionización de llama del EO de <i>Lippia graveolens</i> . Los componentes son: (1) α -tujeno, (2) α -pineno, (3) mirceno, (4) α -terpineno, (5) ρ -cimeno, (6) 1,8-cineol, (7) γ -terpineno, (8) linalool, (9) terpinen-4-ol, (10) éter metílico de timol, (11) timol, (12) carvacrol, (13) z-cariofileno, (14) α -humuleno, (15) butilhidroxianisol, (16) óxido de cariofileno	58
2	Espectros FT-IR sobrepuestos del EO de <i>Lippia graveolens</i> obtenidos durante 30 meses de almacenamiento.....	61
3	Comparación de las áreas de los picos de los componentes del EO de <i>Lippia graveolens</i> obtenidos con fibras SPME mediante GC-FID ($\bar{x} \pm SD, n=3$).....	62
4	Cromatogramas obtenidos a partir de la curva de calibración simultánea de β -mirceno, ρ -cimeno y carvacrol ($15\text{--}240 \mu\text{g mL}^{-1}$) utilizando la fibra de poliacrilato mediante HS-SPME-GC	63
5	Distribución del tamaño por la técnica DLS y cromatograma por GC-FID de NP-EOL-D (A) y NP-EOL-R (B) ($n=3$)	68
6	Cantidad de componentes en el estrato córneo para NP-EOL-D (negro) y NP-EOL-R (gris) a diferentes tiempo de contacto con la piel ($\bar{x} \pm SD, n=5$). Asterisco simple (*) indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tiempo de contacto para una misma formulación. Doble asterisco (**) indica diferencias	

significativas ($p \leq 0.05$) entre formulaciones para un mismo tiempo de contacto, nd = no detectado	71
--	----

Capítulo 4

1	Hoja de respuesta para prueba sensorial	86
2	Perfil de liberación de EOL <i>in vitro</i> a pH de 6 a partir de NP-EOL-R en función del tiempo ($\bar{x} \pm SD, n=3$)	86
3	Cinética de hinchamiento, erosión y disolución de NP de Eudragit® L100 en amortiguadores de fosfatos a diferentes valores de pH expresada por cambios en el tamaño de partícula ($\bar{x} \pm SD, n=3$)	87
4	Viscosidad de las diferentes formulaciones: A-BCO (gel blanco de ácido poliacrílico al 1%), X-BCO (gel blanco de goma xantana al 2%), A-NP (gel de ácido poliacrílico al 1% con NP-EOL-R), X-NP (gel de goma xantana al 2% con NP-EOL-R) a diferentes velocidades de cizallamiento a 25 °C ($\bar{x} \pm SD, n=6$). Aspecto macroscópico de las formulaciones de gel: (A) gel blanco de ácido poliacrílico (A-BCO); (B) gel de ácido poliacrílico con NP-EOL-R (A-NP); (C) gel blanco de goma xantana (X-BCO); (D) gel de goma xantana con NP-EOL-R (X-NP)	88
5	Efectos de las evaluaciones sensoriales de las formulaciones de geles de ácido poliacrílico y goma xantana con NP-EOL-R ($n=70$)	89
6	Preferencia sensorial de los evaluadores hacia las formulaciones de geles de ácido poliacrílico al 1% con NP-EOL-R (A-NP) y geles de goma xantana al 2% con NP-EOL-R (X-NP) ($n=70$)	90
7	90

RESUMEN

La piel es una barrera protectora contra patógenos como el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), causante de infecciones cutáneas recurrentes y de alta prevalencia a nivel mundial. Actualmente, existen diversos fármacos para controlar esta infección; sin embargo, su uso prolongado puede generar efectos adversos y la aparición de cepas resistentes. En la búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces, los aceites esenciales (EO), como el de orégano, han recibido creciente interés por su actividad antiviral, tal como se documenta en el Capítulo 1. No obstante, su aplicación directa presenta limitaciones debido a su alta volatilidad, baja solubilidad en agua y susceptibilidad a la degradación por factores externos. Para superar estas limitaciones, la incorporación del EO en nanopartículas poliméricas (NP) representa una estrategia innovadora, ya que su tamaño nanométrico y estructura permiten mejorar su estabilidad y facilitar su aplicación en la piel. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una formulación de NP cargadas con el EO de *Lippia graveolens* (EOL) para su potencial aplicación frente al HSV-1. En el Capítulo 2, se obtuvieron NP-EOL mediante la técnica de nanoprecipitación, con propiedades fisicoquímicas favorables para la deposición cutánea (tamaño ~200 nm, índice de polidispersidad ≤ 0.2 y potencial zeta negativo). Además, las NP-EOL mostraron una actividad antiviral 1.85 veces mayor contra el HSV-1 en comparación con el EOL libre, a la vez que redujeron la citotoxicidad en células Vero. Asimismo, se evaluó el efecto de las NP-EOL en la piel mediante técnicas de bioingeniería; los resultados demostraron que las NP promovieron la hidratación cutánea sin alterar el pH, ni la pérdida de agua transepidérmica, lo que indica que no modifican la barrera de la piel. En el Capítulo 3, se validó un método analítico de HS-SPME-GC, que permitió cuantificar de manera precisa y exacta los componentes principales del EOL tanto en las NP y en piel tratada con las nanoformulaciones. Finalmente, en el Capítulo 4, se desarrolló una formulación en gel con NP-EOL incorporadas, que presentó características adecuadas para uso tópico (pH de 4, adhesividad de ~0.7 mJ y comportamiento pseudoplástico), además de una alta aceptación sensorial, atribuida a su olor, absorción y textura. En conjunto, estos resultados respaldan el potencial de las nanoformulaciones cargadas con EOL como alternativas prometedoras para el tratamiento de infecciones virales causadas por HSV-1.

ABSTRACT

The skin is a protective barrier against pathogens such as herpes simplex virus type 1 (HSV-1), which causes recurrent and highly prevalent skin infections worldwide. Currently, several drugs are available to control this infection; however, their prolonged use may lead to adverse effects and the emergence of resistant strains. In the search for effective therapeutic alternatives, essential oils (EO), such as oregano oil, have gained increasing attention for their antiviral activity, as described in Chapter 1. Nevertheless, their direct application presents challenges due to their high volatility, low water solubility, and susceptibility to degradation by external factors. To overcome these limitations, the incorporation of EO into polymeric nanoparticles (NP) represents an innovative strategy, as their nanometric size and structure improve stability and facilitate skin application. In this context, the aim of this work was to develop NP formulations loaded with *Lippia graveolens* essential oil (EOL) for their potential application against HSV-1. In Chapter 2, EOL-loaded NP (NP-EOL) were obtained using for the nanoprecipitation technique, showing physicochemical properties suitable for skin deposition (size ~200 nm, polydispersity index ≤ 0.2 , and negative zeta potential). Moreover, NP-EOL exhibited 1.85-fold higher antiviral activity against HSV-1 compared with free EOL, while reducing cytotoxicity in Vero cells. The effect of NP-EOL on the skin was also evaluated through bioengineering techniques; results demonstrated that NP enhanced skin hydration without altering pH or transepidermal water loss, indicating that they do not disrupt the skin barrier. In chapter 3, a HS-SPME-GC analytical method was validated, allowing for precise and accurate quantification of the main EOL components both in the NP and in skin treated with the nanoformulations. Finally, chapter 4 describes the development of a gel formulation containing NP-EOL, which exhibited appropriate characteristics for topical use (pH 4, adhesiveness of 0.7 mJ, and pseudoplastic behavior), along with high sensory acceptance attributed to its scent, absorption, and texture. Altogether, these findings support the potential of EOL-loaded nanoformulations as promising alternatives for the treatment of viral infections caused by HSV-1.

JUSTIFICACIÓN

El herpes labial es una enfermedad infecciosa de alta incidencia a nivel mundial, causada principalmente por el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, alrededor de 3,700 millones de personas menores de 50 años están infectadas con este virus. Aunque existen diversos fármacos antivirales para su control, estos presentan limitaciones importantes, como una baja penetración cutánea y la aparición de efectos adversos. Además, el aumento de cepas resistentes a los antivirales convencionales ha disminuido su eficacia terapéutica. En este contexto, se señala la importancia de identificar nuevas alternativas para el control de la infección por HSV-1.

Los productos naturales, como los aceites esenciales (EO), constituyen una fuente prometedora de compuestos con propiedades antivirales, entre ellos el EO de *Lippia graveolens*. Sin embargo, su aplicación directa es limitada debido a sus características fisicoquímicas, como alta volatilidad, baja solubilidad acuosa y susceptibilidad a la degradación por factores ambientales como el oxígeno, la luz y la humedad. Por ello, el desarrollo de medicinas basadas en nanopartículas poliméricas y EO representa una de las estrategias más innovadoras y prometedoras para proteger estos compuestos, favorecer su aplicación tópica y potenciar su actividad antiviral.

Así, en el presente trabajo de investigación se propuso por un lado, desarrollar una nanoformulación con EO de *Lippia graveolens* y evaluar su actividad antiviral; y, por otro lado, analizar su efecto sobre la piel mediante estudios biofísicos, con el fin de determinar su potencial aplicación en el tratamiento del herpes labial.

HIPÓTESIS

La encapsulación del aceite esencial de *Lippia graveolens* en nanopartículas poliméricas potenciará su actividad antiviral contra el virus del herpes labial.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar una formulación de nanopartículas poliméricas con aceite esencial de *Lippia graveolens* y evaluar su actividad antiviral para determinar su uso potencial en el tratamiento del herpes labial.

Objetivos específicos

1. Determinar las características físicas y químicas del EO de *Lippia graveolens* obtenido por hidrodestilación.
2. Desarrollar una nanoformulación con EO de *Lippia graveolens* por la técnica de nanoprecipitación y realizar su caracterización fisicoquímica.
3. Validar un método analítico de microextracción en fase sólida modalidad *head space* acoplado a cromatografía de gases con detector de ionización de flama para cuantificar los componentes del EO de *Lippia graveolens* en las NP.
4. Evaluar la actividad antiviral y citotóxica *in vitro* en células Vero de la nanoformulación con EO de *Lippia graveolens* frente al virus herpes simplex tipo 1.
5. Evaluar el efecto de la nanoformulación con EO de *Lippia graveolens* sobre las propiedades biofísicas de la piel mediante técnicas de bioingeniería y *tape stripping*.
6. Desarrollar una formulación tópica en gel con NP cargadas con el EO de *Lippia graveolens* y evaluar sus propiedades fisicoquímicas, reológicas y sensoriales.

CAPÍTULO I

Aceites esenciales como alternativa terapéutica contra el virus del herpes simple

1.1. Introducción

El herpes simple tipo 1 (HSV-1) es un virus de ADN bicatenario envuelto que pertenece a la familia *Herpesviridae* y es reconocido por causar una de las infecciones más comunes a nivel mundial (Nath *et al.* 2021). Estudios de seroprevalencia indican que hasta el 95% de la población adulta presenta anticuerpos contra este patógeno (Kun-Varga *et al.* 2023). La infección por HSV-1 puede ser asintomática o manifestarse en forma de lesiones cutáneas y mucosas en la región orofacial; sin embargo, también puede provocar complicaciones graves como encefalitis, meningitis o queratoconjuntivitis, especialmente en neonatos o individuos con sistemas inmunológicos comprometidos (Rana *et al.* 2024).

La infección primaria tiene lugar en las células epiteliales y el virus se transmite a través del contacto directo con abrasiones cutáneas, mucosas o saliva, así como mediante el contacto con objetivos contaminados con estas secreciones (Negroni & Inés González, 2018). Una vez que las células epiteliales son infectadas, el HSV-1 puede permanecer en estado de latencia, alojándose principalmente en los axones de las neuronas del sistema nervioso periférico. Diversos estímulos, como el estrés físico o emocional, traumatismos, fiebre o la exposición a radiación ultravioleta, pueden inducir la reactivación del virus, dando lugar a una recurrencia de la enfermedad (Santana Martínez, 2010; Valverde-López, 2017).

Hasta el momento, no existe un tratamiento capaz de erradicar por completo el HSV-1. Sin embargo, se dispone de medicamentos antivirales que pueden reducir la gravedad de los síntomas, entre los cuales destacan aciclovir, valaciclovir, famciclovir, penciclovir y sus derivados (Álvarez *et al.* 2020).

El aciclovir, 9-(2-hidroxietoximetil guanina), es un análogo acíclico de guanosina ampliamente utilizado por su bajo costo y buena tolerabilidad. Para ejercer su actividad antiviral, este fármaco se fosforila intracelularmente a trifosfato de aciclovir mediante la timidina quinasa codificada por el virus. Una vez activo, actúa como un inhibidor competitivo de la ADN polimerasa viral, interfiriendo con la síntesis de ADN y limitando la replicación del virus. De manera similar, los fármacos valaciclovir, famciclovir y penciclovir basan su mecanismo de acción orientado a inhibir la función de la ADN

polimerasa viral, diferenciándose entre sí principalmente en su biodisponibilidad, vida media y régimen de dosificación (Naesens *et al.* 2006).

No obstante, el uso prolongado de estos antivirales ha generado un problema creciente, la resistencia farmacológica, especialmente en pacientes inmunocomprometidos que requieren terapias antivirales profilácticas a largo plazo. En la población general, la resistencia del HSV-1 al aciclovir se estima en un 0.27%, mientras que, en pacientes inmunocomprometidos esta cifra aumenta significativamente, alcanzando un 7%. Las tasas más altas de resistencia se han reportado en pacientes sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas (14.3%), seguidos por aquellos con infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (3.9%) y pacientes con enfermedades tumorales (3.9%) (van de Sand *et al.* 2021). Esta problemática subraya la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos antivirales dirigidos a etapas alternativas del ciclo de infección, como la adhesión y entrada viral.

En este contexto, los productos naturales, en particular los aceites esenciales (EO), contienen diferentes moléculas con potencial antiviral, principalmente, debido a la diversidad y complejidad de sus estructuras químicas. Este capítulo ofrece una revisión bibliográfica sobre los EO y sus componentes aislados como agentes antiherpéticos.

1.2. Evaluación de la actividad antiviral de los aceites esenciales

Los EO son mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles, sintetizados naturalmente en diversas partes de las plantas como parte de su metabolismo secundario. Su composición química está constituida por una amplia variedad de compuestos, incluidos terpenos, fenoles, aldehídos, cetonas, ésteres y compuestos nitrogenados. Esta diversidad química les confiere una prometedora capacidad biológica para actuar contra una amplia gama de patógenos virales (Sousa *et al.* 2023). En la Tabla 1 se presentan diferentes EO que han sido evaluados por su capacidad para inhibir el virus del herpes simple.

Tabla 1. Aceites esenciales obtenidos de plantas con potencial actividad antiviral contra el virus del herpes simple.

Nombre científico / nombre común	Virus	IC₅₀ (µg/mL)	Referencias
<i>Santolina insularis</i>	HSV-1	0.9	(De Logu <i>et al.</i> 2000)
	HSV-2	0.7	
<i>Aloysia gratissima</i>	HSV-1	65.0	(García <i>et al.</i> 2003)
<i>Artemisia douglasiana</i>		83.0	
<i>Eupatorium patens</i>		125.0	
<i>Lippia junelliana</i>		>150.0	
<i>Lippia turbinata</i>		>150.0	
<i>Tessaria absinthioides</i>		105.0	
<i>Aloysia triphylla</i>	HSV-1	>250.0	(Duschatzky <i>et al.</i> 2005)
<i>Pectis adorate</i>		71.5	
<i>Gaillardia megapotamica</i>		99.1	
<i>Heterothalamus alienus</i>		148.4	
<i>Artemisia mendozana</i>		153.7	
<i>Jungia polita</i>		136.4	
<i>Buddleja cordobensis</i>		54.1	
<i>Lippia turbinata</i>		>250.0	
<i>Lectospermum scoparium</i>	HSV-1	28.8	(Reichling <i>et al.</i> 2005)
<i>Artemisia arborescens</i>	HSV-1	2.4	(Saddi <i>et al.</i> 2007)
	HSV-2	4.1	
Eucalipto	HSV-1	55.0	(Astani <i>et al.</i> 2010)
Árbol del té		2.0	

Tomillo		11.0	
Anis estrella	HSV-1	1.0	(Astani <i>et al.</i> 2011)
<i>Lippia graveolens</i>	HSV-1, resistente a aciclovir	55.9	(Pilau <i>et al.</i> 2011)
	HSV-1	99.6	
<i>Cajeput</i>	HSV-1	7.5	(Navid <i>et al.</i> 2013)
<i>Mentha suaveolens</i>	HSV-1	5.1	(Civitelli <i>et al.</i> 2014)
Árbol de té australiano	HSV-1	13.2	
<i>Salvia desoleana</i>	HSV-2	23.7	(Cagno <i>et al.</i> 2017)
	HSV-2, resistente al aciclovir	28.6	
<i>Thymus bovei</i>	HSV-2	2.1	(Hassan <i>et al.</i> 2018)
<i>Cedrus libani</i>	HSV-1	440.0	(Loizzo <i>et al.</i> 2008)
<i>Thymus capitatus</i>	HSV-2	18.6	(Toujani <i>et al.</i> 2018)
	HSV-1	17.6	
<i>Melissa officinalis</i> L.	HSV-1	4.0	(Vanti <i>et al.</i> 2020)
	HSV-2	0.8	
<i>Chrysanthemum indicum</i>	HSV-1	3.5	(Youssef <i>et al.</i> 2020)
<i>Chrysanthemum morifolium</i>		3.7	
<i>Syzygium aromaticum</i>	HSV-1	9.8	(Kiki, 2023)
<i>Eucalyptus citriodora</i>	HSV-1	2.6	(Fayez <i>et al.</i> 2023)
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	HSV-1	15.6	
<i>Eucalyptus ficifolia</i>	HSV-1	2.6	
<i>Coridothymus capitatus</i> L.	HSV-1	47.0	(Fuochi <i>et al.</i> 2024)
	HSV-2	40.0	
<i>Tetradenia riparia</i>	HSV-1	9.6–24.2	(Sena <i>et al.</i> 2024)

Algunos trabajos han atribuido la actividad antiviral de los EO a la acción de sus componentes mayoritarios. Por ejemplo, se reportó que el eugenol, un componente principal del EO de *Cinnamomum zeylanicum*, presentaba una eficacia comparable a la del propio EO frente al virus de la influenza A (H1N1), lo que sugiere que la actividad antiviral podría atribuirse a este compuesto (Ma & Yao, 2020). En contraste, otros trabajos reportan que la eficacia antiviral de los EO se debe a la interacción sinérgica entre las diferentes moléculas que los componen. Astani *et al.* (2011) demostraron que el EO de eucalipto presentó una actividad superior contra HSV-1, en comparación con su componente mayoritario, el 1,8-cineol. De manera similar, el aceite de árbol de té mostró una mayor capacidad antiviral que sus componentes individuales terpinen-4-ol, γ -terpineno y α -terpineno. Asimismo, se han descrito actividades sinérgicas o aditivas cuando los fármacos comerciales se utilizan en combinación con EO. Por ejemplo, el EO de *Mentha suaveolens* con aciclovir incrementaron de manera significativa la actividad antiherpética (Civitelli *et al.* 2014).

Estos resultados plantean la importancia de evaluar, tanto la mezcla completa de los EO, como los compuestos aislados. La caracterización de metabolitos individuales no solo permite profundizar en los mecanismos de acción y establecer relaciones estructura-actividad, sino también identificar y descartar moléculas que puedan comprometer la seguridad o eficacia de los EO (Nakatsu *et al.* 2000). En este sentido, en la Tabla 2 se presentan algunos compuestos aislados que han demostrado actividad frente al virus HSV.

Tabla 2. Compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antiviral contra el virus del herpes simple.

Compuesto	Virus	IC ₅₀ (µg/mL)	Referencias
Leptospermona	HSV-1	10.5	(Reichling <i>et al.</i> 2005)
Flavesona		33.0	
α -terpineno	HSV-1	8.5	(Astani <i>et al.</i> 2010)
γ -terpineno		7.0	
α -pineno		4.5	

ρ -cimeno		16.0	
Terpinen-4-ol		60.0	
α -terpineol		22.0	
Timol		30.0	
Citral		3.5	
<i>Trans</i> -anetol		20.0	
Eugenol		35.0	
Farnesol		3.5	
β -Eudesmol	HSV-1	6.0	(Astani <i>et al.</i> 2011)
β -cariofileno		0.3	
β -óxido de cariofileno		0.7	
Carvacrol	HSV-1	48.6	(Pilau <i>et al.</i> 2011)
	HSV-1 resistente al aciclovir	28.6	
β -pineno	HSV-1	3.5	(Astani & Schnitzler, 2014)
Limoneno		5.9	
Kellerina	HSV-1	2.5	(Ghannadi <i>et al.</i> 2014)
Geraniol	HSV-2	1.9	(Hassan <i>et al.</i> 2018)
β -cariofileno	HSV-2, resistente a aciclovir	5.0	(Cagno <i>et al.</i> 2017)
	HSV-2	5.4	
Carvacrol	HSV-1, HSV-2	49.0	(Fuochi <i>et al.</i> 2024)

Hasta el momento, los mecanismos de acción de la actividad antiviral de los EO no se han establecido completamente. En la mayoría de los casos, la actividad antiviral contra el HSV-1 y HSV-2 de los EO y de sus componentes se ha atribuido principalmente a su capacidad para interferir con las etapas iniciales de la infección viral. Entre los mecanismos descritos se incluyen la disrupción de la envoltura lipídica, la desintegración de la cápside y la inhibición de la interacción del virus con los receptores de la célula huésped.

En este sentido, Reichling (2022) reportó que la incubación de viriones de HSV-1 con el EO de orégano durante una hora a temperatura ambiente provocó la pérdida de la envoltura lipídica, lo que impidió su unión a las células huésped y, en consecuencia, redujo su infectividad. De manera complementaria, Lai *et al.* (2012) demostraron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) que los componentes mayoritarios del EO de orégano, carvacrol y timol, inducen alteraciones estructurales en la envoltura viral. Tras un pretratamiento de una hora a 100 μM , el carvacrol afectó hasta el 79% de los viriones y el timol redujo la estructura viral hasta un 93%.

Otro mecanismo propuesto involucra la inhibición de la unión del virus a los receptores celulares. Se ha descrito que compuestos fenólicos como el ácido rosmarínico, el mentol, el linalol, la apigenina y el α -santalol pueden interactuar con glicoproteínas de la envoltura viral (gB, gC, gD y gH), bloqueando su reconocimiento de receptores celulares como nectina-1, HVEM y el heparán sulfato 3-O-sulfatado. Este tipo de interacción impediría el inicio del ciclo de replicación (Bisson, 2024).

1.3. Conclusiones

El HSV representa un desafío relevante de salud pública debido a la recurrencia de la infección y a la aparición de cepas resistentes a los antivirales actualmente disponibles. En este sentido, los EO se consideran una alternativa de tratamiento, ya que, contienen una amplia diversidad de compuestos con la capacidad para inhibir distintas etapas del ciclo viral. Además, algunos EO han mostrado efectos sinérgicos en combinación con fármacos convencionales, lo que abre oportunidades terapéuticas frente a cepas

resistentes. La revisión presentada en este capítulo evidencia la diversidad de compuestos con actividad antiherpética presentes en las especies vegetales.

Sin embargo, la aplicación directa de los EO se encuentra limitada por sus características químicas, como la alta volatilidad, la inestabilidad y la baja solubilidad en agua. Estas propiedades no solo dificultan el desarrollo de formulaciones estables, sino que también generan incertidumbre respecto a la reproducibilidad de sus efectos biológicos. Para superar estas limitaciones, la encapsulación en nanopartículas poliméricas se ha propuesto como una estrategia para proteger a los EO, mejorar su solubilidad, incrementar su disponibilidad y proporcionar una liberación controlada, con lo cual se podría potenciar su eficacia terapéutica. En los capítulos siguientes se abordará de manera detallada este enfoque, que constituye un puente entre el potencial terapéutico de los EO y su futura aplicabilidad como alternativas eficaces frente al HSV-1 .

1.4. Referencias

- Álvarez DM, Castillo E, Duarte LF, Arriagada J, Corrales N, Farías MA, Henríquez A, Agurto-Muñoz C, González PA. (2020). Current antivirals and novel botanical molecules interfering with herpes simplex virus infection. *Frontiers in Microbiology*, *11*(1), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00139>.
- Astani A, Reichling J, Schnitzler P. (2010). Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research*, *22*(4), 544–549. <https://doi.org/10.1002/ptr.2955>.
- Astani A, Reichling J, Schnitzler P. (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2011*(1). <https://doi.org/10.1093/ecam/nep187>.
- Astani A, Schnitzler P. (2014). Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus *in vitro*. *Iranian Journal of Microbiology*, *6*(3), 149–155. PMID: 25870747.
- Bisson GS. (2024). Antiviral properties of essential oils: What do we know?. *Brazilian Journal of Health Aromatherapy and Essential Oil*, *1*(1), bjhae10. <https://doi.org/10.62435/2965-7253.bjhae.2024.bjhae10>.
- Cagno V, Sgorbini B, Sanna C, Cagliero C, Ballero M, Civra A, Donalisio M, Bicchi C, Lembo D, Rubiolo P. (2017). *In vitro* anti-herpes simplex virus-2 activity of *Salvia desoleana* Atzei & V. Picci essential oil. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172322>.

- Civitelli L, Panella S, Marcocci ME, De Petris A, Garzoli S, Pepi F, Vavala E, Ragno Rino, Nencioni L, Palamara AN, Angiolella L. (2014). *In vitro* inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by *Mentha suaveolens* essential oil and its main component piperitenone oxide. *Phytomedicine*, 21(6), 857–865. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.01.013>.
- De Logu A, Loy G, Pellerano ML, Bonsignore L, Schivo ML. (2000). Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Research*, 48(3), 177–185. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(00\)00127-3](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(00)00127-3).
- Duschatzky CB, Possetto ML, Talarico LB, García CC, Michis F, Almeida NV, Lamposona MP, Schuff C, Damonte EB (2005). Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 16(4), 247–251. <https://doi.org/10.1177/095632020501600404>.
- Fayez S, Gamal El-Din MI, Moghannem SA, Azam F, El-Shazly M, Korinek M, Chen YL, Hwang TL, Fahmy NM. (2023). Eucalyptus-derived essential oils alleviate microbes and modulate inflammation by suppressing superoxide and elastase release. *Frontiers in Pharmacology*, 14(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1218315>.
- Fuochi V, Furneri PM, Furnari S, Garozzo A. (2024). Antiviral efficacy of *Coridothymus capitatus* essential oil against HSV-1 and HSV-2. *Life*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/life14081023>
- García CC, Talarico L, Almeida N, Colombres S, Duschatzky C, Damonte EB. (2003). Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Research*, 17(9), 1073–1075. <https://doi.org/10.1002/ptr.1305>
- Ghannadi A, Fattahian K, Shokoohinia Y, Behbahani M, Shahnoush A. (2014). Anti-viral evaluation of sesquiterpene coumarins from *Ferula assa-foetida* against HSV-1. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(2), 523–530. PMID: 25237347.
- Hassan STS, Berchová-Bímová K, Šudomová M, Malaník M, Šmejkal K, Rengasamy KRR. (2018). *In vitro* study of multi-therapeutic properties of *Thymus bovei* benth. essential oil and its main component for promoting their use in clinical practice. *Journal of Clinical Medicine*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/jcm7090283>.
- Kiki MJ. (2023). *In vitro* antiviral potential, antioxidant, and chemical composition of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil. *Molecules*, 28(6). <https://doi.org/10.3390/molecules28062421>.
- Kun-Varga A, Gubán B, Miklós V, Parvaneh S, Guba M, Szűcs D, Monostori T, Varga J, Varga Á, Rázga Z, Bata-Csorgo, Kemény L, Megyeri K, Veréb Z. (2023). Herpes simplex virus infection alters the immunological properties of adipose-tissue-derived mesenchymal-stem

- cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15).
<https://doi.org/10.3390/ijms241511989>.
- Lai WL, Chuang HS, Lee MH, Wei CL, Lin CF, Tsai YC. (2012). Inhibition of herpes simplex virus type 1 by thymol-related monoterpenoids. *Planta Medica*, 78(15), 1636–1638.
<https://doi.org/10.1055/s-0032-1315208>.
- Loizzo MR, Saab A, Tundis R, Statti GA, Lampronti I, Menichini F, Gambari R, Cinatl J, Doerr HW. (2008). Phytochemical analysis and *in vitro* evaluation of the biological activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) of *Cedrus libani* A. Rich. *Phytomedicine*, 15(1–2), 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.03.013>.
- Ma L, Yao L. (2020). Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: An updated review. *Molecules*, 25(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25112627>.
- Naesens L, Bolle LD, Clercq ED. (2006). Therapeutic approaches to HHV-6 infection. *Perspectives in Medical Virology*, 12(06), 291–301. [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(06\)12023-6](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(06)12023-6).
- Nakatsu T, Lupo AT, Chinn JW, Kang RKL. (2000). Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21, 571–631.
[https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(00\)80014-9](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80014-9).
- Nath P, Kabir MA, Doust SK, Ray A. (2021). Diagnosis of herpes simplex virus: Laboratory and point-of-care techniques. *Infectious Disease Reports*, 13(2), 518–539.
<https://doi.org/10.3390/idr13020049>.
- Navid MH, Reichling J, Schnitzler P. (2013). Antiherpetic activity of the traditionally used complex essential oil Olbas®. *Pharmazie*, 68(8), 702–705.
<https://doi.org/10.1691/ph.2013.3518>.
- Negróni M, Inés González M. (2018). Virus: Generalidades. In *Microbiología Estomatológica* (3a edición, pp. 69–80). Editorial Medica Panamericana.
- Pilau MR, Alves SH, Weiblen R, Arenhart S, Cueto AP, Lovato LT. (2011). Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1616–1624.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400049>.
- Rana H, Truong NR, Sirimanne DR, Cunningham AL. (2024). Breaching the barrier: Investigating initial herpes simplex viral infection and spread in human skin and mucosa. *Viruses*, 16(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/v16111790>.
- Reichling J. (2022). Antiviral and virucidal properties of essential oils and isolated compounds - A scientific approach. *Planta Medica*, 88(8), 587–603. <https://doi.org/10.1055/a-1382-2898>.

- Reichling J, Koch C, Stahl-Biskup E, Sojka C, Schnitzler P. (2005). Virucidal activity of a β -triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Medica*, 71(12), 1123–1127. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873175>.
- Saddi M, Sanna A, Cottiglia F, Chisu L, Casu L, Bonsignore L, De Logu A. (2007). Antiherpesvirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-6-10>.
- Santana Martínez S. (2010). Efectos de la infección con el virus herpes simplex de tipo 1 en células neuronales y su relación con la enfermedad de alzheimer. Universidad Autónoma de Madrid.
- Sena JS, Rodrigues SA, Sakumoto K, Inumaro RS, González-Maldonado P, Mendez-Scolari E, Piau R, Goncalvez DD, Mandim F, Vaz J, Goncalves JE, Sotelo PH, Valle JS, Gazim ZC. (2024). Antioxidant Activity, antiproliferative activity, antiviral activity, NO production inhibition, and chemical composition of essential oils and crude extracts of leaves, flower buds, and stems of *Tetradenia riparia*. *Pharmaceuticals*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ph17070888>.
- Sousa PS, Damasceno ROS, Amorati R, Elshabrawy HA, Castro RD, Bezerra DP, Nunes VRV, Gomes RC, Lima TC. (2023). Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. *Biomolecules*, 13(7), 1–29. <https://doi.org/10.3390/biom13071144>.
- Toujani MM, Rittà M, Civra A, Genovese S, Epifano F, Ghram A, Lembo D, Donalisio M. (2018). Inhibition of HSV-2 infection by pure compounds from *Thymus capitatus* extract *in vitro*. *Phytotherapy Research*, 32(8), 1555–1563. <https://doi.org/10.1002/ptr.6084>.
- Valverde-López J. (2017). Herpes virus. *Dermatol Peru*, 27(4), 212–224. https://doi.org/10.1007/978-90-368-0643-5_6.
- van de Sand L, Bormann M, Schmitz Y, Heilingloh CS, Witzke O, Krawczyk A. (2021). Antiviral active compounds derived from natural sources against herpes simplex viruses. *Viruses*, 13(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/v13071386>.
- Vanti G, Ntallis SG, Panagiotidis CA, Dourdouni V, Patsoura C, Bergonzi MC, Lazari D, Bilia AR. (2020). Glycosome of *Melissa officinalis* L. essential oil for effective anti-HSV type 1. *Molecules*, 25(311), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules25143111>.
- Youssef FS, Eid SY, Alshammari E, Ashour ML, Wink M, El-Readi MZ. (2020). *Chrysanthemum indicum* and *chrysanthemum morifolium*: Chemical composition of their essential oils and their potential use as natural preservatives with antimicrobial and antioxidant activities. *Foods*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/foods9101460>.

CAPÍTULO II

Nanoparticles loaded with *Lippia graveolens* essential oil as a topical delivery system: *In vitro* antiherpetic activity and biophysical parameters evaluation

Published in pharmaceutics**Volume(Issue):**

17(10)

Article number

1286

Digital Object Identifier:<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17101286>**Abstract**

Background/Objectives: The skin is a protective barrier against pathogens such as herpes simplex virus type 1 (HSV-1), which causes recurrent and highly prevalent skin infections worldwide. The increasing resistance of HSV-1 to conventional treatments has driven the search for new therapeutic alternatives. In this context, the essential oil of *Lippia graveolens* (EOL) has demonstrated promising antiviral activity; however, its high volatility limits direct skin application. To overcome this, polymeric nanoparticles (NPs) loaded with EOL were developed to improve its availability and antiviral efficacy. **Methods:** Nanoformulations were prepared by nanoprecipitation, and their antiviral activity against HSV-1 was evaluated using the plaque reduction assay. The effect of the nanoformulations on skin barrier integrity was assessed using an *ex vivo* porcine skin model and non-invasive techniques. **Results:** The NP-EOL exhibited physicochemical properties favorable for skin deposition, including a particle size around 200 nm, a polydispersity index of ≤ 0.2 , and negative zeta potential. Moreover, NP-EOL showed 1.85-fold higher antiviral activity against HSV-1 compared with free EOL, while also reducing cytotoxicity in Vero cells. **Conclusions:** Results demonstrated that the NPs promoted skin hydration without altering pH or transepidermal water loss, suggesting they do not disrupt skin homeostasis. This study supports the potential of NP-based systems as effective topical delivery vehicles for EOL, representing a promising therapeutic alternative against HSV-1 skin infections.

Keywords: nanoparticles; essential oils; HSV-1; antiviral; *Lippia graveolens*

2.1. Introduction

The skin plays a crucial role in protecting the body against environmental factors. This protective function is primarily attributed to the stratum corneum (SC), the outermost layer of the epidermis. The SC is composed of corneocytes that are surrounded by

ceramides, fatty acids, and cholesterol; together they form a lamellar hydrophobic structure that limits transepidermal water loss and prevents the entrance of harmful substances and pathogenic microbes. In addition, various components such as enzymes, protease inhibitors, immune cells (*e.g.*, Langerhans cells), and antimicrobial peptides contribute to the homeostasis of the SC barrier (Madawi *et al.*, 2023). However, the integrity of the skin barrier can be compromised by diverse factors such as trauma, burns, skin disorders, and underlying medical conditions leading to cutaneous infections caused by pathogens (*i.e.*, bacteria, fungi, and viruses) that penetrate this barrier (Maranduca *et al.*, 2020).

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is an enveloped, double-stranded DNA virus that causes recurrent vesicular eruptions, most commonly in the orofacial region (*i.e.*, cold sores) (Gopinath *et al.*, 2023). HSV-1 is highly contagious, and it is estimated that 3.7 billion people under the age of 50 are infected with the virus. The main antiherpetic treatments used to accelerate the healing of blisters and relieve symptoms such as pain, itching, or burning sensations are acyclic nucleosides, including acyclovir and derivatives (*i.e.*, famciclovir and valacyclovir) (Almansorri *et al.*, 2023). Depending on the severity of the symptoms and the host's immune status, the antiviral therapy can be administered either systemically or topically (Research, 2020; Piperi *et al.*, 2023). However, one of the central challenges associated with oral antiviral treatments is their low bioavailability caused by the limited absorption of the drug through the gastrointestinal tract. In the case of acyclovir, some patients have exhibited absorption rates as low as 10–27% of the administered dose. This low bioavailability requires higher doses, which can lead to adverse effects such as nausea, vomiting, headache, irritability, and even renal injury (Fekete *et al.*, 2020). On the other hand, for topical treatment, acyclovir is not a good candidate for passive permeation due to its polarity ($\log P = -1.76$ at pH 7), which limits its partitioning into the lipid matrix of the SC (Nagra *et al.*, 2022). In addition, resistance of HSV-1 to these antiviral treatments has become a significant concern, particularly in immunocompromised patients undergoing long-term therapies (Andreu *et al.*, 2020). Currently, there is growing interest in the development of new antiviral agents with alternative mechanisms of action that can replace or complement existing therapies, for example, essential oils (EOs).

EOs are complex mixtures of terpenoids, ketones, aldehydes, and esters that have been approved for use in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries (Predoi *et al.* 2018). Various studies have demonstrated their beneficial biological properties, including inhibitory activity against HSV-1 (Orchard and Vuuren, 2017; Ma and Yao, 2020). Specifically, oregano has shown promising antiviral properties. The chemical composition of oregano EO includes hydrocarbon sesquiterpenes (β -caryophyllene), hydrocarbon monoterpenes (p -cymene, β -thujene), and oxygenated monoterpenes (carvacrol and thymol), the latter being the major constituents as they represent about 20–60% of the total composition (Herrera-Rodríguez *et al.* 2019; Medina-Romero *et al.* 2021; Alam *et al.* 2024). The antiviral activity of oregano EO (*Lippia graveolens*) against HSV-1 was reported by Pilau *et al.* (2011) who determined a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of 99.6 $\mu\text{g/mL}$. Later, another study demonstrated that specific components of oregano EO like β -caryophyllene ($IC_{50} = 0.25 \mu\text{g/mL}$), p -cymene ($IC_{50} > 0.1\%$, equivalent to $>1000 \mu\text{g/mL}$), thymol, and carvacrol ($IC_{50} = 7 \mu\text{M}$, equivalent to $1.1 \mu\text{g/mL}$) display antiviral activity against the virus (de Sousa *et al.* 2023). Although EOs hold great potential as therapeutic alternatives, their use is limited due to their physicochemical characteristics. For example, they are volatile at room temperature and susceptible to degradation in the presence of oxygen, light, and humidity, moreover their application in aqueous-based formulations is challenging because of their nonpolar nature (Badgujar Vaishnavi *et al.* 2021).

To approach these limitations, nanoencapsulation can result in an efficient strategy to deliver active compounds including EO whose chemical characteristics influence their usage. Specifically, polymeric nanoparticles (NPs) have been extensively studied for topical use because their nanometric size increases residence time and enhances direct contact with the skin. Moreover, their polymeric composition enables the controlled release of EO onto the stratum corneum (SC), improving their availability and consequently, the efficacy of the active compounds (Zoabi, Touitou and Margulis, 2021). Also, it has been shown that NPs with sizes around 200 nm tend to accumulate in hair follicles and skin folds (Alvarez-Román *et al.* 2004). For these reasons, NPs represent a promising tool for the topical delivery of EOs in the treatment of HSV-1 related infections. In a study by Kalita *et al.* (2017) chloramphenicol and lemongrass EOs were co-

encapsulated in a poly- ϵ -caprolactone NPs for topical application in the treatment of burns co-infected with bacteria and fungi. The nanoformulation exhibited enhanced *in vitro* antimicrobial activity against 22 microbial pathogens. Additionally, the NPs facilitated penetration into the injured dermal tissue and accelerated the wound healing process.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* antiviral activity against HSV-1 using a polymeric NP formulation loaded with *Lippia graveolens* EO (EOL). The investigation also measured the effect of the NPs on the biophysical properties of the skin, in order to determine the potential use of the formulation as a topical treatment for dermal infections with HSV-1.

2.2. Materials and Methods

2.2.1. Materials

Lippia graveolens was collected in Coahuila, Mexico. The chemical composition and the proportion of each component of the EO were analyzed by González-Moreno *et al.* (2024) using a gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). The Vero cell line (ATCC CCL-81) and the HSV-1 strain KOS (ATCC VR-1493D) virus were kindly donated from the Department of Genetics, School of Medicine, UANL. Dimethylsulfoxide (DMSO) and carvacrol (CRV) ($\geq 98\%$ grade GC) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol was purchased from Fisher Chemical (Waltham, MA, USA), while acetone and isopropyl alcohol were obtained from Tedia (Fairfield, OH, USA). All solvents were of analytical grade. Distilled water was obtained from a Milli-Q water purification system (Boston, MA, USA). The nanoparticle-forming polymer, Eudragit® L100 (copolymer of methacrylic acid-methyl methacrylate (1:1)), was kindly obtained from Helm (Naucalpan, State of Mexico, Mexico). Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and the rest of the reagents used for the *in vitro* tests were from Gibco, Grand Island, NY, USA.

2.2.3. Preparation and Characterization of EO-Loaded NP

The NPs were prepared by the nanoprecipitation method as described by Fessi *et al.* (1989). Briefly, an organic phase was prepared with 25 mg of Eudragit® L100 in 15 mL

of acetone–isopropanol mixture (1:1). Then, 50 mg of EOL was added to the solution. Subsequently, the organic phase was injected using a syringe into the aqueous phase containing 20 mL of distilled water under magnetic stirring. Diffusion of the organic phase into the aqueous phase induced the aggregation polymer and encapsulation of EOL into nanoparticles (NP-EOL). Finally, the organic solvents were removed through two purification techniques: (i) dialysis using regenerated cellulose membrane Spectrum/Por®4 (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) and (ii) evaporation under reduced pressure (Laborota 4003 control, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany). EOL-loaded NPs purified by dialysis were identified as NP-EOL-D, while those purified by evaporation were identified as NP-EOL-R. Unloaded NPs, without EOL, were obtained following the same procedure described above. Similarly, the NPs without EOL purified by dialysis were identified as NP-BCO-D, and those purified by evaporation as NP-BCO-R.

The physicochemical characterization of formulations was carried out in terms of particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, and pH (Conductronic, pH120 model, Puebla, Puebla, Mexico). The mean particle size and PDI were measured at a 90-degree scattering angle using dynamic light scattering, while the zeta potential was measured by laser Doppler microelectrophoresis. Both measurements were performed using a Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), in triplicate at 25 °C. In addition, morphological examination of NPs was performed using a scanning electron microscope (JEOL JSM-7401F, Kyoto, Japan). Samples of dried NPs were dispersed in water and then, drops of the dispersion were placed on metallic studs and coated with gold.

The NP-EOL-R and the NP-EOL-D formulations were stored at 25 ± 2 °C under 40–60% relative humidity conditions. The stability of the formulations was evaluated by determining particle size, PDI, and zeta potential.

2.2.4. Fourier-Transform Infrared Analysis

Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy was performed using a Frontier FT-IR spectrometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) to establish interactions between the raw material used for NPs formulation (Eudragit® L100 polymer and EOL). Additionally, the nanoformulations (NP-BCO-D, NP-BCO-R, NP-EOL-D and NP-EOL-R) were

examined. The polymer and EOL were evaluated directly, while the NPs were centrifuged and the resulting pellet was placed in a desiccator. Spectra were examined over wavenumber range of 4000 to 400 cm^{-1} .

2.2.5. Cell Viability Assessment

Cell viability was determined using the Mosmann method with slight modifications (Mosmann, 1983). For the assay, Vero cells were cultured in 96-well plates at a density of 1.5×10^4 cells/well in DMEM with 10% FBS and 1% DMSO. After 24 h, the cells were supplemented with different concentrations of EOL, CRV, NP-EOL-R, NP-EOL-D, NP-BCO-R, and NP-BCO-D and incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO_2 . Vero cells added to only DMEM with 10% FBS and 1% DMSO were used as negative controls. After 48 h incubation, cell viability was determined by adding 10 μL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution at a concentration of 5 mg/mL per well, followed by incubation for 3 h at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. The culture medium was removed, and 100 μL of DMSO was added. Absorbance was measured at 540 nm using a Thermo Scientific Model 357 microplate reader (Waltham, MA, USA). The cytotoxic concentration 50 (CC_{50}) was determined as the concentration of NP-EOL, NP-BCO, CRV, and EOL required to reduce cell viability by 50%, relative to the viability of untreated cells (negative control). Experiments were performed in quadruplicate.

2.2.6. Evaluation of Antiherpetic Activity In Vitro

A viral plaque reduction assay was performed to determine the IC_{50} according to the methodology described by Silva-Mares *et al.* (2019). Briefly, confluent monolayers of Vero cells in 24-well culture plates were incubated with 25 plaque forming units (PFUs) of HSV-1 for 1 h at 37 °C. The supernatant was discarded, and fresh medium supplemented with 0.32% IgG and 1% DMSO was added. Subsequently, concentrations of 11, 22, and 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of NP-EOL, NP-BCO, CRV, and EOL were evaluated; these concentrations were selected based on prior cytotoxicity results, representing low, medium, and high values that were non-toxic. The cells were incubated for 48 h. Finally, the cells were fixed with methanol and stained with Giemsa reagent (CTR Scientific, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico). The IC_{50} was determined as the concentration at which

a 50% reduction in PFU formation was observed compared with the 0% reduction in the negative control (infected cells). All assays were performed in triplicate. The selectivity index (SI) of each sample was calculated as the ratio of CC_{50} to IC_{50} .

2.2.7. Ex Vivo Biophysical Evaluation of Skin Treated with EOL-Loaded NP

The porcine ear skin was obtained from the R.E.T.S.A. slaughterhouse in Monterrey, NL, Mexico. After cleaning and the removal of subcutaneous fat, the skin was frozen at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for up to four weeks before use.

For the experiment, the skin was thawed and hydrated for 30 min. Subsequently, it was mounted in a modified Franz diffusion cell, consisting of a donor compartment and a receptor compartment, with the porcine skin placed between them. The receptor compartment contained 15 mL of phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 and was maintained under magnetic stirring (300 rpm) at $36.0 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. The donor compartment (with an area of 2.54 cm^2) was filled with 1 mL of the treatment of NP-EOL or NP-BCO and covered to prevent evaporation. The formulations were in contact with the skin for 4, 6, and 8 h. After exposure time, the formulations were removed from the skin surface by gently patting with cotton. Subsequently, the effect of the formulations was evaluated in terms of transepidermal water loss (TEWL), skin surface pH, stratum corneum water content (SCWC), as well as the melanin and erythema index, and these were measured on the pig skin with the respective Tewameter TM300, pH 905, Corneometer CM825, and Mexameter MX 18 probes, respectively, all connected to a MPA5 system (Courage & Khazaka, Köln, Germany). Measurements were carried out in quintuplicate, in a draft-free room, with controlled temperature ($25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) and relative humidity (30–40%).

2.2.8. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software version 7.0 (San Diego, CA, USA). One-way ANOVA, followed by a multiple comparison test, was conducted to compare the means of more than two groups ($p < 0.05$).

2.3. Results

2.3.1. Preparation and Characterization of EOL-Loaded Nanoparticles

The NP-EOL-R and NP-EOL-D formulation were obtained using the nanoprecipitation technique established by Fessi *et al.* (1989). The physicochemical characteristics of the nanoformulations are presented in Table 1.

Table 1. Physicochemical characterization of EOL-loaded NPs ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$).

Formulation	Mean Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	pH	%EE
NP-EOL-R	145.89 \pm 5.89	0.075 \pm 0.024	-32.47 \pm 2.18	3.30 \pm 0.04	16.92 \pm 1.49
NP-EOL-D	232.10 \pm 13.50	0.127 \pm 0.010	-15.90 \pm 1.70	3.18 \pm 0.12	29.61 \pm 2.26

NP-EOL-R, EOL-loaded NPs purified by evaporation; NP-EOL-D, EOL-loaded NPs purified by dialysis; %EE, encapsulation efficiency percentage, was determined by a previously validated GC-FID method.

As shown in Figure 1, the stability parameters of the EOL-loaded NPs: particle size, polydispersity index (PDI), and zeta potential, were evaluated over a period of 480 days at 25 °C under relative humidity conditions of 40–60%.

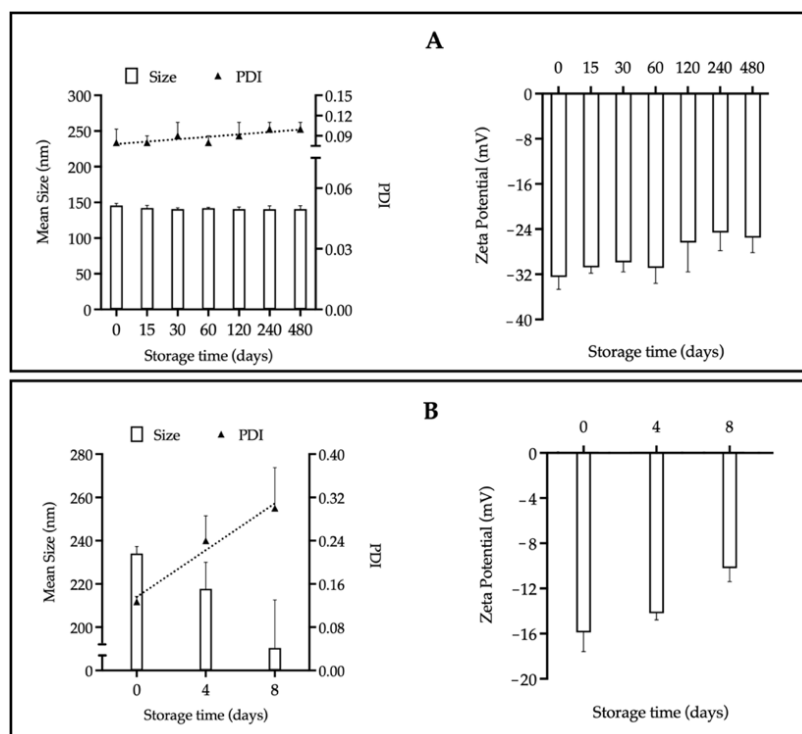


Figure 1. Stability of the NP-EOL-R (A) and NP-EOL-D (B) as a function of particle size, PDI and zeta potential ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$). The dashed line corresponds to a visual guide to indicate the general direction of the data.

2.3.2. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Analysis of NP-EOL Components

FT-IR spectroscopy was used to characterize the Eudragit® L100 polymer, *Lippia graveolens* EO, EOL-loaded NPs, and unloaded NPs, in order to analyze the interactions between the NP components. The spectrum of each material is shown in Figure 2.

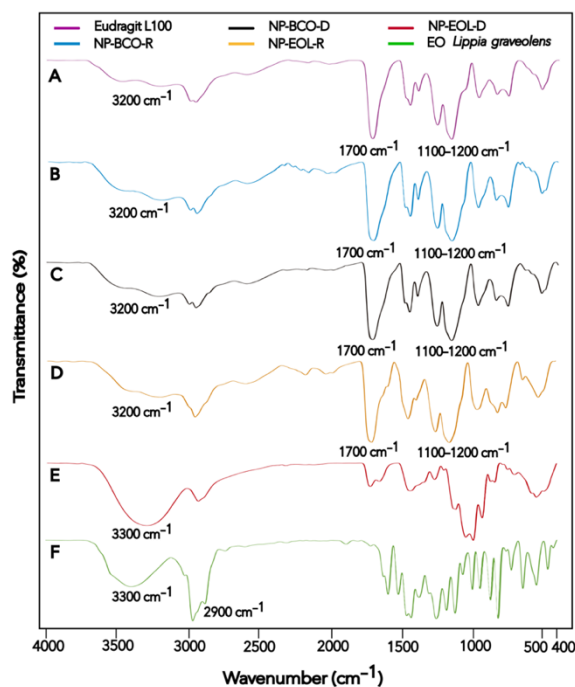


Figure 2. FT-IR spectra of Eudragit® L100 (A), NP-BCO-R (B), NP-BCO-D (C), NP-EOL-R (D), NP-EOL-D I, and EO *Lippia graveolens* (F).

The morphology, size, and homogeneity of NP-EOL-R were further analyzed by SEM. Representative micrographs are presented in Figure 3.

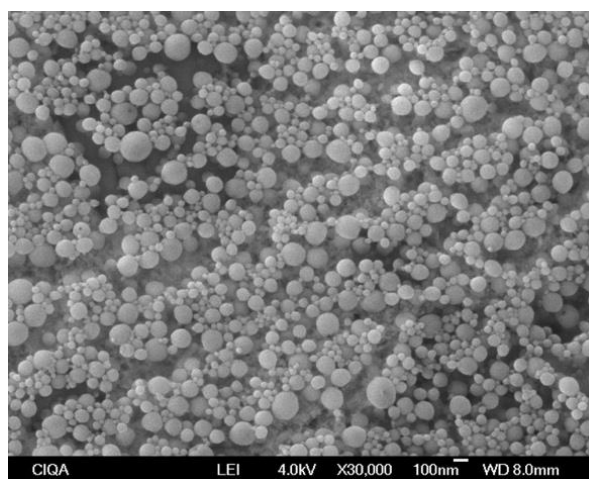


Figure 3. Evaluation of the size and homogeneity of nanoparticles loaded with *Lippia graveolens* essential oil, obtained by the nanoprecipitation technique and purified through evaporation, using scanning electron microscopy (SEM) at a magnification of $\times 30,000$.

2.3.3. Cytotoxicity Against Vero Cells and In Vitro Antiherpetic Activity

The cytotoxic effects of NP-EOL, NP-BCO, EOL, and CRV are shown in Table 2. NP-BCO formulations purified by dialysis and reduced pressure evaporation exhibited no cytotoxicity toward Vero cells at the tested concentrations ($>200 \mu\text{g/mL}$). The CC_{50} values for NP-EOL-R, NP-EOL-D, EOL, and CRV were 71.89, 57.16, 84.81, and 83.32 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Table 2. Cytotoxic effect against Vero cell lines, using MTT assay, and antiherpetic activity of polymeric nanoparticles loaded with EOL.

	Vero cells CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	HSV-1 IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SI
NP-EOL-R	71.89 ± 0.41	25.83 ± 1.53	2.78
NP-EOL-D	57.16 ± 0.86	36.60 ± 2.41	1.56
NP-BCO-R	> 200	ND	ND
NP-BCO-D	> 200	ND	ND
EOL	84.81 ± 1.36	47.74 ± 2.80	1.78
CRV	83.32 ± 1.17	27.55 ± 1.66	3.02

NP-EOL-R, EOL-loaded NPs purified by evaporation; NP-EOL-D, EOL-loaded NPs purified by dialysis; NP-BCO-R, NPs without EO purified by evaporation; NP-BCO-D, NPs without EO purified by dialysis; EOL, essential oil *Lippia graveolens*; CRV, carvacrol majority compound of EOL; SI, selectivity index ($\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$); CC_{50} , concentration which has a 50% inhibitory effect on cells ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=4$); IC_{50} , concentration which has a 50% reduction in PFU ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$); ND, not determined.

The antiherpetic activity of NP-EOL, NP-BCO, EOL, and CRV was evaluated using a plaque reduction assay. NP-EOL-R showed the highest antiviral efficacy, with an IC_{50} value of 25.83 $\mu\text{g/mL}$, compared with NP-EOL-D with an IC_{50} of 36.60 $\mu\text{g/mL}$. In contrast, EOL and CRV inhibited HSV-1 with IC_{50} values of 47.74 and 27.55 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The SI calculated for NP-EOL-R, NP-EOL-D, EOL, and CRV was 2.78, 1.56, 1.78, and 3.02, respectively.

2.3.4. Ex Vivo Biophysical Evaluation of Skin Treated with EOL-Loaded Nanoparticles

The biophysical parameters of porcine skin were evaluated before the application of the nanoformulations and after 4, 6 and 8 h of contact time (Figure 4). In the case of untreated skin, TEWL showed no significant changes after exposure to the nanoformulations (baseline value $36.59 \pm 2.42 \text{ g/m}^2\text{h}$; Figure 4A). Similarly, the surface pH of the untreated skin (6.09 ± 0.54) remained unchanged following the treatment (Figure 4B). However, a statistically significant increase was observed in the SCWC of treated skin compared with the untreated controls (baseline: $36.04 \pm 2.75 \text{ AU}$), after 4, 6 and 8 h of application (Figure

4C). In the case of NP-EOL-R, SCWC values nearly doubled. Regarding the melanin index, the values obtained after 4, 6 and 8 h of exposure to the nanoformulations were like those of the untreated skin (baseline: 50.43 ± 5.59 AU; Figure 4D). Finally, the erythema index decreased significantly after contact with the nanoformulations at all tested time points, compared with untreated skin (baseline: 149.55 ± 6.44 AU; Figure 4E).

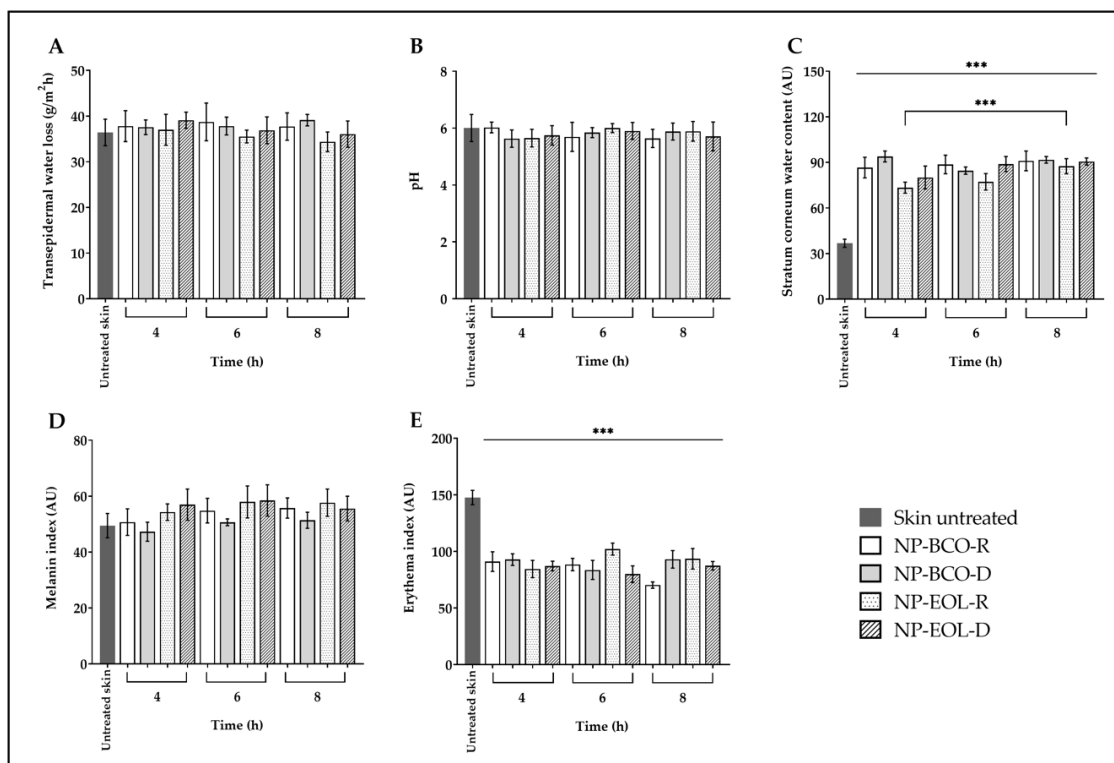


Figure 4. *Ex vivo* biophysical effect on transepidermal water loss (A), pH (B), stratum corneum water content (C), melanin (D), and erythema I after the contact of EOL-loaded NPs compared with untreated skin ($\bar{x} \pm SD$, $n=5$). *** Indicates significant differences $p < 0.001$, compared to untreated skin.

2.4. Discussion

In this study, NPs were developed with the aim of improving the topical delivery of oregano EO for the treatment of HSV-1. The NPs were formulated using the nanoprecipitation technique established by Fessi et al. which is widely employed for the encapsulation of hydrophobic compounds such as EOs (Albuquerque *et al.* 2022). This technique is distinguished by its simplicity, rapidity, and versatility, as it is compatible with a broad range of polymers and solvents, offering flexibility in material selection depending on the intended application (Martínez Rivas *et al.* 2017). Among the commonly used polymeric materials are polymethylmethacrylate derivatives, such as Eudragit® L100. This polymer has been approved by the FDA for the delivery of active compounds

targeted to the skin due to its ability to dissolve at pH 6. Frequently, in skin disorders besides inflammation and epidermal lesions, the pH tends to shift to a near neutral environment, this favors the release of the active compound (Ofriidam *et al.* 2021; Tiwari *et al.* 2022). Dong *et al.* (2019) evaluated the skin penetration and release of dexamethasone utilizing a Eudragit® L100-based NP through electron paramagnetic resonance studies. The results showed an *in vitro* release efficiency and skin penetration of dexamethasone in comparison with commercial cream; the experiments were both conducted on intact and barrier-disrupted skin at pH values above 6.

Once the NPs were obtained, their physicochemical characterization was carried out based on particle size, PDI, and zeta potential (Table 1). The NP-EOL-R formulation exhibited a size of 145.89 ± 5.89 nm. This result is consistent with that reported by Zhang *et al.* (2022) who prepared a Eudragit® L100-based NP loaded with *Piper nigrum* L. EO using nanoprecipitation followed by solvent removal under reduced pressure, obtaining particles with a size of 178 nm. On the other hand, the NP-EOL-D formulations showed a particle size of 232.1 ± 13.50 nm, in an agreement with the findings of Silva Flores *et al.* (2019) who encapsulated essential oils from *Rosmarinus officinalis* and *Lavandula dentata*, obtaining particle sizes ranging from 227 to 231 nm using the nanoprecipitation technique, followed by purification using dialysis. In our study, the particle size difference, of approximately 80 nm between NP-EOL-R and NP-EOL-D, is attributed to the process used to purify the NPs. Several studies have reported that solvent evaporation rate can influence the physicochemical characteristics of NPs, including their morphology, particle size, and release profile (Chung *et al.* 2002; Dai *et al.* 2021). During evaporation, the application of reduced pressure increases the solvent removal rate, generating density differences between the surface and the core of the particles. This phenomenon induces rapid structural relaxation, preventing the full extension of polymer chains and resulting in their contraction, which leads to smaller particles. Conversely, the slower solvent removal rate achieved by dialysis allows sufficient time for polymer chain rearrangement before the particle solidification occurs (Allison, 2007).

The particle sizes obtained for NP-EOL-R and NP-EOL-D fall within the 200 nm range. Donalisio *et al.* (2018) demonstrated that chitosan nanospheres loaded with acyclovir, with a particle size of 200 nm, exhibited 13-fold higher *in vitro* antiviral activity against

HSV-1 compared with non-encapsulated acyclovir. Furthermore, *in vitro* permeation studies showed that the NPs improved acyclovir deposition in the SC when compared with a commercial cream. In the present study, both NPs formulations exhibited a suitable particle size for deposition in the SC and within skin folds, making them appropriate candidates for the topical delivery of EOs.

The PDI is associated with particle size distribution within a population of NPs. In the Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments), the PDI values range from 0 to 1, where the ones closer to 0 indicate a uniform particle size distribution. In this study, the formulations presented a $PDI \leq 0.2$ (Table 1), which falls within the range considered acceptable for polymer-based nanoparticle applications (Danaei *et al.* 2018). A homogeneous particle size distribution is a critical attribute that ensures consistent NPs interactions (*e.g.*, bioadhesion and EO release) across the skin surface and with viral particles, potentially enhancing antiviral treatment efficacy.

In this study, the electrokinetic properties of nanoformulations were evaluated. The zeta potential is based on the measurement of the electrochemical equilibrium at the interface (Stern and diffuse layers) surrounding the dispersed NPs (Lunardi *et al.* 2021). The zeta potential of NP-EOL-R was -32.47 ± 2.18 mV, whereas NP-EOL-D exhibited a value of -15.90 ± 1.70 mV. The negative values indicate that negative charges dominate the diffuse double layer of the NPs, which is attributed to the anionic nature of the Eudragit® L100 polymer due to the ionization of carboxylic end groups exposed on the surface of the polymer chains (Ofriidam *et al.* 2021). The difference in the magnitude of the zeta potential between NP-EOL-R and NP-EOL-D may be due to the higher surface-to-volume ratio of the smaller NP (NP-EOL-R), which favors a greater interaction of the surface charges with ions in the surrounding medium. Moreover, studies on the electrical double layer in low ionic strength media such as distilled water have shown a less compact structure, facilitating more interactions between smaller particles and the medium, thereby increasing the zeta potential (Chu *et al.* 2023). Therefore, this increase in interactions for smaller NPs may explain why the zeta potential value of NP-EOL-R was approximately twice that of NP-EOL-D.

A NPs suspension is considered stable when it maintains its initial physical characteristics (*e.g.*, size, PDI, zeta potential) over a defined period. Visual appearance, such as the

absence of aggregates, is another relevant parameter for assessing stability (Wang *et al.* 2024). In colloidal systems, instability may occur when the absolute value of the zeta potential is low, indicating that attractive Van der Waals forces overcome repulsive forces, thus promoting particle aggregation. In contrast, when particles exhibit a high surface charge density or an absolute zeta potential equal to or greater than ± 30 mV, sufficient electrostatic repulsion is generated to prevent coalescence and promote formulation stability (Lunardi *et al.* 2021). According to the guidelines of the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), the storage stability of nanomedicines must be evaluated for a minimum of 12 months (Muthu and Feng, 2009; Dikpati *et al.* 2024). Figure 1 shows the stability of the nanoformulations stored at 25 °C and 40–60% relative humidity; these conditions were chosen based on the recommendations of current antiviral treatments. In this study, NP-EOL-R (Figure 1A) showed no changes in physical characteristics (size, PDI, zeta potential) over 480 days. In contrast, NP-EOL-D (Figure 1B) exhibited an increase in PDI from 0.1 to 0.3 after 8 days of storage, suggesting increased heterogeneity in particle size. Also, the zeta potential of NP-EOL-D decreased to -10 mV, indicating a reduction in electrostatic repulsion forces, which compromised the stability of the formulation and correlated with aggregate formation and phase separation. These results indicate that the storage conditions employed affected the integrity of NP-EOL-D. In contrast, colloidal systems with zeta potentials above ± 30 mV, such as NP-EOL-R, exhibited greater stability. This is consistent with the findings of Zhang *et al.* (2022) who developed a Eudragit® L100-based nanoparticle formulation loaded with *Black pepper* EO, which showed a zeta potential of -57 mV and remained stable for five weeks under various temperature conditions.

As part of the physicochemical characterization of the nanoformulations, the encapsulation efficiency percentage (%EE) was determined using a validated GC-FID method. The %EE values for NP-EOL-R and NP-EOL-D were 16.23 and 29.61%, respectively. These results were lower than those reported by previous reports (González-Moreno *et al.* 2024), likely due to differences in the polymer employed or the purification method used.

The FT-IR spectra obtained for the raw materials and nanoformulations are presented in Figure 2. The spectrum of the Eudragit® L100 polymer (Figure 2A) is consistent with the one reported by Saadallah *et al.* (2022). In the FT-IR spectra, two bands were observed, one near 1156.02 cm^{-1} and another in the region of 1255.91 cm^{-1} , both characteristic of C–O stretching vibrations of esters. Additionally, a band appeared around 1711.61 cm^{-1} corresponding to C=O stretching vibrations of carboxylic acids, and another at 3202.42 cm^{-1} associated with hydroxyl group (O–H) vibrations. These signals are characteristic of acrylic copolymers. The signals observed in the Eudragit® L100 polymer spectrum were also present in the spectra of NP-BCO-R and NP-BCO-D (Figures 2B and 2C, respectively), confirming that the structural characteristics of the polymer were preserved in both nanoformulations. On the other hand, the EOL spectrum (Figure 2F) showed a broad band around 3369.87 cm^{-1} and a peak at 2959.55 cm^{-1} , which are characteristic of O–H and C–H stretching vibrations, respectively. These signals are consistent with those reported by Gutiérrez *et al.* (2020). The O–H and C–H groups detected in the EOL spectrum may be attributed to the presence of CRV, a component with a phenolic functional group that is found in high proportion in EOL. The spectrum of NP-EOL-R (Figure 2D) was similar to that of NP-BCO-R, supporting the inference that the EOL was successfully encapsulated. Moreover, no new bands corresponding to the formation of new compounds were observed, indicating that only physical or weak chemical interactions occurred between the EOL and the polymeric chains, and that no chemical reactions took place among the NP components. In contrast, the spectrum of NP-EOL-D (Figure 2E) differed from that of NP-BCO-D, this finding suggests that some EOL components may have been retained or adsorbed on the polymer surface (Albuquerque *et al.* 2022).

As will be discussed later, NP-EOL-R exhibited favorable biological effects, which could offer a promising alternative for the treatment of HSV-1 infections. In consequence, it was also analyzed by SEM to assess the NPs morphology, size, and homogeneity in the size particles. As illustrated in Figure 3, the NPs exhibited a spherical shape and smooth surface. No particle aggregates were observed, and the particle size (within the 200 nm range) was consistent with the hydrodynamic diameter measured for NP-EOL-R ($145.89 \pm 5.89\text{ nm}$).

To evaluate the antiherpetic activity, Vero cells were used as this cell line was approved by the National Committee for Clinical Laboratory Standards for susceptibility tests against various viral infections, including HSV-1 (Leary *et al.* 2002). To explore the potential use of nano-encapsulated *Lippia graveolens* EO as an antiviral agent, the toxicity of the formulation was evaluated *in vitro* utilizing Vero cells. Cytotoxicity was assessed using the MTT assay for the treatments NP-BCO-R, NP-BCO-D, NP-EOL-R, NP-EOL-D, EOL, and its major component, CRV. As shown in Table 2, at concentrations below 200 µg/mL, NP-BCO purified by reduced pressure evaporation and dialysis did not exhibit cytotoxic effects on Vero cells. This finding aligns with Slavkova *et al.* (2024) who evaluated the cytotoxic effects of a Eudragit® L100 NP on the viability of the human keratinocyte HaCaT cell line, determining that the NPs did not reduce cell viability or exhibit toxic effects. Regarding the EOL, a CC_{50} of 84.81 ± 1.36 µg/mL was obtained. Previously, Velandia *et al.* (2017) reported a comparable cytotoxicity for *Lippia graveolens* EO in the HEK293 cell line, with a CC_{50} of 90.0 ± 18.1 µg/mL. For CRV, a CC_{50} of 83.32 ± 1.17 µg/mL was observed, which is similar to the value reported by Nakamura *et al.* (2018) who obtained a CC_{50} of 86 ± 1.41 µg/mL. Finally, the CC_{50} of NP-EOL-R was 71.89 ± 0.41 µg/mL, while that of NP-EOL-D was 57.16 ± 0.86 µg/mL, the latter showing greater cytotoxicity. In a previous study conducted by the same research group, the compounds present in the EOL were identified (González-Moreno *et al.* 2024). Therefore, the difference in cytotoxicity between the two nanoformulations could be related to the encapsulation of EOL components in different proportions depending on the purification method employed. It is worth noting that the reduced pressure evaporation method favored the encapsulation of compounds such as caryophyllene oxide and butylated hydroxyanisole, unlike dialysis. In a study conducted by Damayanti *et al.* (2015) the *in silico* toxicity of food preservatives was evaluated, and it was demonstrated that butylated hydroxyanisole exhibited moderate toxicity. Furthermore, another study reported that caryophyllene oxide inhibits the mitochondrial electron transport chain, which could affect cell viability and therefore modify toxicity (Monzote *et al.* 2009). However, further studies are needed to establish the cause of the observed toxic effects. Based on the cytotoxicity results in Vero cells, at concentrations of 11, 22, and with 44

$\mu\text{g/mL}$ of NP-BCO-R, NP-BCO-D, NP-EOL-R, and NP-EOL-D, EOL and CRV were selected for subsequent antiviral assays.

The antiviral activity of the nanoformulations against HSV-1 was evaluated using the plaque reduction assay, a widely accepted method to test susceptibility of viruses that can induce cytopathic effects (Landry *et al.* 2000). These effects manifest as structural and functional alterations in infected cells such as cell rounding, enlargement, granulation, syncytia formation, loss of adherence to the substrate, and cell lysis (Dolskiy, Grishchenko and Yudkin, 2020; Akkutay-Yoldar *et al.* 2025). Cellular damage caused by viral replication manifests in the formation of clear zones or plaques in the cell monolayer that become evident after staining the cells. Thus, the plaque reduction assay allows for the determination of the IC_{50} of a substance based on its ability to reduce the number of plaques formed. The IC_{50} values of the tested treatments are presented in Table 2. NP-BCO purified by reduced pressure evaporation and dialysis did not show *in vitro* antiviral activity against HSV-1 at any of the concentrations tested. In contrast, free CRV exhibited an IC_{50} of $27.55 \pm 1.66 \mu\text{g/mL}$, a value lower than that reported by Pilau *et al.* (2011) who obtained an IC_{50} of $48.6 \mu\text{g/mL}$. The IC_{50} of EOL was $47.74 \pm 2.80 \mu\text{g/mL}$, which is approximately half the value reported by Pilau *et al.* (2011) (IC_{50} de $99 \mu\text{g/mL}$). Some studies suggest that the antiviral activity of EOs and their components is due to their lipophilic nature, which can induce alterations in viral particles (disruption of the viral envelope or capsid disintegration) and interfere with viral binding to the host-cell receptors (Medina-Romero *et al.* 2021; Vilhelmova-ilieva *et al.* 2021). Gilling *et al.* (2014) reported that oregano EO at 4% (v/v) and CRV at 0.5% (v/v) caused an increase in the particle size of murine norovirus, capsid disintegration, and the subsequent loss of viral infectivity. In another study, pretreatment of HSV-1 virions with CRV at $100 \mu\text{M}$ resulted in a disruption of 79% of the viral envelope (Lai *et al.* 2012). Another proposed mechanism involves the inhibition of the interaction between the virus and host-cell receptors. In this context, thymol, another major component of EOL, has also been documented for its antiviral properties. In an *in silico* study, Cura *et al.* (2024) evaluated the interaction of thymol with HSV-1 and showed that hydrogen bonds were formed between thymol and the viral glycoproteins gB (*i.e.*, amino acids GLN416, LEU228, and GLU42) and gD (*i.e.*, amino acids PRO172 and ARG174); these interactions could

interfere with viral adhesion and penetration into hosts cells, thereby preventing the early steps of the infection process. On the other hand, the antiherpetic activity of NP-EOL-R showed an IC_{50} of $25.83 \pm 1.53 \mu\text{g/mL}$, compared with $36.60 \pm 2.41 \mu\text{g/mL}$ for NP-EOL-D, demonstrating greater antiviral effectiveness in the nanoparticles purified by reduced pressure evaporation. This difference could be related to the following factors: (i) The purification method influenced the profile of encapsulated compounds, as reflected in the %EE values obtained (*i.e.*, 16.92% for NP-EOL-R and 29.61% for NP-EOL-D). This variation suggests that each purification method favored the differential encapsulation of active components, thereby impacting the observed antiviral activity. (ii) The surface characteristics of the nanoparticles (zeta potential) may affect their interaction with the virus. In this regard, Yadavalli *et al.* (2020) reported that polyanionic molecules can interact with the cationic domains of viral glycoproteins (gB, gC). As noted previously, NP-EOL-R exhibited an absolute zeta potential nearly twofold greater than that of NP-EOL-D. This higher negative surface charge may contribute to enhanced electrostatic interactions with the virus, thereby facilitating the release of EOL and its interaction with the viral envelope. However, no experimental evidence is currently available to confirm this mechanism. Therefore, additional studies including release profiling, cellular uptake assays, and antiviral activity evaluation at different stages of the viral replication cycle are required to elucidate the mechanism responsible for the greater activity observed.

The SI is a parameter that indicates a compound's ability to inhibit a virus without significantly affecting host cells. It is calculated as the ratio between the cytotoxic concentration (CC_{50}) and the effective antiviral concentration (IC_{50}). A SI value equal to or greater than 4 suggests effective antiviral activity with low cytotoxicity, making the compound suitable for therapeutic use (Reichling, 2022). The SI values obtained in this study are presented in Table 2. As shown, the EOL exhibited a SI value of 1.78, while NP-EOL-R and NP-EOL-D had values of 2.78 and 1.56, respectively. These results indicate that encapsulating EOL in nanoparticles, combined with solvent removal by reduced pressure evaporation, increased the SI value, thereby improving both the safety and efficacy of EOL as an antiviral agent. Although the SI value obtained for NP-EOL-R did not reach the reference threshold ($SI \geq 4$), it is important to emphasize that this formulation improved selectivity compared with the free EO. Nevertheless, the SI value of below 4

highlights the need to optimize the nanoformulation. In this regard, adjustments in the preparation conditions (*e.g.*, solvents and polymer in the organic phase) and in the purification method could modify the profile of encapsulated and non-encapsulated compounds. Such modifications may reduce the contribution of components responsible for immediate cytotoxicity, thereby improving the balance between antiviral efficacy and safety.

The *in vitro* assays conducted in this study allowed for a controlled, rapid, and cost-effective evaluation of the antiviral potential of EOL encapsulated in NPs, as well as their effects on cell viability. However, the validation of these results in HSV-1 *in vivo* infection models is required, since such models offer a more complete perspective on efficacy, dosage, pharmacokinetics, and safety within a more complex biological system.

On the other hand, evaluating the effect of topical treatments using a porcine skin model is a versatile, efficient, and predictive approach that supports the development of new formulations. Because porcine skin is akin to human skin in various morphophysiological characteristics, such as vascular organization, lipid film composition, epidermal and SC thickness, and follicular structure, it is a suitable option for studying skin damage, wound healing, and drug delivery (Hwang *et al.* 2021). Another advantage is that porcine skin can be obtained as a slaughterhouse by-product, which helps address ethical concerns related to animal experimentation while also reducing experimental costs (Uhm *et al.* 2023).

Biophysical parameters such as TEWL, pH, water content, and the erythema and melanin index are among the most used indicators to assess the skin barrier function.

TEWL measurement is widely used in dermatological research as an indicator of skin barrier integrity as it calculates the amount of water that diffuses from the dermis and epidermis through SC to the skin surface (Klotz *et al.* 2021). When the skin is damaged, as in the case of skin disorders or burns, TEWL levels may increase, indicating impaired barrier function (Green *et al.* 2022).

As shown in Figure 4A, TEWL values did not differ significantly from untreated skin following the application of NP-EOL-R, NP-EOL-D, NP-BCO-R, and NP-BCO-D on the skin surface for 4, 6, and 8 h. These findings suggest that the water-based composition of

the nanoformulations did not compromise the skin's hydrolipidic barrier. Similar results were reported by Saraiva *et al.* (2023) who demonstrated that *in vivo* application of chitosan nanoparticles loaded with *Helichrysum italicum* EO on human skin did not significantly alter TEWL.

Another important parameter in maintaining skin barrier function is pH. In humans, the skin has an acidic pH ranging from 4.1 to 5.8, depending on the body site. Skin pH influences various functions, including keratinocyte differentiation and the formation and function of the lipid bilayer (Baker *et al.* 2023). As shown in Figure 4B, skin pH values did not change significantly after contact with the nanoformulations for 4, 6, and 8 h. These findings are consistent with *ex vivo* studies by Silva-Flores *et al.* (2023) who reported that the application of Eudragit® EPO nanoparticles loaded with *Rosmarinus officinalis* and *Lavandula dentata* EO caused no significant changes in skin pH on porcine skin. Previous studies have shown that formulations with an acidic pH help maintain the skin's natural acid mantle. In the present study, the applied nanoformulations did not alter skin pH, suggesting that they preserve the acidic environment essential for microbiome balance, thereby creating unfavorable conditions for the growth of pathogenic bacteria and fungi.

It is well known that the water content of the SC (SCWC) plays a crucial role in the appearance and health of the skin, as it influences its elasticity, flexibility, and functional properties such as active ingredient permeation. The SC normally contains between 10 and 30% water (Logger, 2024). However, various factors, including environmental exposure, surfactant use, solar radiation, or skin disorders, can reduce the SCWC to below 10%, affecting the enzymatic activity required for normal desquamation. This may lead to decreased flexibility and a dry, scaly appearance of the skin (Bari *et al.* 2024). Figure 4C shows the SCWC values following contact of the nanoformulations with the surface of porcine skin. A statistically significant increase in SCWC levels was observed compared with untreated skin. This increase may be attributed to the natural moisturizing factor, which is composed of amino acids and their derivatives, such as pyrrolidone carboxylic acid and urocanic acid, as well as lactates, urea, and electrolytes. These components possess hydroscopic properties that may help retain the water present in the nanoformulations, thereby contributing to skin hydration (Verdier-Sévrain and Bonté,

2007). Furthermore, given that the nanoformulations are an aqueous suspension containing more than 99% (w/w) water, this characteristic may, at least in part, account for the increase in the SCWC observed after their application. Notably, the SCWC values increased progressively with longer contact times of NP-EOL-R with the skin, suggesting that the nanoformulation may promote sustained SC hydration, which is promising for the development of topical systems with prolonged activity.

On the other hand, skin color changes can be evaluated as indicators of skin barrier integrity. Human skin color is primarily determined by the presence of melanin, hemoglobin, carotenoids, and bilirubin (Choi *et al.* 2014). Melanin not only contributes to pigmentation but also protects the skin against oxidative stress induced by UV radiation, air pollutants, and chemical compounds (Cho, 2021; Maddaleno *et al.* 2021). Melanin content varies with sex, age, ethnicity, lifestyle, environmental conditions, and exposure to certain substances (Lim and Lee, 2002; Dave *et al.* 2020). In an *in vivo* study, the melanin index of the skin was evaluated using a Mexameter probe after applying a cream containing *Olea europaea* leaf extract. These results indicated no significant changes in pigmentation after two months of treatment (Wanitphakdeedecha *et al.* 2020). These findings are consistent with the results shown in Figure 4D, where no statistically significant differences in the melanin index were observed between the skin treated with the nanoformulations and untreated skin, suggesting that the formulations do not alter melanin content on the skin surface. Moreover, the melanin index remained unchanged for up to 8 h post-application, indicating that the nanoformulations do not induce changes in skin melanin levels even after prolonged contact.

Regarding hemoglobin, which is present in red blood cells circulating through blood vessels, it is associated with the red coloration of the skin because it strongly reflects longer wavelengths while predominantly absorbing radiation in the shorter wavelength range (corresponding to blue) (Setaro and Sparavigna, 2002). Under certain conditions, such as contact with allergens, viral infections, or increased body temperature, vasodilation is triggered, increasing blood flow to the superficial capillaries of the skin. The accumulation of hemoglobin in these areas manifests as skin redness, known as erythema (Abdlaty *et al.* 2020). Yotsawimonwat *et al.* (2010) used the same Mexameter probe in an *in vivo* model to evaluate the erythema index after applying a cream containing

Echinacea purpurea extract. Their results showed no increase in erythema levels during the study period. As shown in Figure 4E, a statistically significant decrease in erythema index values was observed following the application of the nanoformulations compared with untreated skin. This result may suggest that the deposition of nanoparticles on the skin surface, due to their nanometric size and solid nature, favors the dispersion of incident light. Puentes Ossa *et al.* (2024) reported that conjugated fluorene silica nanoparticles sized between 100 and 125 nm are capable of scattering light and exhibit low absorption coefficients within the spectral range 300–800 nm, which encompasses the wavelengths used by the Mexameter (568–880 nm). Therefore, the amount of radiation absorbed by hemoglobin would be modified by the presence of the NPs, resulting in an apparent decrease in erythema values.

To our knowledge, the antiviral activity of EOL in NPs has not been previously reported.

2.5. Conclusions

In the present study, NP-EOL were obtained with adequate physicochemical characteristics for topical use. The results suggest that nanoencapsulation combined with purified evaporation under reduced pressure potentiated the antiherpetic activity of *Lippia graveolens* EO by about two times, and an improvement in the security profile. The biophysical evaluation in skin demonstrated that the nanoformulations favors SC hydration without compromising the skin barrier. Therefore, NP-EOL is a promising alternative for topic treatment against viral infections caused by HSV-1.

2.6. References

- Abdlaty R, Hayward J, Farrell T, Fang Q. (2020). Skin erythema and pigmentation optical assessment techniques: Review article. *Photodiagnosis Photodyn. Ther*, 33, 102127. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102127>.
- Akkutay-Yoldar Z, Yoldar MT, Akkaş YB, Şurak S, Garip F, Turan O, Ekizoğlu B, Yüca OC, Özkul A, Ünver B. (2025). A web-based artificial intelligence system for label-free virus classification and detection of cytopathic effects. *Sci. Rep*, 15, 5904. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-89639-0>.

- Alam P, Imran M, Ali A, Majid H. (2024). *Cananga odorata* (Ylang-Ylang) essential oil containing nanoemulgel for the topical treatment of scalp psoriasis and dandruff. *Gels*, 10, 303. <https://doi.org/10.3390/gels10050303>.
- Albuquerque PM, Azevedo SG, de Andrade CP, D'Ambros NCdS, Martins Perez MT, Manzato L. (2022). Biotechnological applications of nanoencapsulated essential oils : A review. *Polymers*, 14, 5495. <https://doi.org/10.3390/polym14245495>.
- Allison SD. (2007). Effect of structural relaxation on the preparation and drug release behavior of poly(lactic-co-glycolic) acid microparticle drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.*, 97, 2022–2035. <https://doi.org/10.1002/jps.21124>.
- Almansorri AK, Al-Shirifi HMH, Al-Musawi S, Ahmed BB. (2023). Investigation of the inhibition activity of aluminium oxide nanoparticles for herpes simplex type 1. *Arch. Razi Inst.*, 78, 213–219. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.358497.2237>.
- Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. (2004). Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J. Control. Release*, 99, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.06.015>.
- Andreu S, Ripa I, Bello-Morales R, López-Guerrero JA. (2020). Valproic acid and its amidic derivatives as new antivirals against alphaherpesviruses. *Viruses*, 12, 1356. <https://doi.org/10.3390/v12121356>.
- Badgujar Vaishnavi C, Shinde Ananya J, Nehete Jitendra Y, Bhambar Rajendra S. (2021). Strategies to improve stability of essential oils. *J. Pharm. Sci. Res.*, 13, 416–425.
- Baker P, Huang C, Radi R, Moll SB, Jules E, Arbiser JL. (2023). Skin barrier function: The interplay of physical, chemical, and immunologic properties. *Cells*, 12, 2745. <https://doi.org/10.3390/cells12232745>.
- Bari DS, Ali ZK, Hameed SA, Aldosky HYY. (2024). Evaluation of the effect of several moisturizing creams using the low frequency electrical susceptance approach. *J. Electr. Bioimpedance*, 15, 4–9. <https://doi.org/10.2478/joeb-2024-0002>.
- Center for Drug Evaluation and Research. (2020). *Recurrent Herpes Labialis: Developing Drugs for Treatment and Prevention*; U.S. Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA. Available online: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/recurrent-herpes-labialis-developing-drugs-treatment-and-prevention> (accessed on 15 July 2025).
- Cho YH. (2021). *Codonopsis pilosula* extract protects melanocytes against H₂O₂-induced oxidative stress by activating autophagy. *Cosmetics*, 8, 67. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030067>.

- Choi SY, Lee Y, Kim SS, Min Ju H, Baek JH, Park CS, Lee DH. (2014). Inhibitory effect of corn silk on skin pigmentation. *Molecules*, *19*, 2808–2818. <https://doi.org/10.3390/molecules19032808>.
- Chu B, Biriukov D, Bischoff M, Předota M, Roke S, Marchioro A. (2023). Evolution of the electrical double layer with electrolyte concentration probed by second harmonic scattering. *Faraday Discuss*, *246*, 407–425. <https://doi.org/10.1039/d3fd00036b>.
- Chung TW, Huang YY, Tsai YL, Liu YZ. (2002). Effects of solvent evaporation rate on the properties of protein-loaded PLLA and PDLLA microspheres fabricated by emulsion-solvent evaporation process. *J. Microencapsul*, *19*, 463–471. <https://doi.org/10.1080/02652040210140706>.
- Cura Bermudez PM. (2024). Análisis *in silico* de la interacción de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de orégano (*Lippia* sp.) con las proteínas de envoltura del herpes simple tipo 1 y evaluación toxicológica. Thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Dai X, Qiang X, Hils C, Schmalz H, Gröschel AH. (2021). Frustrated microparticle morphologies of a semicrystalline triblock terpolymer in 3D soft confinement. *ACS Nano*, *15*, 1111–1120. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c08087>.
- Damayanti S, Permana J, Tjahjono DH. (2015). The use of computational chemistry to predict toxicity of antioxidants food additives and its metabolites as a reference for food safety regulation. *Sch. Res. Libr.*, *7*, 174–181.
- Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari MR. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, *10*, 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- Dave BH, Thomas PS, Joshi PB, Shah PS. (2020). Prevalence of oral melanin pigmentation among children of 4-14 years of age and its association with passive smoking. *J. South. Asian Assoc. Pediatr. Dent.*, *3*, 19–22. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10077-3034>.
- de Sousa DP, Damasceno ROS, Amorati R, Elshabrawy HA, de Castro RD, Bezerra DP, Nunes VRV, Gomes RC, Lima TC. (2023). Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. *Biomolecules*, *13*, 1144. <https://doi.org/10.3390/biom13071144>.
- Dikpati A, Maio VDP, Ates E, Greffard K, Bertrand N. (2024). Studying the stability of polymer nanoparticles by size exclusion chromatography of radioactive polymers. *J. Control. Release*, *369*, 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.03.053>.

- Dolskiy AA, Grishchenko IV, Yudkin DV. (2020). Cell cultures for virology: Usability, advantages, and prospects. *Int. J. Mol. Sci.*, *21*, 7978. <https://doi.org/10.3390/ijms21217978>.
- Donalisio M, Leone F, Civra A, Spagnolo R, Ozer O, Lembo D, Cavalli R. (2018). Acyclovir-loaded chitosan nanospheres from nano-emulsion templating for the topical treatment of herpesviruses infections. *Pharmaceutics*, *10*, 46. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020046>.
- Dong P, Sahle FF, Lohan SB, Saaidpour S, Albrecht S, Teutloff C, Bodmeier R, Unbehauen M, Wolff C, Haag R, Lademann J, Patzelt A, Schafer-Korting M, Meinke CM. (2019). pH-sensitive Eudragit® L 100 nanoparticles promote cutaneous penetration and drug release on the skin. *J. Control. Release*, *295*, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.045>.
- Fekete GL, Fekete L, Ancuceanu R, Ianoși SL, Drăgănescu M, Brihan I. (2020). Acyclovir-induced immune thrombocytopenia: Case report and review of the literature. *Exp. Ther. Med.*, *20*, 3417–3420. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8971>.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury NBS. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, *55*, R1–R4.
- Gilling DH, Kitajima M, Torrey JR, Bright KR. (2014). Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *J. Appl. Microbiol.*, *116*, 1149–1163. <https://doi.org/10.1111/jam.12453>.
- González-Moreno BJ, Galindo-Rodríguez SA, Rivas-Galindo VM, Pérez-López LA, Granados-Guzmán G, Álvarez-Román R. (2024). Enhancement of strawberry shelf life via a multisystem coating based on *Lippia graveolens* essential oil loaded in polymeric nanocapsules. *Polymers*, *16*, 3. <https://doi.org/10.3390/polym16030335>.
- Gopinath D, Koe KH, Maharajan MK, Panda S. (2023). A comprehensive overview of epidemiology, pathogenesis and the management of herpes labialis. *Viruses*, *15*, 225. <https://doi.org/10.3390/v15010225>.
- Green M, Kashetsky N, Feschuk A, Maibach HI. (2022). Transepidermal water loss (TEWL): Environment and pollution—A systematic review. *Skin Health Dis.*, *2*, e104. <https://doi.org/10.1002/ski2.104>.
- Gutiérrez-Pacheco MM, Ortega-Ramírez LA, Silva-Espinoza BA, Cruz-Valenzuela M.R, González-Aguilar GA, Lizardi-Mendoza J, Miranda R, Ayala-Zavala JF. (2020). Individual and combined coatings of chitosan and Carnauba wax with oregano essential oil to avoid water loss and microbial decay of fresh cucumber. *Coatings*, *10*, 614. <https://doi.org/10.3390/coatings10070614>.

- Herrera-Rodríguez SE, López-Rivera RJ, García-Márquez E, Estarrón-Espinosa M, Espinosa-Andrews H. (2019). Mexican oregano (*Lippia graveolens*) essential oil-in-water emulsions: Impact of emulsifier type on the antifungal activity of *Candida albicans*. *Food Sci. Biotechnol.*, 28, 441–448. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0499-6>.
- Hwang JH, Jeong H, Lee N, Hur S, Lee N, Han JJ, Jang HW, Choi WK, Nam KT, Lim KM. (2021). *Ex vivo* live full-thickness porcine skin model as a versatile in vitro testing method for skin barrier research. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 657.
- Kalita S, Kandimalla R, Devi B, Kalita B, Kalita K, Deka M, Katakaci AC, Sharma A, Kotoky J. (2017). Dual delivery of chloramphenicol and essential oil by poly-ε-caprolactone–pluronic nanocapsules to treat MRSA-*Candida* co-infected chronic burn wounds. *RSC Adv.*, 7, 1749–1758. <https://doi.org/10.1039/c6ra26561h>.
- Klotz T, Maddern G, Caplash Y, Wagstaff M. (2021). Devices measuring transepidermal water loss of the skin: A systematic review protocol of measurement properties. *Skin Res. Technol.*, 28, 497–539. <https://doi.org/10.11124/JBIES-20-00468>.
- Lai WL, Chuang HS, Lee MH, Wei CL, Lin CF, Tsai YC. (2012). Inhibition of herpes simplex virus type 1 by thymol-related monoterpenoids. *Planta Med.*, 78, 1636–1638. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315208>.
- Landry ML, Stanat S, Biron K, Brambilla D, Britt W, Jokela J, Chou S, Drew WL, Erice A, Gilliam B, Lurain N, Manischewitz J, Miner R, Nokta M, Reichelderfer P, Spector S, Weinberg A, Yen-Lieberman B, Crumpacker C. (2000). A standardized plaque reduction assay for determination of drug susceptibilities of cytomegalovirus clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 688–692. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.688-692.2000>.
- Leary JJ, Wittrock R, Sarisky RT, Weinberg A, Levin MJ. (2002). Susceptibilities of herpes simplex viruses to penciclovir and acyclovir in eight cell lines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 762–768. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.762-768.2002>.
- Lim TW, Lee MH. (2002). A study of skin color by melanin index according to sex, age, site and skin phototype in Koreans. *Ann. Dermatol.*, 14, 71. <https://doi.org/10.5021/ad.2002.14.2.71>.
- Logger JGM. (2024). General introduction and thesis outline. In *Noninvasive Assessment of Healthy and Inflamed Skin*; Universitair Medisch Centrum Utrecht: Utrecht, The Netherlands.
- Lunardi CN, Gomes AJ, Rocha FS, De Tommaso J, Patience GS. (2021). Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. *Can. J. Chem. Engineering*, 99, 627–639. <https://doi.org/10.1002/cjce.23914>.

- Ma L, Yao L. (2020). Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: An updated review. *Molecules*, 25, 2627. <https://doi.org/10.3390/molecules25112627>.
- Madawi EA, Al Jayoush RA, Rawas-Qalaji M, Ei Thu H, Khan S, Sohail M, Mahmood A, Hussain, Z. (2023). Polymeric nanoparticles as tunable nanocarriers for targeted delivery of drugs to skin tissues for treatment of topical skin diseases. *Pharmaceutics*, 15, 657. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020657>.
- Maddaleno AS, Camargo J, Mitjans M, Vinardell MP. (2021). Melanogenesis and melasma treatment. *Cosmetics*, 8, 82. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030082>.
- Maranduca MA, Hurjui LL, Branisteanu DC, Serban DN, Branisteanu DE, Dima N, Serbanm IL. (2020). Skin—A vast organ with immunological function (review). *Exp. Ther. Med.*, 20, 18–23. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8619>.
- Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, Galindo Rodríguez SA, Álvarez Román R, Fessi H, Elaissari A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 532, 66–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>.
- Medina-Romero YM, Hernandez-Hernandez AB, Rodriguez-Monroy MA, Canales-Martínez MM. (2021). Essential oils of *Bursera morelensis* and *Lippia graveolens* for the development of a new biopesticides in postharvest control. *Sci. Rep.*, 11, 20135. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99773-0>.
- Monzote L, Stamberg W, Staniek K, Gille L. (2009). Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 240, 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.001>.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Muthu MS, Feng SS. (2009). Pharmaceutical stability aspects of nanomedicines. *Nanomedicine*, 4, 857–860. doi:10.2217/NMM.09.75.
- Nagra U, Barkat K, Ashraf MU, Shabbir M. (2022). Feasibility of enhancing skin permeability of acyclovir through sterile topical lyophilized wafer on self-dissolving microneedle-treated skin. *Dose Response Int. J.*, 20, 15593258221097594. <https://doi.org/10.1177/15593258221097594>.
- Nakamura de Vasconcelos SS, Caleffi-Ferracioli KR, Hegeto LA, Baldin VP, Nakamura CV, Stefanello TF, Freitas Gauze G, Yamazaki DAS, Scodro RBL, Siqueira VLD, Cardoso RF,

- Yamazaki DAS, Scodro RBL, Siqueira VLD, Cardoso RF. (2018). Carvacrol activity & morphological changes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.*, *13*, 877–888.
- Ofridam F, Lebaz N, Gagnière É, Mangin D, Elaissari A. (2021). Polymethylmethacrylate derivatives Eudragit® E100 and L100: Interactions and complexation with surfactants. *Polym. Adv. Technol.*, *32*, 379–390. <https://doi.org/10.1002/pat.5093>.
- Orchard A, Vuuren SV. (2017). Commercial essential oils as potential antimicrobials to treat skin diseases. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, *1*, 4517971. [doi:doi.org/10.1155/2017/4517971](https://doi.org/10.1155/2017/4517971).
- Pilau MR, Alves SH, Weiblen R, Arenhart S, Cueto AP, Lovato LT. (2011). Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Braz. J. Microbiol.*, *42*, 1616–1624. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400049>.
- Piperi E, Papadopoulou E, Georgaki M, Dovrat S, Illan MB, Nikitakis NG, Yarom N. (2023). Management of oral herpes simplex virus infections: The problem of resistance. A narrative review. *Oral Dis.*, *30*, 877–894. <https://doi.org/10.1111/odi.14635>.
- Predoi D, Groza A, Iconaru SL, Predoi G, Barbuceanu F, Guegan R, Motelica-Heino MS, Cimpeanu C. (2018). Properties of basil and lavender essential oils adsorbed on the surface of hydroxyapatite. *Materials*, *11*, 652. <https://doi.org/10.3390/ma11050652>.
- Puentes Ossa A, Rodriguez Patarroyo DJ, Salamanca Bernal JA. (2024). Computational modeling of light scattering in polymer nanoparticles for optical characterization. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, *34*, 63–75. <https://doi.org/10.18359/rcin.7276>.
- Reichling J. (2022). Antiviral and virucidal properties of essential oils and isolated compounds—A scientific approach. *Planta Med.*, *88*, 587–603. <https://doi.org/10.1055/a-1382-2898>.
- Saadallah MS, Hamid OA. (2022). Eudragit® L100 nanoparticles for transdermal delivery of rosuvastatin calcium. *J. Excip. Food Chem.*, *13*, 80–93.
- Saraiva SM, Crespo AM, Vaz F, Filipe M, Santos D, Jacinto TA, Paiva-Santos AC, Rodrigues M, Ribeiro MP, Coutinho P, Araujo ARTS. (2023). Development and characterization of thermal water gel comprising *Helichrysum italicum* essential oil-loaded chitosan nanoparticles for skin care. *Cosmetics*, *10*, 8. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10010008>.
- Setaro M, Sparavigna A. (2002). Quantification of erythema using digital camera and computer-based colour image analysis: A multicentre study. *Skin Res. Technol.*, *8*, 84–88. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0846.2002.00328.x>.

- Silva Flores PG. (2019). Desarrollo y evaluación dermatocinética de nanopartículas con aceites esenciales para su aplicación en piel. Doctoral Thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Silva-Flores PG, Galindo-Rodríguez SA, Pérez-López LA, Álvarez-Román R. (2023). Development of essential oil-loaded polymeric nanocapsules as skin delivery systems: Biophysical parameters and dermatokinetics *ex vivo* evaluation. *Molecules*, *28*, 7142. <https://doi.org/10.3390/molecules28207142>.
- Silva-Mares D, Rivas-Galindo VM, Salazar-Aranda R, Pérez-Lopez LA, Waksman De Torres, N, Pérez-Meseguer J, Torres-Lopez E. (2019). Screening of north-east Mexico medicinal plants with activities against herpes simplex virus and human cancer cell line. *Nat. Prod. Res.*, *33*, 1531–1534. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1423300>.
- Slavkova M, Lazov C, Spassova I, Kovacheva D, Pencheva-El Tibi I, Stefanova D, Tzankova V, Petrov PD, Yoncheva K. (2024). Formulation of budesonide-loaded polymeric nanoparticles into hydrogels for local therapy of atopic dermatitis. *Gels*, *10*, 79. <https://doi.org/10.3390/gels10010079>.
- Tiwari N, Osorio-blanco ER, Sonzogni A, Esporrín-Ubieto D, Wang HM, Calderón M. (2022). Nanocarriers for skin applications: Where do we stand? *Angew. Chem. Int. Ed.*, *61*, e202107960. <https://doi.org/10.1002/ange.202107960>.
- Uhm C, Jeong H, Hyon S, Hwang JS, Lim KM, Nam KT. (2023). Comparison of structural characteristics and molecular markers of rabbit skin, pig skin, and reconstructed human epidermis for an *ex vivo* human skin model. *Toxicol. Res.*, *39*, 477–484. <https://doi.org/10.1007/s43188-023-00185-1>.
- Velandia S, Quintero E, Stashenko EE, Ocazonez RE. (2017). Actividad antiproliferativa de aceites esenciales de plantas cultivadas en Colombia. *Acta Biológica Colomb.*, *23*, 189–198. <https://doi.org/10.15446/abc.v23n2.67394>.
- Verdier-Sévrain S, Bonté F. (2007). Skin hydration: A review on its molecular mechanisms. *J. Cosmet. Dermatol.*, *6*, 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x>.
- Vilhelmova-Ilieva N, Dobрева A, Doynovska R, Krastev D, Mileva M. (2021). Antiviral activity of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa alba* L. essential oils against the multiplication of herpes simplex virus type 1 strains sensitive and resistant to acyclovir. *Biology*, *10*, 746. <https://doi.org/10.3390/biology10080746>.
- Wang B, LvYe J, Yang S, Shi Y, Chen Q. (2024). Critical review of food colloidal delivery system for bioactive compounds: Physical characterization and application. *Foods*, *13*, 2596. <https://doi.org/10.3390/foods13162596>.

- Wanitphakdeedecha R, Natasha J, Junsuwan N, Phaitoonwattanakij S, Phothong W, Eimpunth S, Manuskiatti W. (2020). Efficacy of olive leaf extract—Containing cream for facial rejuvenation: A pilot study. *J. Cosmet. Dermatol.*, *19*, 1662–1666. <https://doi.org/10.1111/jocd.13457>.
- Yadavalli T, Mallick S, Patel, P, Koganti R, Shukla D, Date AA. (2020). Pharmaceutically acceptable carboxylic acid-terminated polymers show activity and selectivity against HSV-1 and HSV-2 and synergy with antiviral drugs. *ACS Infect. Dis.*, *6*, 2926–2937. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00368>.
- Yotsawimonwat S, Rattanadechsakul J, Rattanadechsakul P, Okonogi S. (2010). Skin improvement and stability of *Echinacea purpurea* dermatological formulations. *Int. J. Cosmet. Sci.*, *32*, 340–346. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00559.x>.
- Zhang M, Qiu B, Sun M, Wang Y, Wei M, Gong Y, Yan M. (2002). Preparation of Black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil nanoparticles and its antitumor activity on triple negative breast cancer in vitro. *J. Food Biochem.*, *46*, e14406. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14406>.
- Zoabi A, Touitou E, Margulis K. (2021). Recent advances in nanomaterials for dermal and transdermal applications. *Colloids Interfaces*, *5*, 18. <https://doi.org/10.3390/colloids5010018>.

CAPÍTULO III

Validación de un método HS-SPME-GC para la cuantificación de nanopartículas con aceite esencial de *Lippia graveolens* y su análisis en muestras de piel para un tratamiento potencial contra el herpes

3.1. Introducción

La Nanotecnología es uno de los campos de estudio más promisorios del siglo XXI. Especialmente, en la Biología y la Medicina, ha tenido importantes aportaciones en el diseño de nuevas formas de liberación de fármacos y moléculas biológicamente activas (Rauta *et al.* 2020). Dentro de estos sistemas, las nanopartículas poliméricas (NPs) destacan como estructuras coloidales sólidas cuyo tamaño varía entre 10 y 1000 nm (Yadav *et al.* 2019). Los beneficios obtenidos de su uso como acarreadores de principios activos se debe a sus características fisicoquímicas: escala nanométrica, elevada área superficial, versatilidad en sus propiedades de superficie y capacidad para proteger al principio activo encapsulado (Ribovski *et al.* 2021; Zielinska *et al.* 2020). Entre estas propiedades, el tamaño de las NPs es un factor determinante, ya que influye en su interacción con células específicas y con barreras biológicas como la piel (Ghasemiyeh & Mohammadi-Samani, 2020; Zoabi *et al.* 2021). Numerosas preparaciones nanoparticuladas innovadoras han sido aplicadas sobre la superficie de la piel buscando una acción terapéutica local (Donalisio *et al.* 2018; Dong *et al.* 2019; Guadarrama-Acevedo *et al.* 2019; Mir *et al.* 2019; Sahle *et al.* 2017). Se ha demostrado que las NPs cercanas a 200 nm tienden a acumularse principalmente en los folículos pilosos y en los pliegues de la piel, sin penetrarlo (Alvarez-Román *et al.* 2004). Este comportamiento disminuye de manera significativa los posibles efectos tóxicos y alérgicos de los compuestos encapsulados, asegurando un perfil de seguridad adecuado para su aplicación tópica.

Por otro lado, los aceites esenciales (EO) son mezclas complejas de compuestos aromáticos derivados del metabolismo secundario de las plantas y ampliamente reconocidos por sus actividades biológicas benéficas en la piel (Mazzarello *et al.* 2018; Rai *et al.* 2020; Talebi *et al.* 2020). Particularmente, el EO de orégano ha destacado por sus propiedades como antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio, antifúngico y antiviral (de Almeida *et al.* 2022; Mediouni *et al.* 2020; Mutlu-Ingok *et al.* 2021; Sidiropoulou *et al.* 2022). Sin embargo, la aplicación terapéutica de los EO se ha visto limitada debido a su inestabilidad química, atribuida a la degradación de sus componentes por la luz y el oxígeno del aire (Badgujar Vaishnavi, Shinde Ananya, Nehete Jitendra, & Bhambar Rajendra, 2021; Turek & Stintzing, 2013). Para superar estas limitaciones, se

han desarrollado diferentes sistemas nanoparticulados con la intención de proteger y aumentar la vida media de los EO. Por ejemplo, Piña-Barrera *et al.* (2019), encapsularon el EO de *Thymus vulgaris* en NPs para su aplicación en la conservación de la uva de mesa (*Vitis vinifera* L.). Los resultados demostraron que la estructura polimérica evitó la rápida evaporación de los compuestos volátiles del EO, prolongando su permanencia en la superficie del fruto y preservando su actividad antioxidante y antimicrobiana, lo que contribuyó a prolongar la vida útil del fruto. De manera similar, Silva-Flores *et al.* (2023), encapsularon el EO de *Rosmarinus officinalis* y *Lavandula dentata* en NPs para potenciar su aplicación antioxidante en el cuidado de la piel. La nanoencapsulación evitó la degradación de los componentes de los EO, lo que permitió conservar su actividad antioxidante y, al mismo tiempo, favoreció una mayor deposición en el estrato córneo (SC) en comparación con los EO libres, contribuyendo a su potencial como agentes dermatoprotectores.

Sin embargo, cuando el EO se encuentra encapsulado en matrices poliméricas, los problemas más frecuentemente encontrados en la cuantificación de sus componentes es la interferencia analítica del polímero y/o del agente tensoactivo. Una de las propuestas analíticas de extracción y posterior cuantificación de los componentes del EO es la microextracción en fase sólida (SPME) modalidad espacio de cabeza (HS), que permite extraer la fracción volátil de muestras complejas de manera simple, rápida y con una reducción en el uso de disolventes orgánicos, favoreciendo la preconcentración de la muestra (Lancioni *et al.* 2022). El acoplamiento de HS-SPME con cromatografía de gases (GC) ha mostrado ser altamente eficaz. Por ejemplo, se reportó la aplicación de HS-SPME-GC para determinar el porcentaje de eficiencia de encapsulación del EO de *Thymus vulgaris* a través de sus componentes mayoritarios en la formulación de NPs. Los porcentajes de eficiencia de encapsulación de γ -terpineno, timol y carvacrol fueron de 25, 68 y 3%, respectivamente (96% del EO total) (Lugo-Estrada *et al.* 2019). La GC se ha consolidado como una técnica ampliamente utilizada debido a que presenta una buena precisión y exactitud. En un trabajo, se desarrolló un método analítico por GC para la cuantificación de los EO de nuez moscada, menta y albahaca. El método mostró ser exacto con valores de recuperación de 97.43 – 100.86 % y con mediciones de precisión intradia de 1.083 y 7.296 % e interdia de 1.308 y 7.924 % (Lim *et al.* 2019). Otra de las ventajas

de la GC es que permite alcanzar una alta resolución (≥ 1.5) en todos sus picos, lo que se traduce en una separación completa que garantiza una adecuada cuantificación de los componentes (Brian, 2023). Además, esta técnica requiere una pequeña cantidad de muestra para el análisis, normalmente entre 1 a 3 μL , lo que representa una ventaja debido a la limitación para obtener EO en grandes volúmenes (Tollbäck *et al.* 2003). Asimismo, la GC ofrece la posibilidad de elegir las herramientas de detección tanto universales como selectivos. Entre los más empleados se encuentra el detector de ionización de llama (FID) el cual proporciona un amplio rango de respuesta lineal que permite el análisis a una elevada sensibilidad al detectar compuestos en concentraciones bajas (ppm o ppb) o presentes en trazas (Makoš *et al.* 2019). Pese a estos avances, aún existen pocos estudios que empleen HS-SPME-GC para cuantificar EO encapsulados en NPs con aplicación tópica, es decir que involucre muestras de piel.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar un método analítico por HS-SPME-GC para cuantificar el EO de *Lippia graveolens* en ensayos de deposición *ex vivo* en piel porcina para su futura aplicación tópica en el tratamiento del HSV-1.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material biológico y reactivos. El material vegetal de *Lippia graveolens* se recolectó en Coahuila de Zaragoza (26°59' N 102°03'59'' OE), México durante el mes de junio. El ejemplar fue identificado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. La piel de oreja de cerdo se obtuvo de un rastro (Monterrey, NL, México). El tejido se conservó a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se utilizó durante las siguientes cuatro semanas.

El metanol (Fisher Chemical, Waltham, MA, USA), la acetona y el alcohol isopropílico (Tedia, Fairfield, OH, USA) eran de calidad HPLC. El agua destilada procedía de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Veolia, Boston, MA, USA). La solución estándar de β -mirceno ($\geq 99.5\%$), ρ -cimeno ($\geq 97\%$), carvacrol ($\geq 98\%$) y anetol (99%) fue de grado GC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Eudragit L100 (copolímero de ácido metacrílico-metilmacrilato (1:1)) fue donado amablemente por Helm (Naucalpan, Estado de México,

México). Se utilizaron dos fibras: carboxeno/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) y poliacrilato (PA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.2.2. Extracción de aceite esencial. El EO se obtuvo de plantas recién cortadas de *Lippia graveolens* (EOL), mediante la técnica de hidrodestilación. Para obtener el EOL, el matraz se colocó en un aparato tipo Clevenger durante 4 horas a 100 °C. El EO se recolectó, se almacenó en una botella ámbar perfectamente sellada y se mantuvo a -4 °C hasta su uso.

3.2.3. Caracterización fisicoquímica del aceite esencial. La identificación de los componentes del EOL se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (González-Moreno *et al.* 2024). Para determinar la proporción de cada componente del EOL, se efectuó un análisis cuantitativo por GC-FID utilizando un cromatógrafo de gases Clarus 480 (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) equipado con una columna capilar Elite-5 (5% difenil – 95% polidimetilsiloxano, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (PerkinElmer, Shelton, CT, USA). El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 35 °C durante 9 min, posteriormente se incrementó hasta 150 °C a una razón de 3 °C min⁻¹ y se mantuvo por 10 min. Después, la temperatura se elevó hasta 250 °C a 10 °C min⁻¹, seguida de un aumento hasta 270 °C at 3 °C min⁻¹, manteniéndose durante 16 min. Las temperaturas del inyector y del detector se establecieron en 220 °C y 280 °C, respectivamente. El EOL se inyectó a una concentración de 2 mg mL⁻¹ en modo *split*. El flujo del gas portador, helio (99.999%) fue de 1.0 mL min⁻¹. La composición porcentual de los componentes del EOL se determinó considerando el área total de las señales obtenidas y el área correspondiente a cada componente (Silva-Flores *et al.* 2019).

La densidad relativa del EOL se midió mediante un densímetro portátil Anton Paar (DMA35, Ashland, VA, USA) según el método general 0251 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 2011). Para determinar el índice de refracción del EOL se empleó un refractómetro Anton Paar (Abbemat 200, Ashland, VA, USA) con base en el método 0741 de la FEUM (2011). La rotación específica se determinó en un polarímetro (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) según el método 0771 de la FEUM (2011). La densidad relativa y la prueba del índice de refracción se realizaron a 25 °C por

triplicado, mientras que la rotación específica se realizó por sextuplicado. En todas las evaluaciones se utilizó el anetol como control (Lugo-Estrada *et al.* 2019).

Continuando con la caracterización, la estabilidad del EOL se determinó mediante análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). El EOL se analizó directamente, sin ningún tratamiento previo. Los espectros se registraron con un promedio de 64 barridos en el rango de frecuencia de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} utilizando un espectrómetro Frontier FT-IR (PerkinElmer, Waltham, MA USA). El análisis FT-IR del EOL se realizó cada 6 meses durante un periodo de almacenamiento de 30 meses. Finalmente, se llevó a cabo una correlación de los espectros obtenidos utilizando el programa QUANT.

3.2.4. Validación del método HS-SPME-GC. El análisis cuantitativo por HS-SPME-GC se realizó utilizando soluciones estándar de los principales componentes del EOL (β -mirceno, ρ -cimeno y carvacrol). Se preparó una solución madre (7.5 mg mL^{-1}) que contenía β -mirceno (1.4 mg mL^{-1}), ρ -cimeno (0.6 mg mL^{-1}) y carvacrol (5.5 mg mL^{-1}) en metanol. A partir de esta mezcla, se emplearon diferentes volúmenes para construir la curva de calibración en cinco concentraciones totales (15–240 $\mu\text{g mL}^{-1}$), manteniendo las proporciones relativas de los tres componentes.

El análisis de GC-FID se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases Clarus 480 (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) equipado con una columna capilar Elite-5 (5% difenil – 95% polidimetilsiloxano, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) (PerkinElmer, Shelton, CT, USA). El programa del horno inició a 60 $^{\circ}\text{C}$ y se incrementó hasta 116 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ durante 1-min, luego se aumentó a 118 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 1 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, y finalmente hasta 280 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 45 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ con un mantenimiento de 4-min. Las temperaturas del inyector y del detector se establecieron en 250 $^{\circ}\text{C}$, utilizando el modo splitless. El gas portador fue helio (99.999%) con un flujo de 1.0 mL min^{-1} .

Para el análisis por HS-SPME, se evaluaron dos tipos de fibras de sílice fundida con diferente recubrimiento y polaridad: CAR/PDMS y PA. Antes de su uso, las fibras fueron

aconditionadas de acuerdo con las intrucciones del fabricante. Las condiciones de extracción se desarrollaron según lo descrito por Lugo-Estrada *et al.* (2019).

El método fue validado en términos de linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión y exactitud, conforme a las directrices de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, 2005) y la Secretaría de Salud (Secretaría de Salud, 2011).

La linealidad se evaluó a partir de la curva de calibración construida con cinco niveles de concentración, cada uno analizado por triplicado. El coeficiente de determinación (R^2) de la regresión lineal se obtuvo mediante la ecuación $y = mx + b$, donde y representa la respuesta cromatográfica (área del pico del analito) y x la concentración.

El LOD (1) y el LOQ (2) se calcularon a partir de la curva de calibración utilizando las ecuaciones mostradas anteriormente.

$$\text{LOD} = \frac{3.3\sigma}{S} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S} \quad (2)$$

donde σ es la desviación estándar de los interceptos y S es la pendiente de la curva de calibración.

La precisión interdia se determinó calculando el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) de la respuesta obtenida a partir de las NP-EOL junto con los estándares de calibración (rango 15–240 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Este parámetro se evaluó por sextuplicado y de manera independiente.

La exactitud se evaluó adicionando un volumen conocido de NP cargadas con EO a la mezcla de los estándares de los componentes del EOL (15–240 $\mu\text{g mL}^{-1}$), por triplicado. La exactitud se expresó como el porcentaje de recuperación de los componentes principales. El valor promedio de concentración obtenido para cada nivel se comparó con el valor teórico, considerando como 100% .

3.2.5. Preparación y caracterización de nanopartículas cargadas con EOL. Las NPs cargadas con EOL se prepararon de acuerdo con el método de nanoprecipitación desarrollado por Fessi *et al.* (1989). La fase orgánica contenía 25 mg de Eudragit L100 y 50 mg de EOL disueltos en 15 mL de una mezcla de disolventes orgánicos (acetona:isopropanol, 1:1). Esta fase orgánica se inyectó bajo agitación magnética constante (400 rpm) en una fase acuosa que contenía 20 mL de agua destilada. La eliminación de la mezcla de disolventes se llevó a cabo mediante dos técnicas de purificación: diálisis y evaporación a presión reducida. Para la diálisis, la suspensión de NPs se colocó en una membrana de celulosa regenerada Spectrum/Por®4 (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA), la cual se sumergió en un recipiente con agua destilada en agitación a 25 °C durante 2 horas, realizando dos cambios de agua. Por otro lado, para la evaporación a presión reducida, la suspensión de NPs se colocó en un rotavapor Laborota 4003 control (Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) a 20 °C, con una velocidad de rotación de 100 rpm durante 25 min. Las NPs cargadas con EOL purificadas por diálisis se identificaron como NP-EOL-D, mientras que aquellas purificadas por evaporación se denominaron NP-EOL-R. Las NPs sin carga (NP-BCO) se obtuvieron mediante el mismo procedimiento, sin añadir el EOL.

La caracterización fisicoquímica de las formulaciones se determinó a partir de una suspensión acuosa de NP cargadas con EOL. El tamaño promedio de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) se midieron por triplicado mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) utilizando un Zetasizer Nano-ZS90 ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

3.2.6. Aplicabilidad del método HS-SPME-GC.

3.2.6.1. Determinación del porcentaje de encapsulación (%EL) and eficiencia de encapsulación (%EE). Una vez validado el método HS-SPME-GC, se determinó la cantidad de los componentes (β -mirceno, ρ -cimeno y carvacrol) presentes en las NPs. Con los datos obtenidos, se calculó el %EL (3) y %EE (4) de acuerdo con las siguiente ecuaciones:

$$\%EL = \frac{(\text{mg componente del EO encapsulado})}{(\text{mg de polímero} + \text{mg componente del EO total})} \times 100 \quad (3)$$

$$\%EE = \frac{(\text{mg componente del EOL encapsulado})}{(\text{mg componente del EO total})} \times 100 \quad (4)$$

3.2.6.2. *Cuantificación de NPs cargadas con EOL en muestras de piel mediante la técnica de tape stripping.* Los estudios de permeación se realizaron utilizando piel de oreja de cerdo en celdas de difusión de Franz modificadas. La piel porcina se descongeló y se colocó entre los compartimentos donador y receptor. El compartimento donador se llenó con 1.0 mL de NPs cargadas con EOL y NP-BCO, y se cubrió para prevenir la evaporación durante 4, 6 y 8 horas de tiempo de contacto con la piel. El medio receptor consistió en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7.4. Las muestras se mantuvieron bajo agitación constante a una temperatura de 36 ± 0.5 °C. Después del tiempo de contacto, la muestra de piel se retiró de la celda de Franz, y la formulación residual se eliminó de la superficie cutánea secando suavemente con algodón. Además, el medio receptor se tomó a las 4, 6 y 8 horas y se analizó mediante el método HS-SPME-GC para cuantificar la permeación de los componentes a través de la piel. Asimismo, se utilizó la técnica de *tape stripping* para determinar los componentes (β -mirceno, ρ -cimeno y carvacrol) en las muestras de piel después de la aplicación de NP-EOL-R y NP-EOL-D. Se realizaron cinco remociones sucesivas del SC utilizando tira adhesivas (845 Scotch® Book Tape, 3M, Boca Raton, FL, USA) previamente acondicionada. Las cintas se colocaron en tubos con 10 mL de metanol y se sometieron a agitación a 200 rpm durante 30 min. La cantidad de los principales componentes del EOL presentes en el SC se determinó mediante el método HS-SPME-GC previamente validado. La cantidad de SC removido se determinó pesando individualmente las tiras antes y después de la remoción en una balanza semianalítica (Scientech, SM50, Boulder, CO, USA). Asumiendo que la densidad del SC es constante (1 g cm^{-3}) a lo largo de su espesor, los pesos del SC pueden convertirse a volúmenes y, dando que el área removida es constante (2.54 cm^2), se puede calcular la profundidad del SC eliminado (Sekkat *et al.* 2002).

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante una prueba ANOVA de dos factores con el software GraphPad Prism version 8.0, seguida de una comparación múltiple con la prueba de Tukey. Se consideró un nivel de significancia de 0.05 ($p < 0.05$).

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Caracterización fisicoquímica de aceite esencial. En el presente estudio, el análisis químico del EOL por GC-MS y GC-FID permitió determinar los componentes principales: β -mirceno (15.63%), ρ -cimeno (7.58%) y carvacrol (63.20%) (Figura 1). Estos resultados coinciden con los reportados por González-Moreno *et al.* (2024). Cabe mencionar que Herrera-Rodríguez *et al.* (2019) reportó al ρ -cimeno (18.72%), timol (31.66%) y carvacrol (14.58%) como los componentes mayoritarios del EO de *Lippia graveolens* originario de Nextipac, Jalisco, Mexico. Esta variabilidad en la composición química y en la abundancia de los componentes de los EO depende de diversos factores, tales como las condiciones de crecimiento, la temporada de colecta y el lugar de cultivo (composición del suelo, acidez, contaminación y disponibilidad de nutrición mineral) (Sousa *et al.* 2023).

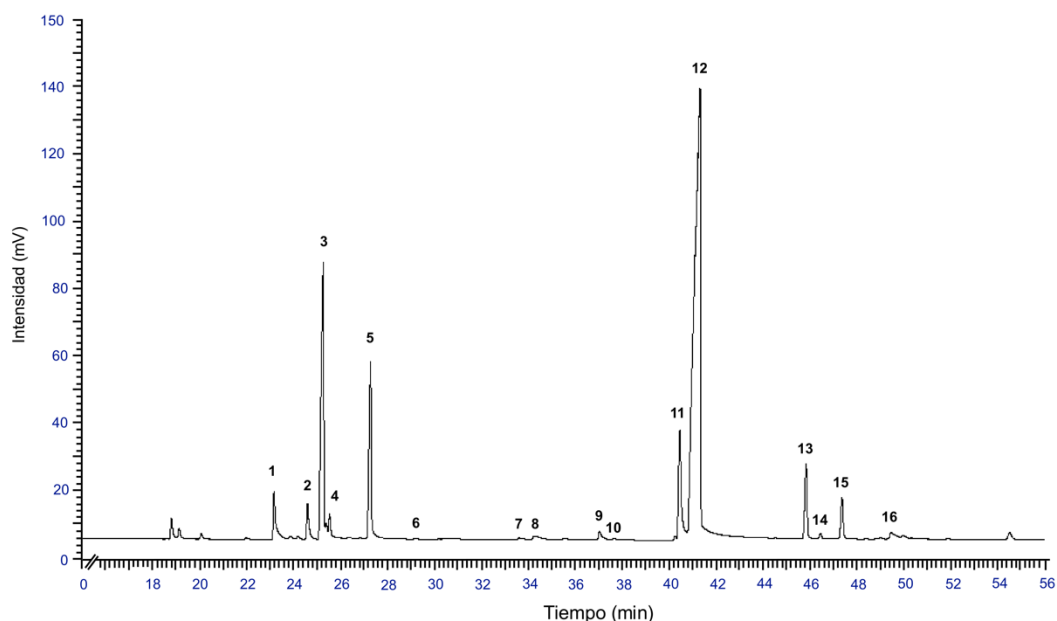


Figura 1. Cromatograma por cromatografía de gases con detector de ionización de llama del EO de *Lippia graveolens*. Los componentes son: (1) α -tujeno, (2) α -pineno, (3) mirceno, (4) α -terpineno, (5) ρ -cimeno, (6) 1,8-cineol, (7) γ -terpineno, (8) linalool, (9) terpinen-4-ol, (10) éter metílico de timol, (11) timol, (12) carvacrol, (13) z-cariofileno, (14) α -humuleno, (15) butilhidroxianisol, (16) óxido de cariofileno.

Dada la variabilidad en la composición química de los EO, es fundamental emplear técnicas para evaluar su pureza y sus propiedades características, como la densidad relativa, el índice de refracción y la rotación específica. Además, estas propiedades físicas son utilizadas como control para garantizar la autenticidad de los EO y el cumplimiento de los estándares de calidad requeridos para su uso en productos cosméticos, alimentarios y farmacéuticos (Yannick Stephane & Jean Jules, 2020). En una primera etapa, se utilizó el anetol como estándar de referencia, debido a la similitud de sus propiedades fisicoquímicas, al ser un componente presente de forma natural en algunos aceites esenciales. Además, las propiedades físicas del anetol están reportadas en la FEUM (2011). En la Tabla 1, se muestran los valores obtenidos experimentalmente del anetol estándar los cuales coinciden con los valores de la FEUM (2011), estableciendo la reproducibilidad y repetibilidad de los datos obtenidos. Por otro lado, los valores obtenidos de densidad relativa, índice de refracción y rotación específica del EOL coinciden con la caracterización física del EO de *Lippia graveolens* realizada por González-Moreno *et al.* (2024). De igual forma, la densidad relativa e índice de refracción del EOL son similares a los reportados por Da Silva *et al.* (2020) quienes evaluaron el EO de *Lippia alba* y obtuvieron valores de 0.936 g cm⁻³ y 1.492, respectivamente. En cuanto a la rotación específica Torrenegra Alarcón *et al.* (2015) reportaron un valor de -0.117 para el EO de *Lippia alba*, el cual fue similar al obtenido en este trabajo (-0.200).

Tabla 1. Caracterización física del anetol (estándar de referencia y FEUM) y del EO de *Lippia graveolens*.

Parámetro	Densidad relativa (g mL ⁻¹) ^a	Índice de refracción ^a	Rotación específica (°) ^b
Anetol	0.987 ± 0.000	1.559 ± 0.000	0.050 ± 0.000
Anetol (FEUM)	0.983 ± 0.000	1.557 ± 0.000	-0.150 ± 0.150
EO <i>Lippia graveolens</i>	0.931 ± 0.000	1.503 ± 0.000	-0.200 ± 0.000

Los valores se expresan como $\bar{x} \pm SD$, ^a(n=3); ^b(n=6).

La adecuada conservación de los EO es esencial una vez que han sido obtenidos, dado que su alta volatilidad y termolabilidad los hace susceptibles a la degradación, sus propiedades organolépticas y biológicas podrían estar comprometidas. Condiciones tales como temperatura y humedad elevadas, exposición a la luz y presencia de oxígeno pueden

acelerar su degradación (Raveau *et al.* 2020). La FT-IR permite detectar adulteraciones o cambios en la composición química a través del análisis de la intensidad y la posición de las bandas espectrales relevantes en la muestra (Agatonovic-Kustrin *et al.* 2022) además de ser una técnicas rápida, no destructiva y sencilla. En el trabajo de Puşcaş *et al.* (2020) se utilizó la FT-IR para monitorear la oxidación del aceite de semilla de calabaza durante 8 meses de almacenamiento a temperatura ambiente; los espectros mostraron cambios en la intensidad y posición de las bandas en las regiones de 1743 y 3008 cm^{-1} , indicando el inicio de procesos de oxidación después de 5 meses de almacenamiento.

La estabilidad del EOL fue monitoreada durante 30 meses de almacenamiento. En la Figura 2, se presentan los espectros del EOL obtenidos. Los espectros no mostraron variaciones en las regiones de 3369.87 y 2959.55 cm^{-1} , asociadas a los picos característicos del estiramiento O–H y C–H, respectivamente. El grupo O–H fue atribuido a la presencia del carvacrol, componente con un grupo funcional fenólico (Zinno *et al.* 2023) en su estructura y que se encuentra en una alta proporción en el EOL (63.20%). En cuanto a los grupos C–H, se encuentran en gran medida en los hidrocarburos monoterpénicos, como el β -mirceno (Bañuelos-Valenzuela *et al.* 2020), otro componente del EOL presente en alta proporción (15.63%). Cabe mencionar que todos los espectros fueron analizados con el programa Quant y se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.998, sugiriendo que no se han producido cambios en la composición química del EOL debido a factores externos. Se considera que valores superiores a 0.80 indican una alta similitud entre los espectros analizados (Lvova *et al.* 2024). De esta forma, la FT-IR se destaca como una técnica rápida y efectiva para monitorear la estabilidad del EO y que, combinada con los análisis fisicoquímicos, permite la evaluación integral de la calidad del EOL, garantizando sus propiedades biológicas y por ende su potencial aplicación tópica en el tratamiento del HSV-1.

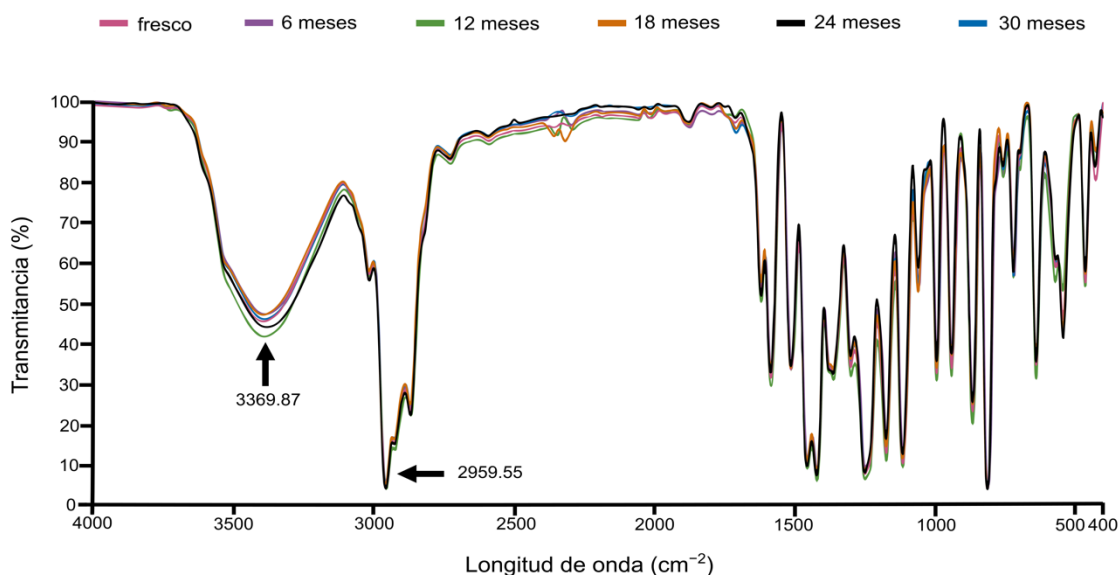


Figura 2. Espectros FT-IR sobrepuestos del EO de *Lippia graveolens* obtenidos durante 30 meses de almacenamiento.

3.3.2. Validación del método HS-SPME-GC. Diversas técnicas analíticas se han empleado para cuantificar los EO, entre ellas la HS-SPME, la cual utiliza una fibra con un recubrimiento polimérico donde los componentes del EO son adsorbidos de acuerdo con su volatilidad, polaridad y peso molecular. La HS-SPME es un método sensible, reproducible y fácil de usar que permite la concentración de los componentes de una muestra, lo que la hace especialmente adecuada para el análisis de los EO ya que estos suelen estar formados por 20 a 60 componentes distintos presentes en bajas concentraciones (Chouhan *et al.* 2017). Además, la HS-SPME ha ganado especial atención por su capacidad para extraer selectivamente el componente del EO incorporado en las NPs, lo que minimiza el efecto de la matriz polimérica, disminuye los LOD y evita procedimientos complejos y cantidades elevadas de disolventes. Por ejemplo, González-Moreno *et al.* (2025) desarrollaron un método HS-SPME-GC para cuantificar EO de *Thymus vulgaris* encapsulado en NPs, demostrando que la matriz nanoparticulada no interfería con el análisis y que el método alcanzaba LOD entre 0.42 y 1.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, adecuados para la cuantificación de componentes de EO en matrices complejas.

Un aspecto clave del proceso de SPME es la correcta selección de la fibra, ya que factores como el material de recubrimiento de la fibra, su diámetro y longitud, influyen de manera

significativa en la eficiencia de extracción y la selectividad del analito. En la Figura 3 se muestra la extracción del β -myrceno, ρ -cimeno y carvacrol, componentes principales del EOL, con las fibras CAR/PDMS y PA. En el caso de la fibra CAR/PDMS, las áreas del β -myrceno y ρ -cimeno fueron mayores que para la fibra PA, mostrando una mayor afinidad por compuestos no polares como mencionado en estudios previos (Francisco *et al.* 2019). Además, se observó una mayor desviación estándar entre las áreas obtenidas. Esta fibra, al tratarse de una fibra mixta permite la adsorción de compuestos con diferentes características fisicoquímicas lo cual podría haber afectado su selectividad hacia los compuestos de interés, y por ende la repetibilidad de las áreas obtenidas durante el análisis. Por otro lado, cuando se utilizó la fibra de PA, se observó que el área del carvacrol fue aproximadamente siete veces más grande que con la fibra CAR/PDMS. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Lugo-Estrada *et al.* (2019) con los componentes mayoritarios del EO de *Thymus vulgaris* (γ -terpineno, timol y carvacrol) evaluados con cuatro fibras. Se establecieron mayores rendimientos de extracción para timol y carvacrol con la fibra de PA, mientras que el γ -terpineno presentaba mayor afinidad por las fibras PDMS, CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS (Lugo-Estrada *et al.* 2019). La fibra de PA, al ser un material hidrofílico, presentó mayor afinidad para compuestos aromáticos polares, como el carvacrol (Xia *et al.* 2004). Por lo tanto, en el presente trabajo, se seleccionó la fibra PA para cuantificar los componentes del EO *Lippia graveolens*.

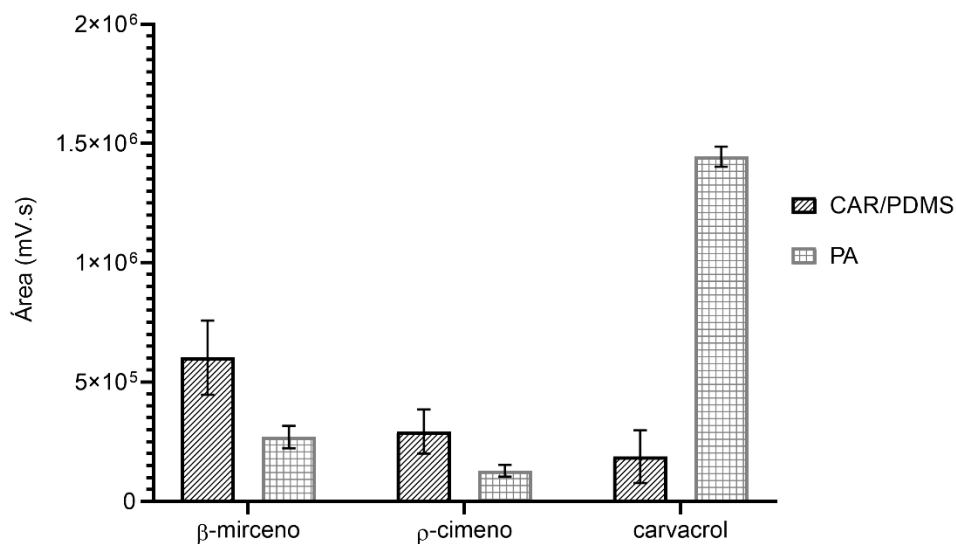


Figura 3. Comparación de las áreas de los picos de los componentes del EO de *Lippia graveolens* obtenidos con fibras SPME mediante GC-FID ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$).

La validación de un método analítico es un proceso que permite establecer que el método genera resultados confiables y reproducibles para la cuantificación del analito en una matriz determinada. El método de HS-SPME-CG fue validado en términos de linealidad, LOD, LOQ, precisión y exactitud de acuerdo con la guía ICH Q2(R1) de la ICH y los criterios CCAYAC-P-058 de la SSA, cuyos resultados se presentan en la Tabla 1 y 2.

La linealidad se evaluó mediante la construcción de una curva de calibración con estándares de β -myrcene, p -cymene y carvacrol (componentes mayoritarios del EOL) en metanol con un intervalo de concentración total entre 15–240 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los cromatogramas obtenidos de la curva de calibración se muestran en la Figura 4.

Con el análisis de regresión se obtuvieron valores de R^2 igual o superior a 0.99 para los tres estándares, cumpliendo así con el criterio de aceptación de linealidad establecido por la ICH (2022). Con estos valores se estableció el comportamiento lineal entre la concentración del β -myrcene, p -cymene y carvacrol y la respuesta del detector.

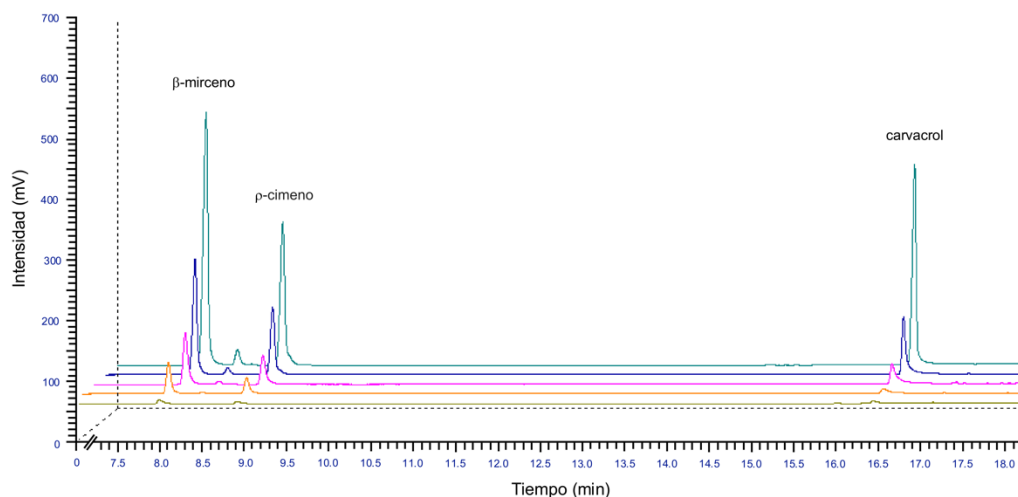


Figura 4. Cromatogramas obtenidos a partir de la curva de calibración simultánea de β -myrcene, p -cimeno y carvacrol (15–240 $\mu\text{g mL}^{-1}$) utilizando la fibra de poliacrilato mediante HS-SPME-GC.

En relación al LOD del β -myrcene, p -cymene y carvacrol, se obtuvieron valores de 0.64, 0.34 y 2.82 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. En cuanto a los LOQ del β -myrcene, p -cymene y carvacrol fueron de 1.93, 1.03 y 8.54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (Tabla 2). Tanto los valores

del LOD y del LOQ cumplen con las directrices de la SSA, al ser valores inferiores al nivel de concentración más bajo utilizado en la curva de calibración (SSA, 2011). Además, estos resultados indicarían que el método sería suficientemente sensible para detectar y cuantificar simultáneamente al β -myrcene, ρ -cymene y carvacrol (componentes principales del EOL) incorporados en las NPs.

Tabla 2. Parámetros analíticos de los principales componentes del EO de *Lippia graveolens* en soluciones estándar.

Componentes mayoritarios	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación (R^2)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
β -mirceno	$y = 9495.9x - 15583$	0.997	0.64	1.93
ρ -cimeno	$y = 12802x - 10569$	0.993	0.34	1.03
carvacrol	$y = 2059.9x - 28368$	0.990	2.82	8.54

Por otro lado, la precisión se evaluó con los %RSD de los factores de respuesta de β -myrcene, ρ -cymene y carvacrol y los valores calculados fueron de 3.50, 2.43 y 7.72%, respectivamente. Según los criterios de la ICH, se considera que los tres valores son aceptables al ser inferiores al 20% (European Commission, 2017). Finalmente, la exactitud se determinó mediante la técnica de adición estándar, obteniendo porcentajes de recuperación entre el 87.67, 96.11 y 98.06% en los cinco niveles de concentración analizados. Estos resultados se sitúan dentro del rango de aceptación entre 70–110% establecido (European Commission, 2017). Los porcentajes de recuperación obtenidos indican que la matriz polimérica no influyó en el desempeño del método permitiendo la cuantificación simultánea del β -myrcene, ρ -cymene y carvacrol incorporado en la NPs. Los datos obtenidos coinciden con lo reportado por Lugo-Estrada *et al.* 2019) quienes desarrollaron y validaron un método de HS-SPME-CG para cuantificar los componentes del EO de *Thymus vulgaris* en NPs, obteniendo porcentajes de recuperación cercanos al 100%.

Tabla 3. Parámetros analíticos de precisión y exactitud de los principales componentes del EO de *Lippia graveolens* incorporado en NPs.

Componentes mayoritarios	Precisión (% RSD \pm SD)	Exactitud (% recuperación \pm SD)
β -mirceno	3.50 \pm 0.85	87.67 \pm 13.14
ρ -cimeno	7.72 \pm 4.30	96.11 \pm 4.89
carvacrol	2.43 \pm 0.44	98.06 \pm 19.52

Existe poca información sobre la validación de métodos analíticos para cuantificar los componentes de EO incorporados en NPs. En la Tabla 4 se mencionan métodos cromatográficos de gases y de líquidos de alta resolución para cuantificar componentes de EO incorporados en matrices vegetales, nanoemulsiones y nanopartículas. Oliveira Louchard *et al.* (2017) validaron un método por HPLC-DAD para cuantificar de timol del EO de *Lippia sidoides* incorporado en NPs. Se obtuvieron LOD de 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y LOQ de 1.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ valores semejantes a los obtenidos en nuestra investigación. De igual forma, la precisión (< 2.27%) y la exactitud (recuperación de 97.2–98.2%) del método son similares a las establecidas en nuestra investigación y que permiten cuantificar el timol incorporado en las NPs de forma precisa y exacta.

Table 4. Estudios relacionados con la cuantificación de los componentes del EO en diferentes matrices.

Componente	Matrices	Método	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisión (% RSD)	Exactitud (% Recuperación)	Referencias
γ -terpineno	Nanopartículas cargadas con EO <i>Thymus vulgaris</i>	GC	0.690	2.110	7.02–10.60	99.35	(Lugo- Estrada et al. 2019)
timol			0.400	1.220	10.33–10.60	109.40	
carvacrol			0.390	1.200	8.60–10.99	98.84	
mirreno	Extracto de cannabis	GC	0.047	0.142	4.92	95.50–106.50	(Krill <i>et al.</i> 2020)
ρ -cimeno			0.021	0.065	nd	112.20–116.50	
α -pineno			0.022	0.068	7.54	97.50–108.20	
α -terpineno			0.038	0.115	13.86	78.80–81.80	
γ -terpineno			0.046	0.139	5.61	101.60–108.90	
<i>trans</i> -cariofileno			0.092	0.326	2.31	112.20–116.50	
humuleno			0.021	0.065	2.60	90.70–98.30	
β - <i>cis</i> -cariofileno			0.388	1.177	1.65	62.00–87.70	

óxido de cariofileno			0.252	0.764	3.80	69.00–84.80	
eugenol	Extracto <i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	GC	0.187	0.567	0.11–0.22	99.16–100.15	(Patindra Purba <i>et al.</i> 2021)
carvacrol	Nanopartículas cargadas con carvacrol	GC	3.472	10.521	10.69	92.83	(Espinosa-Carranza <i>et al.</i> 2021)
o-cimeno			0.420	1.280	7.30	102.32	
γ -terpineno	Nanopartículas cargadas con EO <i>Thymus vulgaris</i>	GC	0.350	1.060	3.45	101.72	(González-Moreno <i>et al.</i> 2025)
timol			1.010	3.060	2.79	105.71	
carvacrol	EO <i>Thymus vulgaris</i> L.	HPLC	0.600	1.800	1.70–2.60	96.80–98.40	(Hajimehdi poor <i>et al.</i> 2010)
timol			2.800	8.600	0.80–1.90	96.70–98.70	
carvacrol	EO <i>Origanum vulgare</i> L.	HPLC	0.970	1.950	nd	nd	(Laothawee rungsawat <i>et al.</i> 2020)
limoneno	Nanoemulsiones cargadas con EO de mandarina roja	HPLC	5.970	18.100	0.64–0.86	83.50–92.00	(Krawczak <i>et al.</i> 2022)

nd = no detectado.

3.3.3. Aplicabilidad del método de HS-SPME-GC

3.3.3.1. Componentes incorporados en NPs purificadas por dos métodos de eliminación de disolventes.

El método validado de HS-SPME-GC permitió establecer que el proceso de eliminación del disolvente (diálisis o evaporación a presión reducida) favorece la incorporación de algunos componentes del EOL en las NPs. El análisis de DLS se correlaciona con los cromatogramas presentados en la Figura 5, en el cromatograma de las NPs purificadas por evaporación a presión reducida (Figura 5B), las cuales presentan un tamaño de 145.9 ± 5.89 nm, se observan solo 6 señales atribuidas a seis de los componentes presentes en el EOL, mientras que en el cromatograma de las NPs purificadas por diálisis (Figura 5A), el tamaño de 232.1 ± 13.50 nm, se distinguen las 16 señales atribuidas a la incorporación de todos los componentes del EOL. Ephrem *et al.* (2014) evaluaron como el método de evaporación a presión reducida a 25 y 40 °C así como a presión normal afectaba la pérdida del EO de *Rosmarinus officinalis* L. en NPs. Los resultados mostraron que la eliminación de los solventes presentes en las NPs, por evaporación a presión reducida, favorece la pérdida de aproximadamente el 50% del EO incorporado en las NPs a diferencia de la evaporación a presión normal con una pérdida insignificante del EO.

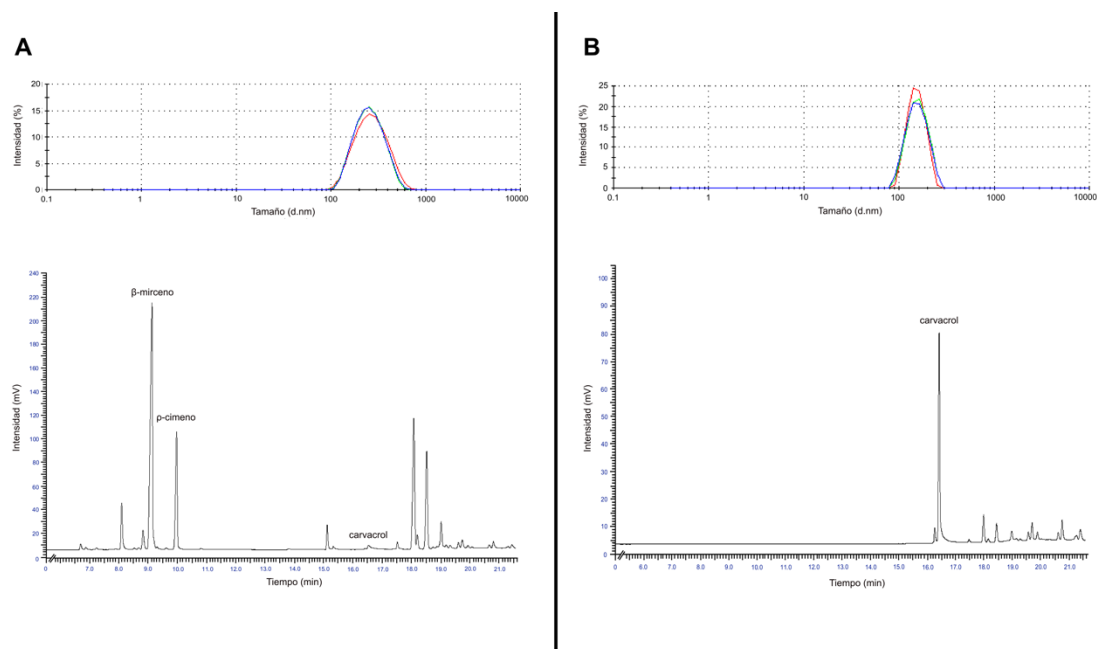


Figura 5: Distribución del tamaño por la técnica DLS y cromatograma por GC-FID de NP-EOL-D (A) y NP-EOL-R (B) ($n = 3$).

3.3.3.2. Porcentaje de encapsulación y de eficiencia de encapsulación del EOL en NPs.

Se utilizó el método validado de HS-SPME-GC para cuantificar de forma precisa y exacta los componentes mayoritarios del EOL incorporados en las NPs purificadas por diálisis y evaporación a presión reducida. La determinación de la cantidad de estos componentes en las NPs, es fundamental para asegurar su dosificación en su potencial aplicación biológica (e.g. en el tratamiento del HSV-1) (Espinosa-Carranza *et al.* 2025). En la Tabla 5 se presenta la cantidad de los tres componentes mayoritarios del EOL: β -mirceno, ρ -cimeno y carvacrol, expresada en términos del %EL y %EE. En forma general, el %EL es un parámetro que indica la proporción del EO encapsulado en relación con el polímero formador de las NPs, mientras que el %EE representa la cantidad del EO efectivamente incorporado en relación con la cantidad total de EO empleado inicialmente en la formulación. Al cuantificar el EOL incorporado en las NPs con el método de HS-SPME-GC desarrollado permitió establecer que el proceso de evaporación a presión reducida afecta la nanoencapsulación de β -mirceno y ρ -cimeno, ya que no se detecta señal cromatográfica. Esto se atribuye a que al ser ambos componentes volátiles (presión de vapor de 7.0 mm Hg para β -mirceno y 1.5 mm Hg para ρ -cimeno), las condiciones de presión reducida favorecen su evaporación a temperaturas más bajas (Sigma-Aldrich, 2017, 2024). Sin embargo, el carvacrol mostró un mayor porcentaje de encapsulación (%EL = 9.06) cuando se utilizó la evaporación a presión reducida debido a que la eliminación del solvente se llevó a cabo en un tiempo más corto, minimizando la difusión del carvacrol de la matriz polimérica hacia la fase externa acuosa.

Por otro lado, en el cromatograma de las NPs purificadas por diálisis, si se observan señales cromatográficas atribuidas al β -mirceno y ρ -cimeno las cuales permitieron calcular el %EL de 0.66 y 3.22, respectivamente. En el caso del carvacrol, se obtuvo un %EL siete veces menor que con la evaporación a presión reducida. Este comportamiento se atribuye a que durante el proceso de diálisis, el carvacrol difundió de forma gradual y prolongado de la matriz polimérica al medio de diálisis a favor de un gradiente de concentración entre el interior y el exterior de la membrana (difusión de Fickian) (Galvão *et al.* 2020).

De acuerdo con la Tabla 5, las NP-EOL-R tuvieron un %EL y un %EE total de 9.06% y 16.23%, respectivamente, valores superiores a los obtenidos para las NP-EOL-D, con %EL total de 5.2% y un %EE total de 29.61%. De este modo, el análisis cuantitativo por HS-SPME-GC permitió demostrar que se obtiene %EL mayor cuando se utiliza la evaporación a presión reducida como técnica de purificación de NPs en comparación con la purificación por diálisis; en contraste, el %EE es aproximadamente del doble cuando se utiliza la diálisis. Estos resultados coinciden con aquellos presentados por González-Moreno *et al.* (2024) con NPs de Eudragit L100-55 cargadas con el EO de *Lippia graveolens*. Es importante señalar que la encapsulación de productos naturales tan complejos como los EO representa un desafío significativo, afectado por diversos factores, como las características fisicoquímicas del activo, el pH del medio, la cantidad y naturaleza del polímero, la cantidad del activo añadido a la formulación y el tipo de surfactante empleado (Zielinska *et al.* 2020).

Tabla 5. Contenido de mirceno, ρ -cimeno y carvacrol en NPs de EO *Lippia graveolens* purificadas por evaporación a presión reducida y por diálisis.

Técnica de purificación	Componentes mayoritarios	%EL	%EE
Evaporación a presión reducida	β -mirceno	nd	nd
	ρ -cimeno	nd	nd
	carvacrol	9.06 \pm 0.79	16.23 \pm 1.42
Diálisis	β -mirceno	0.66 \pm 0.08	2.78 \pm 0.33
	ρ -cimeno	3.22 \pm 0.12	24.47 \pm 0.88
	carvacrol	1.32 \pm 0.25	2.36 \pm 0.44

nd = no detectado; Valores expresados como $\bar{x} \pm SD$, ($n = 3$).

3.3.3.3. Deposición de EOL en NPs en aplicación tópica.

Una vez cuantificados los componentes mayoritarios del EOL en las NPs, se aplicaron *ex vivo* las NP-EOL-R y NP-EOL-D en piel de cerdo durante 4, 6 y 8 h, utilizando las celdas de difusión de Franz modificadas. Posteriormente, se removieron las capas del SC mediante la técnica de *tape stripping* para evaluar la deposición del β -mirceno, ρ -cimeno

y carvacrol en el SC tras la aplicación de las NPs. Con el método validado de HS-SPME-GC se estableció la cantidad de los tres componentes mayoritarios del EOL a una profundidad acumulada del SC de $4.63 \pm 0.23 \mu\text{m}$. La Figura 6 muestra la cantidad de β -mirceno, ρ -cimeno y carvacrol depositada en el SC posterior a la aplicación *ex vivo* de la NP-EOL-D (negro) y la NP-EOL-R (gris). De este modo, en análisis cuantitativo por HS-SPME-GC permitió establecer que se depositaron $52.33 \pm 1.97 \mu\text{g}$ de β -mirceno, ρ -cimeno y carvacrol por cm^2 de piel tras la aplicación de las NP-EOL-D. En el caso de la aplicación de las NP-EOL-R sobre la piel de cerdo se observó que el carvacrol se depositó en función del tiempo de contacto de las NPs con la piel. Es decir, después de 4 h de contacto de las NP-EOL-R, se depositaron $17.08 \pm 1.39 \mu\text{g}$ de carvacrol por cm^2 de piel. Cabe mencionar que ninguno de los componentes del EOL fue detectado en el medio receptor de las celdas de Franz, lo que indica que las NPs favorecerían la deposición de algunos de los componentes de los EO en el SC (profundidad de $4.63 \pm 0.23 \mu\text{m}$) sin pasar a capas más profundas.

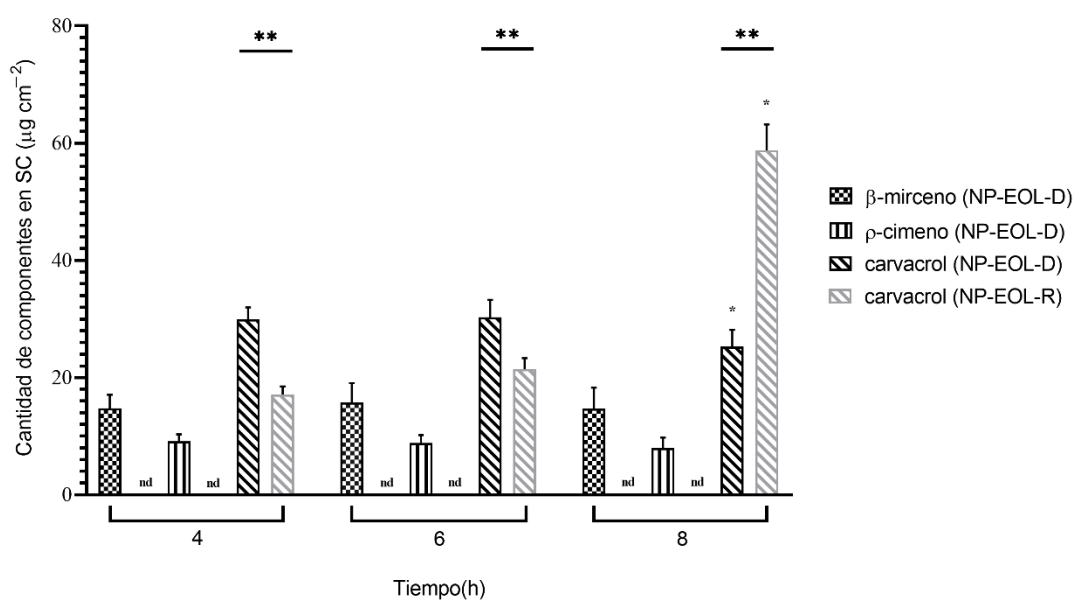


Figura 6. Cantidad de componentes en el estrato córneo para NP-EOL-D (negro) y NP-EOL-R (gris) a diferentes tiempo de contacto con la piel ($\bar{x} \pm SD$, $n=5$). Asterisco simple (*) indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tiempo de contacto para una misma formulación. Doble asterisco (**) indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre formulaciones para un mismo tiempo de contacto, nd = no detectado.

En relación a la actividad biológica del EOL, en nuestro grupo de trabajo, se determinó mediante ensayos *in vitro* en células Vero que las concentraciones de NP-EOL-R y NP-

EOL-D necesarias para reducir el número de placas virales de HSV-1 fue de 25.83 y 36.60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Espinosa-Carranza *et al.* 2025). Ahora, aunado con la cuantificación de los componentes del EOL en el SC por HS-SPME-GC, se establece que la cantidad del EOL incorporado en las NPs y depositada en la piel es más que suficiente para asegurar la inhibición de HSV-1.

Finalmente cabe destacar que con nuestro método de HS-SPME por GC validado se realizó la cuantificación simultánea de los tres componentes principales del EO de *Lippia graveolens* con pequeñas cantidades de disolventes orgánicos y sin procedimientos prolongados, lo que favorecería la implementación de un método más eficiente, seguro y sostenible.

3.4. Conclusiones

En este estudio, el método analítico de HS-SPME-GC validado que mostró ser simple, preciso y exacto para la cuantificación de los tres componentes mayoritarios del EO de *Lippia graveolens* en NPs, así como la cuantificación del componente mayoritario el carvacrol en muestras de piel porcina. Las nanopartículas obtenidas podrían tener un potencial como alternativa en el tratamiento de las infecciones de la piel.

3.5. Referencias

- Agatonovic-Kustrin S, Ristivojevic P, Gegechkori V, Litvinova TM, Morton DW. (2020). Essential oil quality and purity evaluation via FT-IR spectroscopy and pattern recognition techniques. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(20), 1–12. <https://doi.org/10.3390/app10207294>.
- Ahmad I, Fikri JAN, Arifianti AE, Abdullah S, Mun'im A. (2022). The combination of ATR-FTIR and chemometrics for rapid analysis of essential oil from Myrtaceae plants – A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(6), 030–042. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2022.120604>.
- Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. (2004). Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 99(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.06.015>.

- Badgujar Vaishnavi C, Shinde Ananya J, Nehete Jitendra Y, Bhambar Rajendra S. (2021). Strategies to Improve stability of essential oils. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 13(7), 416–425. ISSN: 0975-1459.
- 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.
- Brian SC. (2023). Chromatographic theory, Part V: Chromatographic resolution. *Cannabis Science and Technology (Web)*. Recuperado de <https://www.cannabissciencetech.com/view/chromatographic-theory-part-v-chromatographic-resolution>.
- Chouhan S, Sharma K, Guleria S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—Present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>.
- Comisión Permanente de Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2011). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 10th ed.; Secretaría de Salud: Ciudad de México, Mexico.
- Da Silva JM, Rabelo MDS, Lima SX, Rocha ALF, Da Fonseca Filho HD, De Oliveira AC, Tadei W, Chaves FCM, Bezerra JDA, Biondo MM, Campelo PH, Sanches EA. (2020). Biodegradable nanoparticles loaded with *Lippia alba* essential oil: A sustainable alternative for *Aedes aegypti* larvae control. *European Academic Research*, 7(12). Recuperado de <http://www.euacademic.org/UploadArticle/4311.pdf>.
- de Almeida P, Blanco-Pascual N, Rosolen D, Cisilotto J, Creczynski-Pasa T, Laurindo J. (2022). Antioxidant and antifungal properties of essential oils of oregano (*Origanum vulgare*) and mint (*Mentha arvensis*) against *Aspergillus flavus* and *Penicillium commune* for use in food preservation. *Food Science and Technology (Brazil)*, 42, 1–12. <https://doi.org/10.1590/fst.64921>.
- Donalisio M, Leone F, Civra A, Spagnolo R, Ozer O, Lembo D, Cavalli R. (2018). Acyclovir-loaded chitosan nanospheres from nano-emulsion templating for the topical treatment of herpesviruses infections. *Pharmaceutics*, 10(2), 46. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020046>.
- Dong P, Feleke Sahle F, Lohan SB, Saeidpour S, Albrecht S, Teutlo C, Bodmeier R, Unbehauen M, Wolff C, Haag R, Lademann J, Patzelt A, Schafer-Korting M, Meinke MC. (2019). pH-

- sensitive Eudragit® L 100 nanoparticles promote cutaneous penetration and drug release on the skin. *Journal of Controlled Release*, 295(1), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.045>.
- Ephrem E, Greige-Gerges H, Fessi H, Charcosset C. (2014). Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *Journal of Microencapsulation*, 31(8), 746–753. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.918669>.
- Espinosa-Carranza N, Álvarez-Román R, Leos-Rivas C, Zarate Kalfópulos X, Rivas-Morales C, Verde-Star MJ, Galindo-Rodríguez SA. (2021). Valoración biofísica del carvacrol nanoencapsulado para su uso como dermoprotector. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Espinosa-Carranza NN, Álvarez-Román R, Silva-Mares DA, Pérez-López LA, Leos-Rivas C, Rivas-Morales C, Báez-González JG, Galindo-Rodríguez SA. (2025). Nanoparticles loaded with *Lippia graveolens* essential oil as a topical delivery system: *In vitro* antiherpetic activity and biophysical parameters evaluation. *Pharmaceutics*, 17(10), 1286. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17101286>.
- European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety. (2017). Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed: Guidance document No. SANTE/11813/2017. Retrieved from https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11813_2017-fin.pdf.
- 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), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0).
- Francisco VC, Almeida LC, Junior SB, Neto JO, Nassu RT. (2020). Optimization of extraction conditions of volatile compounds of roasted beed by solid-phase microextraction. *Quimica Nova*, 43(4), 435–441. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170505>.
- Galvão JG, Santos RL, Silva ARST, Santos JS, Costa AMB, Chandasana H, Andrade-Neto VV, Torres-Santos EC, Lira AAM, Dolabella S, Scher R, Kima PE, Derendorf H, Nunes RS. (2020). Carvacrol loaded nanostructured lipid carriers as a promising parenteral formulation for leishmaniasis treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 150, 105335. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105335>.
- Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. (2020). Potential of nanoparticles as permeation

- enhancers and targeted delivery options for skin: Advantages and disadvantages. *Drug Design, Development and Therapy*, 14(1), 3271–3289. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S264648>.
- González-Moreno BJ, Galindo-Rodríguez SA, Pérez-López LA, Portillo-Castillo OJ, Álvarez-Román R. (2025). Simultaneous quantification of the main components of *Thymus vulgaris* essential oil in edible coating formed from nanocapsules using HS-SPME-GC-FID. *Acta Chromatographica*, 37(3), 318–325. <https://doi.org/10.1556/1326.2024.01257>.
- González-Moreno BJ, Galindo-Rodríguez SA, Rivas-Galindo VM, Pérez-López LA, Granados-Guzmán G, Álvarez-Román R. (2024). Enhancement of strawberry shelf life via a multisystem coating based on *Lippia graveolens* essential oil loaded in polymeric nanocapsules. *Polymers*, 16(3). <https://doi.org/10.3390/polym16030335>.
- Guadarrama-Acevedo MC, Mendoza-Flores RA, Del Prado-Audelo ML, Urbán-Morlán Z, Giraldo-Gomez DM, Magaña JJ, González-Torres M, Reyes-Hernández OD, Figueroa-González G, Caballero-Florán IH, Florán-Hernández CD, Florán B, Cortés H, Leyva-Gómez G. (2019). Development and evaluation of alginate membranes with curcumin-loaded nanoparticles for potential wound-healing applications. *Pharmaceutics*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080389>.
- Hajimehdipoor H, Shekarchi M, Khanavi M, Adib N, Amri M. (2010). A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy Magazine*, 6(23), 154–158. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.66927>.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Recuperado de <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2022). ICH guideline Q14: Analytical procedure development. Recuperado de https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q14_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf.
- Herrera-Rodríguez SE, López-Rivera RJ, García-Márquez E, Estarrón-Espinosa M, Espinosa-Andrews H. (2019). Mexican oregano (*Lippia graveolens*) essential oil-in-water emulsions:

- Impact of emulsifier type on the antifungal activity of *Candida albicans*. *Food Sci Biotechnol*, 28(2), 441–448. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0499-6>.
- Krawczak KW, Pereira R, Peroza LR, Ourique AF. (2022). Validation of a HPLC method for quantification of limonene in nanoemulsions containing sicilian lemon essential oil and nanoemulsions containing red red mandarin essential oil. *Disciplinarum Scientia*, 23(3), 117–127. <https://doi.org/10.37779/nt.v23i3.4416>.
- Krill C, Rochfort S, Spangenberg G. (2020). A high-throughput method for the comprehensive analysis of terpenes and terpenoids in medicinal cannabis biomass. *Metabolites*, 10(7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/metabo10070276>.
- Lancioni C, Castells C, Candal R, Tascon M. (2022). Headspace solid-phase microextraction: Fundamentals and recent advances. *Advances in Sample Preparation*, 3(July). <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100035>.
- Laothaweerungsawat N, Neimkhum W, Anuchapreeda S, Sirithunyalug J, Chaiyana W. (2020). Transdermal delivery enhancement of carvacrol from *Origanum vulgare* L. essential oil by microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 579, 119052. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119052>.
- Lim V, Mohd Narawi M, Chiu HI, Tung WH, Tan JJ, Lee CK. (2019). Selected essential oils as repellents against *Aedes Aegypti*: Validation of the bioconstituents using gas chromatography. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(4), 1058–1073. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1661796>.
- Lugo-Estrada L, Galindo-Rodriguez SA, Pérez-López LA, Waksman de Torres N, Álvarez-Román R. (2019). Headspace–solid-phase microextraction gas chromatography method to quantify *Thymus vulgaris* essential oil in polymeric nanoparticles. *Pharmacognosy Magazine*, 15(63), 473–478. https://doi.org/10.4103/pm.pm_277_18.
- Lvova K, Martínez-Arcos A, López-Prieto A, Pérez-Cid B, Vecino X, Moldes AB, Cruz JM. (2024). Correlation of Fourier transform infrared spectroscopy data for optimizing Gramicidin production in corn kernel aqueous stream. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 39, 101596. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101596>.
- Makoś P, Przyjazny A, Boczkaj G. (2019). Methods of assaying volatile oxygenated organic compounds in effluent samples by gas chromatography—A review. *Journal of Chromatography A*, 1592, 143–160. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.045>.

- Mazzarello V, Ferrari M, Decandia S, Alessandra Sotgiu, M. (2018). Sunlight and herpes Virus. In R. L. Thomasini (Ed.), *Human Herpesvirus Infection - Biological Features, Transmission, Symptoms, Diagnosis and Treatment* (pp. 1–20). <https://doi.org/10.5772/intechopen.82643>.
- Mediouni S, Jablonski JA, Tsuda S, Barsamian A, Kessing C, Richard A, Biswas A, Toledo F, Andrade VM, Even Y, Stevenson M, Tellinghuisen T, Choe H, Cameron M, Bannister TD, Valente ST. (2020). Oregano oil and its principal component, carvacrol, inhibit HIV-1 fusion into target cells. *Journal of Virology*, 94(15). <https://doi.org/10.1128/jvi.00147-20>.
- Mir M, Ahmed N, Permana AD, Rodgers AM, Donnelly RF, Rehman AU. (2019). Enhancement in site-specific delivery of carvacrol against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* induced skin infections using enzyme responsive nanoparticles: A proof of concept study. *Pharmaceutics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110606>
- Montoya Marcos O. (2020). *Principales componentes y recuperación sostenible de aceites esenciales con influencia cognitiva positiva*. Tesis de Licenciatura, Universidad de León, México.
- Mutlu-Ingok A, Catalkaya G, Capanoglu E, Karbancioglu-Guler F. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities of fennel, ginger, oregano and thyme essential oils. *Food Frontiers*, 2(4), 508–518. <https://doi.org/10.1002/fft2.77>.
- Oliveira Louchard B, Coelho Costa L, Alves e Silva AR, Moreira Leal A. (2017). Validation of A High Performance Liquid Chromatography Method to Quantify Thymol in Nanocapsules of Bioactive Essential Oil from *Lippia Sidoides*. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*, 10(2). <https://doi.org/10.15406/ijcam.2017.10.00330>
- Patindra Purba RA, Paengkoum S, Paengkoum P. (2021). Development of a simple high-performance liquid chromatography-based method to quantify synergistic compounds and their composition in dried leaf extracts of *Piper sarmentosum* Roxb. *Separations*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/separations8090152>.
- Piña-Barrera AM, Álvarez-Román R, Báez-González JG, Amaya-Guerra CA, Rivas-Morales C, Gallardo-Rivera CT, Galindo-Rodríguez SA. (2019). Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.). *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 18(4), 549–557. <https://doi.org/10.1109/tnb.2019.2941931>.
- Pinheiro GP, Galbiatti MI, Carneiro MJ, Sawaya ACHF. (2019). Comparison of four different

- solid-phase microextraction fibers for analysis of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. leaf volatiles. *Advancement in Medicinal Plant Research*, 7(2), 38–43. <https://doi.org/10.30918/ampr.72.19.020>.
- Puşcaş A, Mureşan A, Ranga F, Fetea F, Muste S, Socaciu C, Mureşan V. (2020). Phenolics dynamics and infrared fingerprints during the storage of pumpkin seed oil and thereof oleogel. *Processes*, 8(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pr8111412>.
- Rai VK, Sinha P, Yadav KS, Shukla A, Saxena A, Bawankule DU, Tandon S, Khan F, Chanotiya CS, Yadav NP. (2020). Anti-psoriatic effect of *Lavandula angustifolia* essential oil and its major components linalool and linalyl acetate. *Journal of Ethnopharmacology*, 261, 113127. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113127>.
- Rauta Ranjan P, Mohanta Kishore Y, Nayak D. (2020). *Nanotechnology in biology and medicine. Research advances and future perspectives*. CRC Press.
- Raveau R, Fontaine J, Sahraoui ALH. (2020). Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. *Foods*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/foods9030365>.
- Ribovski L, Hamelmann NM, Paulusse JMJ. (2021). Polymeric nanoparticles properties and brain delivery. *Pharmaceutics*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122045>.
- Sahle FF, Gerecke C, Kleuser B, Bodmeier R. (2017). Formulation and comparative *in vitro* evaluation of various dexamethasone-loaded pH-sensitive polymeric nanoparticles intended for dermal applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 516(1–2), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.029>.
- Secretaría de Salud (2011). *Criterios para la validación de Método Físicoquímicos de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058)*. Mexico.
- Sekkat N, Kalia Y, Guy R. (2002). Biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(11), 2376–2381. <https://doi.org/10.1002/jps.10220>.
- Sidiropoulou E, Marugán-Hernández V, Skoufos I, Giannenas I, Bonos E, Aguiar-Martins K, Lazari D, Papagrigoriou T, Fotou K, Grigoriadou K, Blake DP, Tzora A. (2022). *In vitro* antioxidant, antimicrobial, anticoccidial, and anti-inflammatory study of essential oils of oregano, thyme, and sage from Epirus, Greece. *Life*, 12(11), 1–23.

<https://doi.org/10.3390/life12111783>.

Sigma-Aldrich. (2017). *Safety Data Sheet (SDS) - Myrcene*. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/sds/sial/04600585?userType=anonymous>

Sigma-Aldrich. (2024). *Safety Data Sheet (SDS) - p-cymene*. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/sds/aldrich/c121452?userType=anonymous>

Silva-Flores PG, Galindo-Rodríguez SA, Pérez-López LA, Álvarez-Román R. (2023). Development of essential oil-loaded polymeric nanocapsules as skin delivery systems: Biophysical parameters and dermatokinetics *ex vivo* evaluation. *Molecules*, 28(20). <https://doi.org/10.3390/molecules28207142>.

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*, 2019, 2837406. <https://doi.org/10.1155/2019/2837406>.

Sousa PS, Damasceno ROS, Amorati R, Elshabrawy HA, Castro RD, Bezerra DP, Nunes VRV, Gomes RC, Lima TC. (2023). Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. *Biomolecules*, 13(7), 1–29. <https://doi.org/10.3390/biom13071144>.

Talebi Z, Kord Afshari G, Nasrollahi SA, Firooz A, Ghovvati M, Samadi A, Karimi M, Kolahdooz S, Vazirian M. (2020). Potential of *Trachyspermum ammi* (ajwain) gel for treatment of facial *Acne vulgaris*: A pilot study with skin biophysical profile assessment and red fluorescence photography. *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)*, 7(2), 61–69. <https://doi.org/10.22127/RJP.2020.104701>.

Tollbäck P, Björklund J, Östman C. (2003). Large-volume programmed-temperature vaporiser injection for fast gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Chromatography A*, 991(2), 241–253. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00174-2).

Torrenegra Alarcón ME, Matiz Melo GE, Gil González J, León Méndez G. (2015). Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(3), 512–523.

Turek C, Stintzing FC. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in*

Food Science and Food Safety, 12(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>.

- Xia XR, Baynes RE, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. (2004). Characterization of polyacrylate membrane-coated fibers used in chemical absorption studies with programmed thermal treatment and FT-IR microscopy. *Analytical Chemistry*, 76(14), 4245–4250. <https://doi.org/10.1021/ac0355146>.
- Yadav HKS, Almokdad AA, Shaluf SIM, Debe MS. (2019). Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers. In SS Mohapatra, S Ranjan, N Dasgupta, MR Kumar & S. Thomas (Eds.), *Micro and Nano Technologies, Nanocarriers for Drug Delivery* (pp. 531–556). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814033-8.00017-5>.
- Yannick Stephane FF, Jean Jules BK. (2020). Terpenoids as important bioactive constituents of essential oils. In MS de Oliveira, SG Silva & W Almeida Da Costa (Eds.), *Essential oils- Bioactive compounds, new perspectives and applications*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91426>.
- Zielinska A, Filipa C, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh ND, Durazzo A, Lucarini M, Eder P, Silva AM, Santini A, Souto EB. (2020). Polymeric nanoparticles: Production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 25(3731), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>.
- Zinno P, Guantario B, Lombardi G, Ranaldi G, Finamore A, Allegra S, Mammano MM, Fascella G, Raffo A, Roselli M. (2023). Chemical composition and biological activities of essential oils from *Origanum vulgare* genotypes belonging to the carvacrol and thymol chemotypes. *Plants*, 12(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/plants12061344>.
- Zoabi A, Touitou E, Margulis K. (2021). Recent advances in nanomaterials for dermal and transdermal applications. *Colloids and Interfaces*, 5(1), 18. <https://doi.org/10.3390/colloids5010018>.

CAPÍTULO IV

Perfil de liberación *in vitro* de nanopartículas poliméricas con aceite esencial de *Lippia graveolens* y su incorporación en gel tópico

4.1. Introducción

Las nanopartículas poliméricas (NP) han demostrado ser efectivas para la aplicación tópica de aceites esenciales (EO), ya que, favorecen su disponibilidad cutánea, los protegen de la degradación ocasionada por factores ambientales, disminuyen su toxicidad y permiten una liberación controlada y sostenida (Albuquerque *et al.*, 2022). Para lograr el efecto biológico deseado, es fundamental que el EO alcance concentraciones adecuadas sobre la piel. Por ello, resulta esencial analizar el perfil de liberación del principio activo desde el sistema terapéutico, ya que, permite determinar la velocidad y el mecanismo mediante los cuales los activos son liberados, garantizando así niveles seguros y terapéuticamente efectivos (Eltaib, 2025).

Una vez caracterizado el comportamiento de liberación del EO, las NP deben incorporarse en una forma farmacéutica adecuada, ya que, su aplicación directa no garantiza su retención suficiente sobre la piel. En este sentido, los geles representan una opción idónea, pues son preparaciones semisólidas que destacan por su rápida absorción, textura no grasa, buena capacidad de extensión y un efecto refrescante (Strazzabosco *et al.*, 2025). Basándose en estas características, los geles pueden ser considerados vehículos adecuados para favorecer la aplicación de NP en la piel con el fin de mejorar el efecto del principio activo encapsulado. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2016) desarrollaron un gel con NP cargadas con ciprofloxacino. Dicho sistema mostró una mayor retención y adhesión del antibiótico en la piel de ratones, sin causar reacciones cutáneas, ni toxicidad, lo que respalda el potencial de las NP en gel para el tratamiento de infecciones microbianas.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el perfil de liberación *in vitro* de una formulación de NP cargadas con EO de *Lippia graveolens* (EOL). Posteriormente, las NP se incorporaron en un gel diseñado como forma farmacéutica final y se caracterizó en función de sus propiedades fisicoquímicas y reológicas. Además, se llevó a cabo un ensayo sensorial para determinar su aceptabilidad y potencial de aplicación cutánea.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Materiales

El polímero formador de nanopartículas, Eudragit® L100 (copolímero de ácido metacrílico-metacrilato de metilo, 1:1), fue donado amablemente por Helm (Naucalpan, Estado de México, México). El ácido poliacrílico (PM ~3,000,000), la goma xantana y el monooleato de sorbitán polioxietilenado (Tween® 80) se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.2.2. Estudio *in vitro* de liberación de EOL a partir de NP-EOL-R

En este trabajo se empleó una formulación de NP cargadas con EO de *Lippia graveolens* preparada por la técnica de nanoprecipitación y purificada por evaporación a presión reducida (NP-EOL-R). La preparación y caracterización de la formulación se describen en el Capítulo 2.

El perfil de liberación del EOL se evaluó adicionando 0.95 mL de la suspensión de NP-EOL-R a 0.95 mL de tampón fosfato salino (PBS) (20 mM, pH 6) que contenía Tween 80 al 0.01% (p/v). El sistema se mantuvo en agitación constante a 300 rpm a 37 °C. En los intervalos de tiempos preestablecidos (1, 4, 6, 24, 48, 60 y 72 h), las muestras fueron centrifugadas (Allegra™ 64R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) a 25,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante recuperado se analizó mediante el método de microextracción en fase sólida en modalidad *headspace* acoplado a cromatografía de gases (HS-SPME-GC), previamente validado y descrito en el Capítulo 3, con el fin de cuantificar los tres componentes de seguimiento del EOL (*i.e.* β-mirceno, ρ-cimeno y carvacrol). Cada ensayo se realizó por triplicado.

4.2.3. Cinética de hinchamiento, erosión y disolución de las nanopartículas

La cinética de hinchamiento, erosión y disolución de las NP se realizó según lo descrito por Sahle *et al.* (2017) empleando NP de Eudragit® L100 blanco, es decir, sin EO (NP-BCO). Se mezcló 1 mL de la suspensión de NP-BCO con 1 mL de amortiguador de fosfatos (20 mM) ajustado a pH de 4.5, 6.0 y 7.5. Las muestras se mantuvieron a 25 °C y se registraron los cambios en el tamaño de partícula mediante dispersión dinámica de la

luz (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Las mediciones se realizaron cada 10 min durante 50 min y por triplicado.

4.2.4. *Formulación de un gel con NP-EOL-R*

En primer lugar, se preparó un gel con ácido poliacrílico al 1% (p/v), al que se le adicionó 5 mL de la suspensión de NP. Por otra parte, se preparó un gel de goma xantana al 2% (p/v), al que se le adicionó 5 mL de la suspensión de NP. Los geles con NP se denominaron A-NP (ácido poliacrílico con NP-EOL-R) y X-NP (goma xantana con NP-EOL-R).

Asimismo, se elaboraron geles control de cada polímero, preparados de la misma manera que los anteriores, pero sin añadir la suspensión de NP-EOL-R. Dichos geles se denominaron A-BCO (ácido poliacrílico) y X-BCO (goma xantana).

4.2.5. *Caracterización de las formulaciones de gel*

- *pH*

El pH se determinó con un pHmetro (Conductronic.mod. pH120, Puebla, Puebla, México) previamente calibrado con soluciones amortiguadoras a pH 4 y 7. Todas las mediciones se realizaron por sextuplicado.

- *Gravedad específica*

La densidad de cada formulación se determinó empleando un matraz aforado de 5 mL. Cada muestra de gel se introdujo cuidadosamente en el matraz, evitando la formación de burbujas, y se pesó en una balanza analítica (Scientech, Boulder, CO, USA) a 25 °C. La densidad se calculó como la relación entre la masa de gel (g) y el volumen del matraz (mL). Todas las mediciones se realizaron por sextuplicado.

- *Adhesividad*

Las propiedades adhesivas de los geles se evaluaron mediante un análisis de perfil de textura (APT), utilizando un texturómetro CT3 Texture Analyzer (Brookfield-Ametek, Middleborough, MA, USA). Para cada formulación, se colocaron 16 g de gel de cada formulación en frascos de vidrio (25 mm de diámetro x 40 mm de altura). Las muestras

se cubrieron con Parafilm, se sonicaron durante 5 minutos para eliminar burbujas y se almacenaron a 25 ± 2 °C por 24 h antes del análisis.

El ensayo se realizó a 25 °C con una sonda cilíndrica de 12.7 mm de diámetro, la cual descendió a una velocidad de 1 mm/s hasta contactar la superficie del gel. Posteriormente, se aplicó una fuerza de compresión de 0.05 N, deformando la muestra hasta un 40% y la sonda fue retirada a la misma velocidad (1 mm/s). Cada formulación se evaluó por sextuplicado. A partir de los datos obtenidos, se calculó la adhesividad como el área negativa bajo la curva fuerza-distancia, correspondiente al trabajo requerido para vencer las fuerzas de atracción entre la sonda y la superficie del gel.

- *Viscosidad*

La viscosidad de los geles se evaluó en un reómetro Rheolab QC (Anton Paar, Graz, Estiria, Austria) equipado con un sistema de cilindros coaxiales CC27. Se colocaron aproximadamente 35 g de cada formulación y se sometieron a un barrido de velocidad de corte en el rango de 0.1 a 350 s⁻¹ a una temperatura de 25 ± 2 °C. Todas las determinaciones se realizaron por sextuplicado.

4.2.6. *Evaluación sensorial de geles con NP-EOL*

La aceptación sensorial de los geles con NP se evaluó mediante un panel de 70 voluntarios no entrenados, cuyas edades oscilaron entre los 20 y 55 años. Las formulaciones A-NP y X-NP se presentaron en volúmenes iguales dentro de recipientes individuales adecuados, con el fin de asegurar la uniformidad en la presentación. Las muestras fueron correctamente etiquetadas como gel A (A-NP) y gel B (X-NP).

Durante la prueba, los participantes aplicaron una porción de cada gel sobre la piel del dorso de las manos y evaluaron los atributos sensoriales previamente definidos: textura, absorción, olor y sensación residual en la piel. La percepción se registró empleando una escala de 5 puntos, donde 1 correspondió a la menor apreciación y 5 a la mayor.

No. de juez: _____
 Nombre: _____ Fecha: _____
 Para cada gel, evalúe los siguientes aspectos (use una escala del 1 al 5, donde 1 es *muy bajo/desagradable* y 5 es *muy alto/muy agradable*). Agregue comentarios si lo cree necesario.

Gel A: (Ácido poliacrílico)					Gel B: (Goma xantana)				
1. Textura al tacto					1. Textura al tacto				
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
2. Olor					2. Olor				
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
3. Grado de absorción					3. Grado de absorción				
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
4. Sensación en la piel después de su aplicación					4. Sensación en la piel después de su aplicación				
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

¿Cuál gel le pareció más agradable en general?
 Gel A Gel B Ninguno

¿Qué características influyeron más en su decisión? (puede elegir más de una)
 Textura Olor
 Sensación post-aplicación Absorción

Comentarios adicionales

Figura 1. Hoja de respuesta para prueba sensorial.

4.3. Resultados

En el presente estudio se evaluó el perfil de liberación *in vitro* del EOL a partir de las NP-EOL-R en función del tiempo (Figura 2). La NP-EOL-R presentó un comportamiento bifásico, con una liberación inicial rápida (~37% en la primera hora), seguido de una liberación sostenida que alcanzó hasta el 74% después de 72 h.

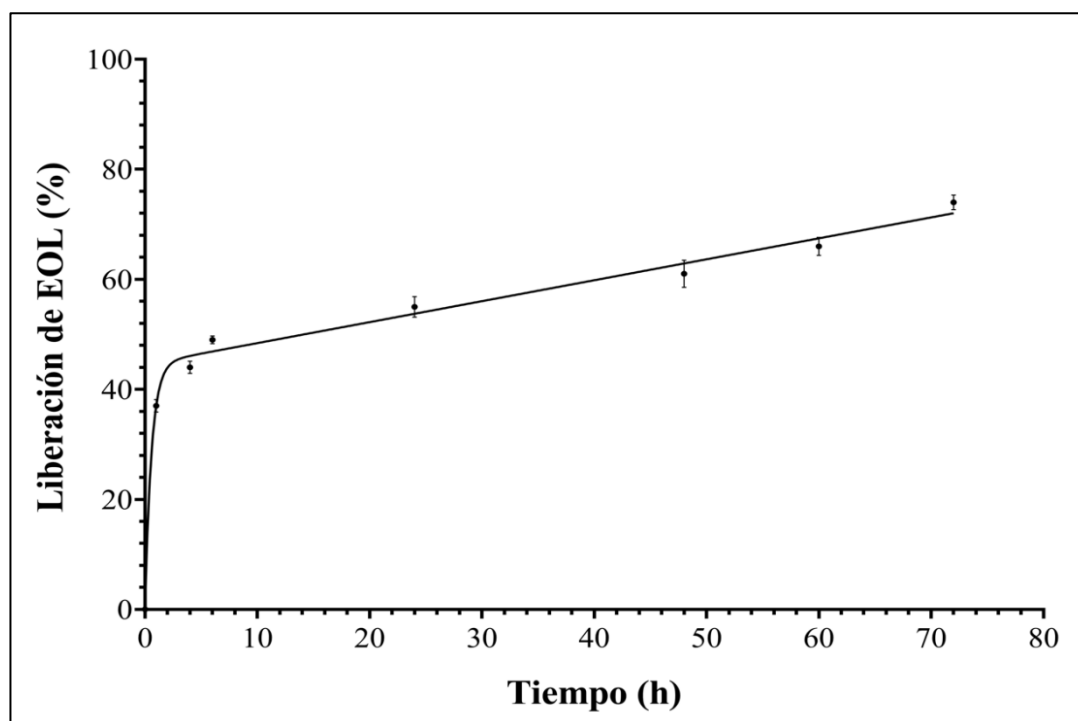


Figura 2. Perfil de liberación de EOL *in vitro* a pH de 6 a partir de NP-EOL-R en función del tiempo ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$).

Con el fin de comprender el papel de la matriz polimérica en la liberación del EOL, se evaluó la cinética de hinchamiento, erosión y disolución a través de cambios en el tamaño hidrodinámico de las NP de Eudragit® L100 en amortiguadores de fosfatos a pH 4.5, 6.0 y 7.5 (Figura 3). En condiciones de pH 6, el tamaño promedio aumentó de 114.10 ± 0.15 nm a 164.76 ± 1.22 nm, lo que representa un incremento absoluto de ~ 50 nm, mientras que a pH 7.5 se observó una disminución de 50 nm, de 113.59 ± 0.10 nm a 63.64 ± 1.66 nm. En contraste, a pH 4.5 el tamaño de la NP permaneció constante durante el periodo de estudio.

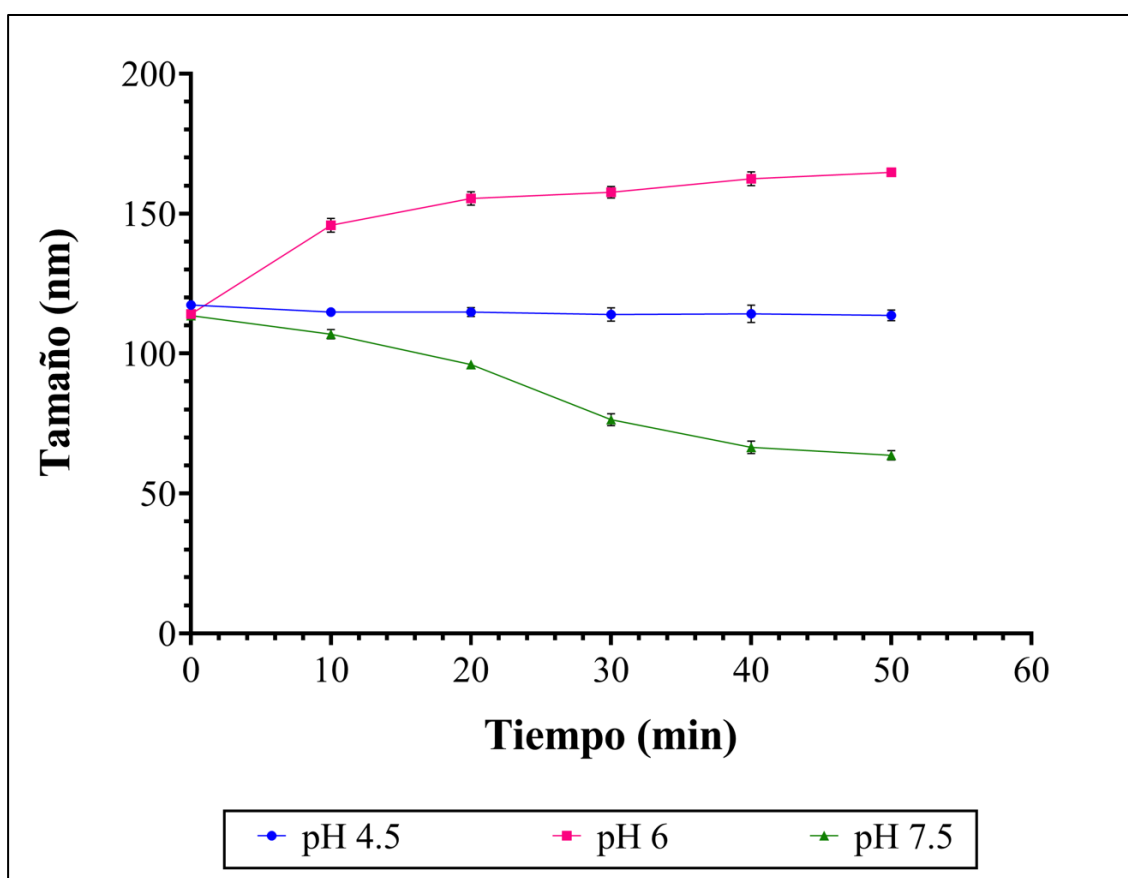


Figura 3. Cinética de hinchamiento, erosión y disolución de NP de Eudragit® L100 en amortiguadores de fosfatos a diferentes valores de pH expresada por cambios en el tamaño de partícula ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$).

Con el objetivo de evaluar la idoneidad de las formulaciones en gel para su aplicación tópica, se determinaron parámetros fisicoquímicos clave, incluyendo el pH, densidad y trabajo de adhesión (Tabla 1). Los geles presentaron un pH promedio de 4.5, una densidad

cercana a 1 g/mL y un trabajo de adhesión aproximado de 0.7 mJ, sin diferencias significativas entre las formulaciones de los cuatro geles.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de las formulaciones en gel ($\bar{x} \pm SD$, $n=6$).

Formulación	pH	Densidad (g/mL)	Trabajo de adhesión (mJ)
A-BCO ¹	4.48 ± 0.21	1.0034 ± 0.0259	0.84 ± 0.04
A-NP ²	4.56 ± 0.14	1.0342 ± 0.0148	0.82 ± 0.07
X-BCO ³	4.46 ± 0.20	1.0315 ± 0.0141	0.76 ± 0.08
X-NP ⁴	4.62 ± 0.17	1.0061 ± 0.0645	0.68 ± 0.06

¹A-BCO: gel blanco de ácido poliacrílico al 1%; ²A-NP: gel de ácido poliacrílico al 1% con NP-EOL-R; ³X-BCO: gel blanco de goma xantana al 2%; ⁴X-NP: gel de goma xantana al 2% con NP-EOL-R.

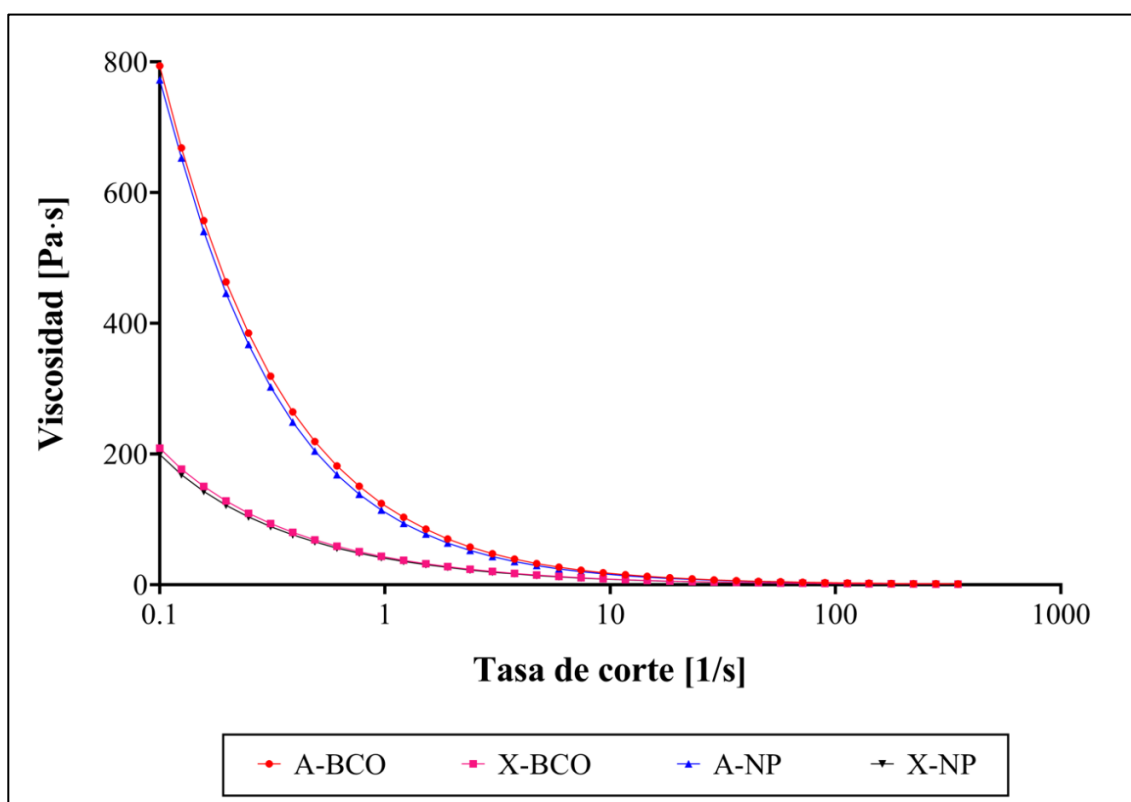


Figura 4. Viscosidad de las diferentes formulaciones: A-BCO (gel blanco de ácido poliacrílico al 1%), X-BCO (gel blanco de goma xantana al 2%), A-NP (gel de ácido poliacrílico al 1% con NP-EOL-R), X-NP (gel de goma xantana al 2% con NP-EOL-R) a diferentes velocidades de cizallamiento a 25 °C ($\bar{x} \pm SD$, $n=6$).

En relación con las propiedades reológicas se evaluó la viscosidad de las formulaciones en gel. En la Figura 4 se observa que todas las formulaciones mostraron una reducción de la viscosidad al aumentar la velocidad de cizallamiento, lo que indica un comportamiento pseudoplástico (no newtoniano). Entre las formulaciones A-NP y X-NP se observaron diferencias en la viscosidad inicial, siendo el gel elaborado con ácido poliacrílico el que presentó los valores más altos.

El aspecto macroscópico de las formulaciones en gel se presenta en la Figura 5. Los cuatro geles mostraron apariencia homogénea. No se observó separación de fases ni precipitación visible. Además, la adición de las NP-EOL-R no modificó de manera significativa el color ni la textura de los geles en comparación con los geles sin NP.

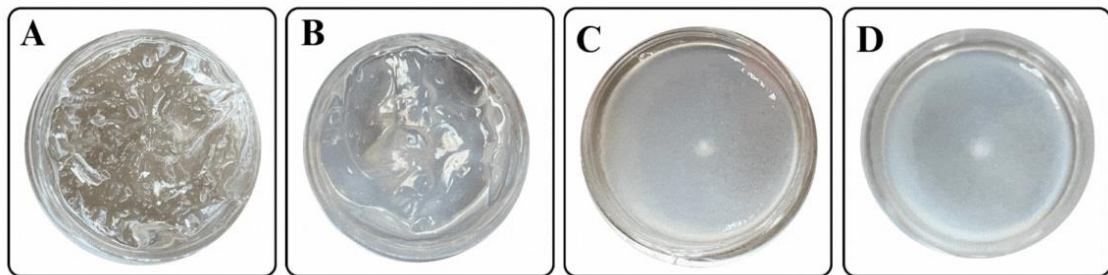


Figura 5. Aspecto macroscópico de las formulaciones de gel: (A) gel blanco de ácido poliacrílico (A-BCO); (B) gel de ácido poliacrílico con NP-EOL-R (A-NP); (C) gel blanco de goma xantana (X-BCO); (D) gel de goma xantana con NP-EOL-R (X-NP).

Con relación a la evaluación sensorial realizada a 70 voluntarios no entrenados de diferentes edades, los resultados se presentan en la Figura 6. La formulación A-NP obtuvo las puntuaciones más altas en tres de los cuatro atributos evaluados (*i.e.* olor, absorción y sensación en la piel), mientras que, la textura mostró niveles de aceptación similares entre ambas formulaciones.

En cuanto a la preferencia global por producto, se observó una marcada inclinación hacia el gel A-NP, con un 83% de aceptación en comparación con el 17% registrado para el gel X-NP (Figura 7).

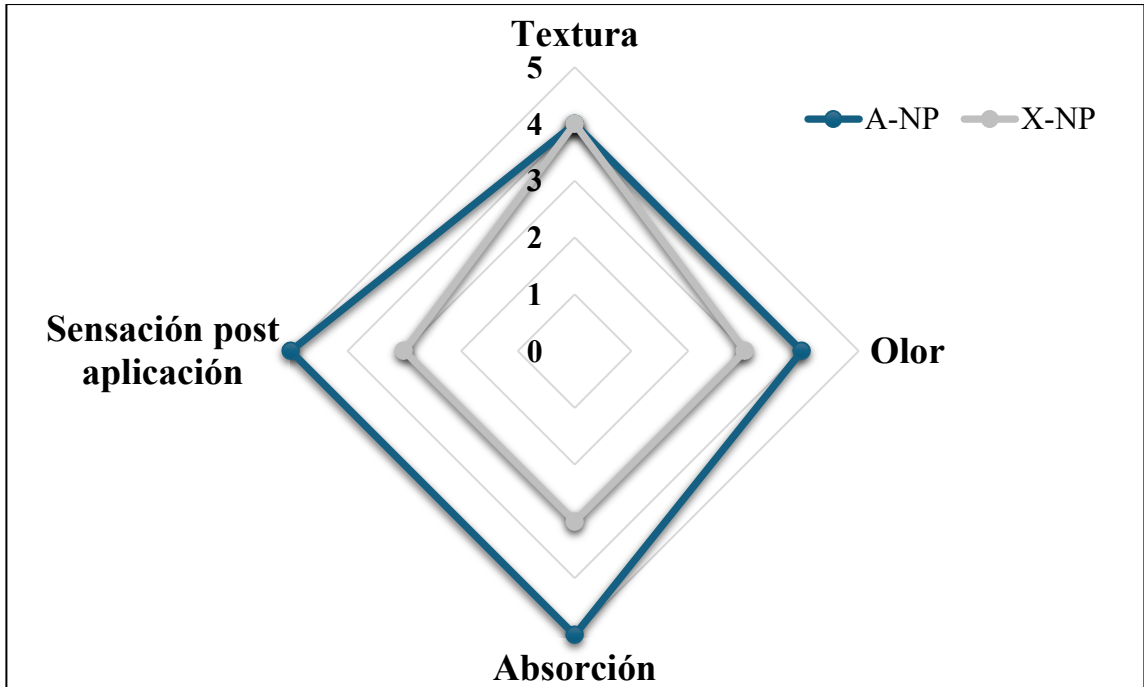


Figura 6. Efectos de las evaluaciones sensoriales de las formulaciones de geles de ácido poliacrílico y goma xantana con NP-EOL-R ($n=70$).

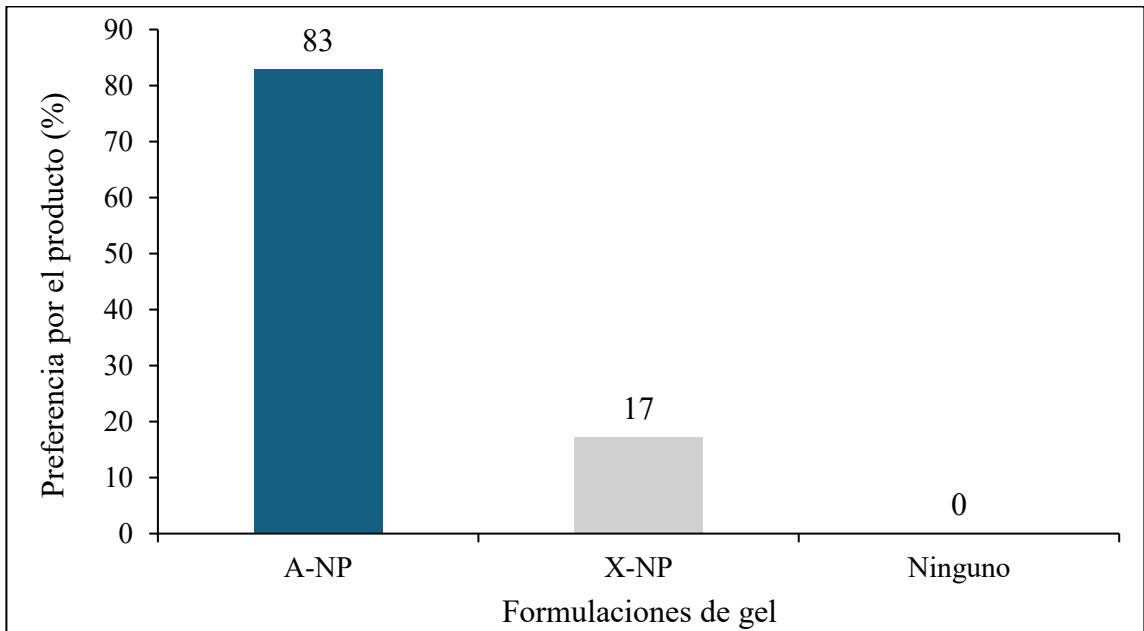


Figura 7. Preferencia sensorial de los evaluadores hacia las formulaciones de geles de ácido poliacrílico al 1% con NP-EOL-R (A-NP) y geles de goma xantana al 2% con NP-EOL-R (X-NP) ($n=70$).

4.4. Discusión

La seguridad y eficacia de las nuevas formas de dosificación a escala nanométrica dependen en gran medida de sus propiedades intrínsecas, entre ellas el tamaño de partícula, la carga superficial, la morfología, la hidrofiliidad y, de manera destacada, el perfil de liberación del compuesto activo (Sethi *et al.*, 2014). Esta última hace referencia a la velocidad y al mecanismo mediante los que el compuesto se libera desde su forma de dosificación y se encuentra disponible en el sitio de acción (Jasak, 2024).

La importancia de llevar a cabo un perfil de liberación se centra en mantener la concentración del compuesto activo dentro de la llamada ventana terapéutica, es decir, por encima de la concentración mínima efectiva y por debajo de la concentración mínima tóxica. Alcanzar este objetivo es un requisito indispensable para asegurar la eficacia terapéutica y minimizar riesgos de toxicidad (Adepu & Ramakrishna, 2021).

El proceso de liberación depende de diversos factores que incluyen las propiedades fisicoquímicas del compuesto, las características de la matriz que lo encapsula, así como, las condiciones del medio en el que se encuentre (*e.g.* pH, temperatura, fuerza iónica y presencia de enzimas) (Abbasnezhad *et al.*, 2021). De ahí la relevancia de realizar ensayos que permitan establecer los mecanismos que rigen la liberación del activo y predecir el desempeño de las formulaciones.

El perfil de liberación puede evaluarse mediante ensayos *in vivo* o *in vitro*. Sin embargo, las limitaciones éticas de los estudios *in vivo* han favorecido el uso de métodos *in vitro* como herramientas de referencia (D'Souza, 2014). Entre los métodos más empleados destacan la técnica de membrana de diálisis y el método de muestro y separación. El primero utiliza una membrana semipermeable que separa las nanopartículas del compuesto liberado (Van Gheluwe *et al.*, 2021). Su limitación principal es que solo cuantifica el compuesto liberado al medio externo, lo que puede subestimar la liberación real desde las nanopartículas (Weng *et al.*, 2020). Por otro lado, el método de muestreo y separación consiste en la toma de muestra a intervalos definidos, seguida de la separación del compuesto libre por filtración o ultracentrifugación y su cuantificación mediante espectrofotometría UV-Vis o cromatografía. El método de muestreo y separación destaca por su simplicidad y por proporcionar información directa sobre la fracción liberada del compuesto desde las NP (Zhou *et al.*, 2016).

En el presente trabajo se empleó el método de muestreo y separación para evaluar el perfil de liberación *in vitro* del EOL encapsulado en la formulación NP-EOL-R, con el objetivo de determinar su comportamiento como sistema de liberación controlada para aplicación cutánea. Para ello, las NP se incubaron en un sistema con condiciones que simularan el ambiente de la piel (pH 6 y 37 °C), y la concentración del activo liberado en cada sistema se determinó mediante cromatografía de gases. El perfil de liberación obtenido se presenta en la Figura 2. La formulación exhibió un comportamiento bifásico a lo largo del estudio de liberación de 72 h. En la primera fase, correspondiente a la primera hora, se observó una liberación en rápida (efecto *burst*) de aproximadamente 37%, atribuible a la difusión inmediata de las moléculas de EOL localizadas en la superficie o en regiones cercanas a la superficie de las NP. Posteriormente, se registró una segunda fase más lenta y sostenida, que se mantuvo estable hasta el final del ensayo (72 h). Este comportamiento coincide con lo descrito por Saadallah y col. (2022) quienes reportaron un perfil bifásico para nanopartículas de Eudragit® L100 cargadas con rosuvastatina cálcica, observando un 20-31% de liberación inicial en los primeros 30 minutos (dependiendo del pH), seguido de una fase de liberación sostenida que alcanzó hasta 67% tras 5 h de ensayo.

En relación con la segunda fase del perfil de liberación, esta se aproxima a un modelo de orden cero, en el cual la velocidad de liberación es independiente de la concentración del compuesto en el sistema. Este tipo de comportamiento es altamente deseable en sistemas de liberación controlada, pues garantiza un aporte constante del activo y puede contribuir a mantenerlo dentro de la ventana terapéutica por periodos prolongados (Heredia *et al.*, 2022). No obstante, es importante mencionar que esta interpretación aplica principalmente a la fase sostenida y que futuros estudios deberán incluir comparaciones con otros modelos cinéticos (*e.g.* Higuchi, Korsmeter-Peppas, entre otros) para confirmar el mecanismo predominante (Adepu & Ramakrishna, 2021; Lee & Yeo, 2016).

Con el fin de comprender el papel de la matriz polimérica en la liberación del EOL, se evaluó la cinética de hinchamiento, erosión y disolución de las NP de Eudragit® L100 a diferentes valores de pH (Figura 3). A pH 6 se observó un aumento en el tamaño hidrodinámico de 114.10 ± 0.15 nm a 164.76 ± 1.22 nm. Este resultado se explica porque los polímeros aniónicos como el Eudragit® L100 contiene grupos carboxílicos ($pK_a \approx$

6.45) que, al ionizarse parcialmente cerca de su pKa, generan repulsión electrostática entre las cadenas del polímero, favoreciendo la entrada de agua y el hinchamiento de la red, observando un incremento del tamaño de partícula (Rizi *et al.*, 2011; Van Gheluwe *et al.*, 2021). En contraste, a pH 4.5 no se observaron cambios significativos en el tamaño, lo cual se atribuye al estado predominantemente protonado de los grupos carboxilo (-COOH) que minimiza la repulsión entre cadenas y favorece que se mantenga la estructura de la NP. Finalmente, a pH 7.5 se observó una disminución del tamaño hidrodinámico de 113.59 ± 0.10 nm a 63.64 ± 1.66 nm, lo que se asocia a la completa ionización de los grupos carboxilo y al inicio de procesos de erosión/disolución progresiva de la matriz polimérica (Cetin *et al.*, 2010).

La combinación de estos resultados con el ensayo de liberación sugiere que, bajo condiciones fisiológicas (pH 6, 37 °C), la liberación de los componentes del EO se deben al hinchamiento parcial de la matriz polimérica, que permite la liberación sostenida del EOL durante 72 h, tiempo que coincidió con la duración de los ensayos *in vitro* de actividad antiviral reportados en el Capítulo 2. Estos resultados sugieren que sería posible reducir la frecuencia de aplicación del tratamiento en comparación con productos comerciales, sin comprometer la eficacia antiviral.

Si bien las NP-EOL-R mostraron una liberación controlada, y una potencial actividad antiviral frente al HSV-1, su aplicación directa sobre la piel presenta limitaciones prácticas. Lo anterior refuerza la importancia de avanzar hacia su incorporación en una forma farmacéutica que, además de conservar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, ofrezca características tecnológicas que faciliten su aplicación y favorezcan la aceptación por parte del usuario. En este contexto, los geles constituyen una alternativa idónea, ya que su naturaleza semisólida permite una fácil aplicación en diversas regiones corporales, entre ellas la región orofacial (Wang *et al.*, 2025). En este estudio se seleccionaron dos polímeros ampliamente empleados en la formulación de geles: goma xantana y ácido poliacrílico. La goma xantana es un polisacárido natural aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para su uso en formulaciones farmacéuticas orales y tópicas debido a su elevada viscosidad a bajas concentraciones, su resistencia a la degradación y su sencillo procesamiento (Fantatto *et al.*, 2024). Por su parte, el ácido poliacrílico es un polímero sintético ampliamente empleado en la industria

farmacéutica y cosmética por su capacidad espesante, estabilidad y facilidad de ajuste reológico (Dejeu *et al.*, 2022). Estas propiedades hacen que ambos polímeros sean candidatos ideales para generar una matriz de gel capaz de mejorar la aplicación de las NP. En el presente trabajo, los geles A-NP, A-BCO, X-NP y X-BCO se caracterizaron según sus propiedades fisicoquímicas (*i.e.* pH, densidad y adhesividad) y reológicas, evaluando su potencial para aplicación cutánea en un tratamiento contra el HSV-1.

En relación con el pH, los valores obtenidos oscilaron entre 4.46 y 4.62 (Tabla 1). Estos resultados se consideraron adecuados por encontrarse cercanos al pH fisiológico de la piel, que es ligeramente ácido, entre 4.1 y 5.8 (Proks *et al.*, 2018). Mantener un pH en este intervalo resulta esencial, ya que, valores demasiado bajos pueden disminuir la permeación del compuesto activo, mientras que, valores elevados, particularmente superiores a 7, pueden inducir irritación o eritema cutáneo (Wang *et al.*, 2025). Además, el pH constituye un parámetro crítico en la evaluación de la calidad de los geles, pues influye directamente en la estabilidad y la liberación de los compuestos encapsulados. En este sentido, los valores obtenidos sugieren que los geles son seguros para la aplicación cutánea y que los componentes del EO permanecen retenidos durante el almacenamiento. Cabe destacar que la incorporación de las NP-EOL-R no provocó variaciones significativas en el pH, lo que evidencia la compatibilidad de la nanoformulación con la matriz de gel.

Por otro lado, la determinación de la densidad en formulaciones en gel constituye un parámetro relevante, ya que, permite evaluar la uniformidad estructural y la reproducibilidad entre lotes, aspectos críticos en el control de calidad. Variaciones significativas en este parámetro pueden evidenciar inconsistencias durante el proceso de preparación, como atrapamiento de aire o dispersión incompleta de los polímeros y excipientes (Farmacopea, 2010). En la Tabla 1 se muestran las densidades de las formulaciones en gel. Los valores de densidad de las formulaciones A-NP y A-BCO fueron de 1.0342 ± 0.0148 y 1.0034 ± 0.0259 g/mL, respectivamente, consistentes con los reportados por Tocai *et al.*, (2024), quienes señalaron densidades de 1.003 g/mL para geles a base de ácido poliacrílico al 1%. En el caso de las formulaciones X-NP y X-BCO, se obtuvieron valores de densidad de 1.0061 ± 0.0645 y 1.0315 ± 0.0141 g/mL, respectivamente. Hasta donde alcanza la revisión realizada, no se encontraron reportes

previos sobre la densidad de geles elaborados con goma xantana. Cabe destacar que las densidades determinadas se aproximan al valor del agua (1 g/mL), lo cual resulta coherente considerando que el gel corresponde a un sistema acuoso en el que la goma xantana actúa principalmente como agente estructurante y se encuentra en baja proporción.

Otro parámetro evaluado en las formulaciones de gel fue la adhesividad, definida como la fuerza necesaria para superar la unión entre el gel y la superficie de aplicación, como la piel o la mucosa labial. Esta propiedad es clave en formulaciones tópicas, ya que contribuye a evitar la rápida eliminación del producto y a prologar el tiempo de residencia del compuesto activo en el sitio de aplicación, favoreciendo así su eficacia terapéutica (AL-Smadi *et al.*, 2025). En la Tabla 1 se muestran los valores de trabajo de adhesión obtenidos para los geles obtenidos. La formulación X-NP presentó un valor de 0.68 ± 0.06 mJ, mientras que, el gel A-NP mostró un valor de 0.82 ± 0.07 mJ. Aunque el valor del gel a base de ácido poliacrílico fue ligeramente mayor, la diferencia entre ambas formulaciones no resultó estadísticamente significativa. Esto sugiere que, a pesar de las diferencias estructurales entre los polímeros ambos confirieron un comportamiento adhesivo comparable. Cabe señalar que, si bien no existe un valor estandarizado de adhesión, se ha reportado que valores entre 0.020 y 2.5 mJ son adecuados para asegurar la permanencia de formulaciones tópicas en la superficie de aplicación (Wang *et al.*, 2025). En este sentido, tanto la goma xantana como el ácido poliacrílico demostraron conferir una adhesión suficiente para mantener el gel en contacto con la piel durante el tiempo necesario para favorecer la liberación del EO desde las NP, sin alcanzar niveles excesivos que pudieran resultar incómodos para los usuarios.

Los parámetros reológicos son atributos de calidad críticos de los geles, ya que, influyen en su proceso de fabricación, apariencia, estabilidad, rendimiento y propiedades sensoriales. Dentro de las pruebas reológicas se suele evaluar la viscosidad, la cual se define como la resistencia de un material al flujo y describe la facilidad con la que una formulación puede deformarse frente a la aplicación de una fuerza externa (Adeboye *et al.*, 2024). La viscosidad adquiere particular relevancia en formulaciones tópicas, ya que condiciona no solo la extensibilidad y la uniformidad de la aplicación sobre la superficie cutánea, sino también la liberación y permeación del compuesto activo hacia las capas

más superficiales de la piel. Asimismo, constituye un factor determinante en la satisfacción y aceptación de un producto dermatológico (Saraiva *et al.*, 2023). En la Figura 4 se presentan los resultados de la medición de la viscosidad de los geles A-NP, A-BCO, X-NP y X-BCO. Todas las formulaciones se caracterizaron por su comportamiento pseudoplástico y propiedades no newtonianas al aumentar la velocidad de corte. Esto significa que, a baja velocidad de corte, las formulaciones mostraron una alta viscosidad, lo que representa la estabilidad física/firmeza inicial del producto. Al aumentar la velocidad de corte, la viscosidad de la formulación disminuyó rápidamente, lo que representa su fácil extensibilidad en una aplicación tópica (Manian *et al.*, 2022). Aunque todas las formulaciones tuvieron un comportamiento pseudoplástico, los geles elaborados a partir de goma xantana presentaron una viscosidad 4 veces inferior a la viscosidad de los geles obtenidos con ácido poliacrílico, evaluada a una tasa de corte de 0.1 s^{-1} . Este comportamiento coincide con lo reportado por Mulye *et al.* (2013), quienes observaron que el ácido poliacrílico formó redes más densas y viscosas que los geles obtenidos a partir de goma xantana a la misma concentración. Cabe destacar que la adición de las NP-EOL-R no afectó las propiedades de viscosidad de los geles.

Además de las propiedades fisicoquímicas y reológicas, las formulaciones de gel se evaluaron mediante inspección visual (Figura 5). El gel de ácido poliacrílico se caracterizó por una apariencia blanca y translúcida, mientras que el gel de goma xantana presentó una coloración blanco-amarillenta y opaca. En ninguna de las formulaciones se evidenciaron fenómenos de separación de fases, precipitación ni alteraciones visuales atribuibles a inestabilidad física.

Considerando las evaluaciones previas, se determinó que ambas formulaciones presentan características adecuadas para su aplicación cutánea. Por ello, se realizó un análisis de las propiedades sensoriales, ya que aspectos como la facilidad de aplicación, la extensibilidad, la rapidez de absorción, la sensación residual en la piel y la aceptabilidad general, resultan determinantes, tanto para la funcionalidad, como para el éxito comercial de los productos dermatológicos (Meneguello *et al.*, 2025). En la Figura 6 se presentan los resultados del análisis sensorial de las formulaciones A-NP y X-NP, realizado con 70 voluntarios de diferentes edades. La formulación A-NP obtuvo puntuaciones superiores en tres de las cuatro categorías evaluadas: olor, absorción y sensación en la piel, lo que sugiere que el

ácido poliacrílico puede mejorar estos atributos sensoriales. En cuanto a la textura, ambos geles mostraron un nivel similar de aceptación.

En la Figura 7 se presenta la preferencia general de los consumidores. El gel formulado con ácido poliacrílico fue preferido por el 83% de los participantes, frente al 17% que optó por el gel con goma xantana. La mayoría prefirieron A-NP por su textura, rapidez de absorción, sensación de frescura y agradable fragancia. Estos resultados confirman que las propiedades de la formulación influyen significativamente en la aceptación del consumidor.

4.4. Conclusiones

En el presente trabajo se caracterizó una formulación de NP cargadas con EO de *Lippia graveolens* en función de su perfil de liberación *in vitro*. La formulación mostró un comportamiento de liberación del EOL sostenido y controlado en función del tiempo y condiciones de pH.

Por otra parte, se incorporaron las NP-EOL-R en un gel como forma farmacéutica final para su caracterización fisicoquímica, reológica y sensorial. Los geles obtenidos mostraron valores de pH, densidad y adhesividad adecuados para su uso cutáneo. La evaluación de la viscosidad indicó un comportamiento pseudoplástico favorable para una aplicación fácil y uniforme. El análisis sensorial mostró una alta aceptación del gel a base de ácido poliacrílico con NP-EOL-R, particularmente, en términos de olor, absorción y sensación en la piel, alcanzando una preferencia global del 83%.

En conjunto, estos resultados indican que las formulaciones de gel con NP con EOL obtenidas en este trabajo son seguras y funcionales, con un potencial para su uso tópico en el tratamiento del HSV-1, y sientan las bases para estudios posteriores de eficacia clínica y optimización de la aplicación cutánea.

4.5. Referencias

Abbasnezhad N, Kebdani M, Shirinbayan M, Champmartin S, Tcharkhtchi A, Kouidri S & Bakir F. (2021). Development of a model based on physical mechanisms for the explanation of drug release: Application to diclofenac release from polyurethane films. *Polymers*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/polym13081230>

- Adeboye A, Onyeaka H, Al-Sharif Z & Nnaji N. (2024). Understanding the influence of rheology on biofilm adhesion and implication for food safety. *International Journal of Food Science*, 2024(1). <https://doi.org/10.1155/ijfo/2208472>
- Adepu S, Ramakrishna S. (2021). Controlled drug delivery systems: Current status and future directions. *Molecules*, 26(19), 5905. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>.
- AL-Smadi K, Ali M, Zhu J, Abdoh A, Phan K & Mohammed Y. (2025). Advances in characterization of transdermal and topical products using texture analyzer systems. *AAPS PharmSciTech*, 26(5). <https://doi.org/10.1208/s12249-025-03148-x>.
- Albuquerque PM, Azevedo SG, de Andrade CP, D'Ambros NCS, Martins Perez MT, Manzato L. (2022). Biotechnological applications of nanoencapsulated essential oils: A review. *Polymers*, 14(24), 5495. <https://doi.org/10.3390/polym14245495>.
- Cetin M, Atila A, Kadioglu Y. (2010). Formulation and *in vitro* characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1250–1256. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9489-6>.
- Comisión Permanente de Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2011). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 10^a ed.; Secretaría de Salud: Ciudad de México, México.
- D'Souza S. (2014). A Review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/304757>.
- Dejeu IL, Vicaș LG, Vlaia LL, Jurca T, Mureșan ME, Pallag A, Coneac GH, Olariu IV, Mut AM, Bodea AS, Dejeu GE, Maghiar OA, Marian E. (2022). Study for evaluation of hydrogels after the incorporation of liposomes embedded with caffeic acid. *Pharmaceutics*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/ph15020175>.
- Eltaib L. (2025). Polymeric nanoparticles in targeted drug delivery: Unveiling the impact of polymer characterization and fabrication. *Polymers*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/polym17070833>.
- Fantatto RR, Gomes AR, Constantini JVC, Rodero CF, Chorilli M, Chagas ACS, Melero A, Pietro RCLR. (2024). Development and evaluation of the acaricidal activity of xantan gum-based hydrogel and polymeric nanoparticles containing *Achyrocline satureioides* extract. *Gels*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/gels10100658>.
- Heredia NS, Vizúete K, Flores-Calero M, Katherine Pazmiño V, Pilaquinga F, Kumar B, Debut A. (2022). Comparative statistical analysis of the release kinetics models for nanoprecipitated drug delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid). *PLoS ONE*, 17(3 March), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264825>.
- Jasak K. (2024). Investigating drug release kinetics: Mechanisms and mathematical models.

- Journal of Pharmaceutics & Drug Delivery Research*, 2024. <https://doi.org/10.4172/2325-9604.1000279>.
- Lee JH, Yeo Y. (2016). Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chem Eng Sci.*, 24(125), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>.Controlled.
- Manian M, Jain P, Vora D, Banga AK. (2022). Formulation and evaluation of the *in vitro* performance of topical dermatological products containing diclofenac sodium. *Pharmaceutics*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091892>.
- Meneguello TG, Palma NK, Santos YR, Carvalho AF, Ladeira ADS, Bonsanto FP, Andreo-Filho N, Santos lopes P, Benson HAE, Leite-Silva VR. (2025). Physicochemical and sensory evaluation of sustainable plant-based homopolymers as an alternative to traditional emollients in topical emulsions. *Pharmaceutics*, 17(2), 1–25. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17020265>.
- Mulye SP, Wadkar KA, Kondawar MS. (2013). Formulation development and evaluation of indomethacin emulgel. *Pelagia Research*, 4(5), 31–45. Retrieved from www.pelagiaresearchlibrary.com.
- Proks M, Borcan F, Cheveresan A, Pinzaru I, Guta BA, Coricovac D, Paunescu V, Lazureanu V. (2018). Study on the release and bioevaluations of green silver nanoparticles entrapped inside polymer-based nanovesicles. *Materiale Plastice*, 55(4), 696–699. <https://doi.org/10.37358/mp.18.4.5103>.
- Rizi K, Green RJ, Donaldson MX, Williams AC. (2011). Using pH abnormalities in diseased skin to trigger and target topical therapy. *Pharmaceutical Research*, 28(10), 2589–2598. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0488-4>.
- Saadallah MS, Hamid OA. (2022). Eudragit® L100 nanoparticles for transdermal delivery of rosuvastatin calcium. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 13(3), 80–93.
- Sahle FF, Gerecke C, Kleuser B & Bodmeier R. (2017). Formulation and comparative *in vitro* evaluation of various dexamethasone-loaded pH-sensitive polymeric nanoparticles intended for dermal applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 516(1–2), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.029>.
- Saraiva SM, Crespo AM, Vaz F, Filipe M, Santos D, Jacinto TA, Paiva-Santos AC, Rodrigues M, Ribeiro MP, Coutinho P, Araujo ARTS. (2023). Development and characterization of thermal water gel comprising *Helichrysum italicum* essential oil-loaded chitosan nanoparticles for skin care. *Cosmetics*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10010008>.
- Sethi M, Sukumar R, Karve S, Werner ME, Wang EC, Moore DT, Kowalczyk SR, Zhang L, Wang AZ. (2014). Effect of drug release kinetics on nanoparticle therapeutic efficacy and toxicity.

- Nanoscale*, 6(4), 2321–2327. <https://doi.org/10.1039/c3nr05961h>.
- Strazzabosco G, Liboni A, Pezzi G, Alogna A, Bortolotti D. (2025). Insights into liposomal and gel-based formulations for dermatological treatments. *Gels*, 11(4), 1–36. <https://doi.org/10.3390/gels11040245>.
- Tocai AC, Memete AR, Ganea M, Vicaș LG, Gligor OD, Vicas SI. (2024). The formulation of dermato-cosmetic products using *Sanguisorba minor* Scop. extract with powerful antioxidant capacities. *Cosmetics*, 11(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cosmetics11010008>.
- Van Gheluwe L, Chourpa I, Gaigne C, Munnier E. (2021). Polymer-based smart drug delivery systems for skin application and demonstration of stimuli-responsiveness. *Polymers*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/polym13081285>.
- Wang E, Qi Z, Cao Y, Li R, Wu J, Tang R, Gao Yi, Du R, Liu M. (2025). Gels as promising delivery systems: Physicochemical property characterization and recent applications. *Pharmaceutics*, 17(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17020249>
- Weng J, Tong HHY, Chow SF. (2020). *In vitro* release study of the polymeric drug nanoparticles: Development and validation of a novel method. *Pharmaceutics*, 12(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080732>.
- Zhang Y, Zhang J, Chen M, Gong H, Thamphiwatana S, Eckmann L, Gao W, Zhang L. (2016). A bioadhesive nanoparticle-hydrogel hybrid system for localized antimicrobial drug delivery. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(28), 18367–18374. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b04858>
- Zhou Y, He C, Chen K, Ni J, Cai Y, Guo X & Wu XY. (2016). A new method for evaluating actual drug release kinetics of nanoparticles inside dialysis devices via numerical deconvolution. *Journal of Controlled Release*, 243, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.031>.

CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo contribuyó al avance en el diseño de sistemas nanoparticulados con potencial terapéutico frente a infecciones virales cutáneas, particularmente aquellas causadas por el HSV-1.

En este contexto, las NP cargadas con EO de *Lippia graveolens* presentaron características fisicoquímicas que favorecen su deposición en la piel y su evaluación *in vitro* frente al HSV-1.

La nanoencapsulación permitió potenciar la actividad antiviral del EOL, incrementándola 1.85 veces respecto al EOL libre. Asimismo, se observó un aumento en la viabilidad celular en células Vero tratadas con las NP-EOL, lo que se reflejó en un mayor SI, y por ende, en una mejor relación eficacia/seguridad del agente antiviral.

Por otra parte, la validación del método analítico HS-SPME-GC representó un aporte metodológico relevante, al permitir la cuantificación precisa y exacta de los principales componentes del EOL en las NP, así como su posterior cuantificación en muestras de piel.

La valoración biofísica de la piel mostró que las nanoformulaciones aumentan los niveles de hidratación, conservan los valores de pH y melanina y no altera los valores de TEWL, por lo que se sugiere que no comprometen la integridad de la barrera cutánea, lo que respalda su potencial aplicación tópica en el tratamiento del herpes labial.

Finalmente, la incorporación de las NP-EOL en una formulación en gel demostró ser una estrategia viable para su aplicación. La formulación presentó propiedades fisicoquímicas, reológicas y sensoriales adecuadas, así como una aceptación favorable por parte de los usuarios, reforzando su potencial como formulación innovadora y segura para el tratamiento tópico de infecciones por HSV-1.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que las NP cargadas con EO de *Lippia graveolens* constituyen una alternativa prometedora para el desarrollo de nanomedicinas antivirales de aplicación cutánea, contribuyendo a la búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces y seguras.

PERSPECTIVAS

- Establecer el mecanismo de acción de la NP-EOL contra la infección por HSV-1.
- Ampliar la caracterización fisicoquímica del gel incorporado con NP-EOL.
- Evaluar la actividad antiherpética *in vivo* de las NP-EOL en un modelo de herpes cutáneo en ratón.

ANEXO I

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Artículo en revista científica indexada (JCR):

- Espinosa-Carranza NN, Álvarez-Román R, Silva-Mares DA, Pérez-López LA, Leos-Rivas C, Rivas-Morales C, Báez-González JG, Galindo-Rodríguez SA. (2025). Nanoparticles loaded with *Lippia graveolens* essential oil as a topical delivery system: *In vitro* antiherpetic activity and biophysical parameters evaluation. *Pharmaceutics*, 17(10), 1286. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17101286>. Factor de impacto 5.5, Q1.

Artículo arbitrado:

- Galindo Salinas AS, Álvarez Román R, Galindo Rodríguez SA, Espinosa Carranza NN. (2024). Desarrollo de un alimento funcional de confitería a base de un nanoingrediente antioxidante. *ECTI, Experiencias Científicas Tecnológicas y de Innovación*, 4(1), 338-342. ISSN: 2954-3746.

Artículo de divulgación:

- Espinosa-Carranza NN, Galindo-Rodríguez SA, Leos-Rivas C, Rivas-Morales C, Báez-González JG, Álvarez-Román R. (2024). Los aceites esenciales como alternativa natural para el tratamiento de enfermedades virales. *Biología y Sociedad*, 7(14), 61-73. <https://doi.org/10.29105/bys7.14-131>.

Patentes:

- Álvarez Román, R., Galindo Rodríguez, S.A., Espinosa Carranza, N.N., Zamora Mendoza A.G. Nanocápsulas de carvacrol y su uso como agente antioxidante dermoprotector, IMPI, Título de Patente No. 418894 (2024).

Congresos:

- 33° Congreso Nacional de Investigación e Innovación en Medicina. Valoración

biofísica de nanopartículas con aceite esencial de orégano para tratamiento potencial de trastornos cutáneos. Nancy N. Espinosa-Carranza, Sergio A. Galindo-Rodríguez, Catalina Leos-Rivas, Catalina Rivas-Morales, Juan G. Báez-González, David A. Silva-Mares, Luis A. Pérez-López, Rocío Álvarez-Román. Monterrey, N.L. México, 9 y 10 de octubre 2025. (Presentación oral — Reconocimiento al Segundo Lugar en la categoría “Investigación Médica en Ciencias Básicas”).

- VII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde. Evaluación de terpenos, fenilpropenos y aceites esenciales nanoencapsulados para su potencial uso como fotoprotectores. Nancy Nallely Espinosa Carranza, Zitlaly Sarahí Martínez Guzmán, Sergio Arturo Galindo-Rodríguez, Luis Alejandro Pérez López, Rocío Álvarez Román. Monterrey, N.L. México, 19 y 20 de octubre 2023. (Cartel).
- Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Formulación y caracterización de nanopartículas poliméricas con aceite esencial de orégano para su aplicación antiviral. Nancy Espinosa-Carranza, Rocío Álvarez-Román, Catalina Leos-Rivas, Catalina Rivas-Morales, Juan Báez-González, Sergio Galindo-Rodríguez. Ixtapa Zihuatanejo, México, 10-15 de septiembre 2023. (Cartel).
- 17va. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Evaluación de los efectos del carvacrol nanoencapsulado en las propiedades físicas de la barrera cutánea. Nancy Espinosa-Carranza, Rocío Álvarez-Román, Catalina Rivas-Morales, David Mizaél Ortiz-Martínez, Catalina Leos-Rivas, Sergio Galindo-Rodríguez. Monterrey, N.L., México, 18-20 de mayo 2022. (Cartel).

Tesis asesoradas (licenciatura):

- Elaboración de un alimento funcional con silimarina nanoencapsulada. Ana Sofía Galindo Salinas, Licenciado en Ciencia de Alimentos, FCB-UANL (2024).
- Evaluación del efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de orégano (*Lippia* sp.) nanoencapsulado contra microorganismos formadores de la biopelícula dental. Sofía Nahomi Cruz Lizcano, Químico Bacteriólogo Parasitólogo, FCB-UANL (2022).

RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. Nancy Nallely Espinosa Carranza

Candidata al grado de: Doctora en Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos.

Título de tesis: **Nanoformulación de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) como potencial nanomedicina en el tratamiento del herpes labial.**

Campo de estudio: Nanotecnología aplicada a las Ciencias Biológicas y de la Salud.

Datos personales: Nacida el 14 de diciembre de 1993 en Monterrey, Nuevo León, México. Hija de Jaime Espinosa Neri y Claudia Carranza Calvillo.

Formación académica: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, donde obtuvo el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2015 con la tesis titulada “Evaluación del efecto dermoprotector de extractos bioactivos de microalgas aisladas en el estado de Nuevo León”.

En el 2020 obtuvo el grado de Maestra en Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos con la tesis “Valoración biofísica del carvacrol nanoencapsulado para su uso como dermoprotector”.

Experiencia profesional: Desde el 2017 ha desarrollado actividades de investigación en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Ha colaborado como profesora asistente en la asignación de Análisis Instrumental (100% práctica) y como docente en la Escuela y Preparatoria Técnica Médica de la UANL (enero-junio 2025).