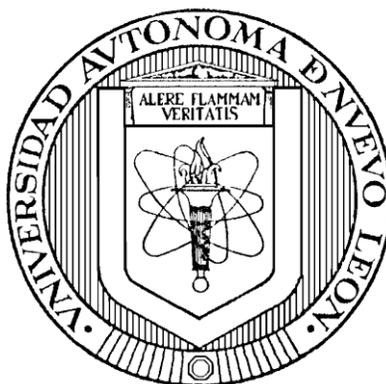


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



***OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
PARA LA ENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES POR LA TÉCNICA DE
NANOPRECIPITACIÓN***

POR:

Q.B.P. LORENA LUGO ESTRADA

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

Septiembre 2012

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA LA ENCAPSULACIÓN DE ACEITES
ESENCIALES POR LA TÉCNICA DE NANOPRECIPITACIÓN

Aprobación de Tesis:



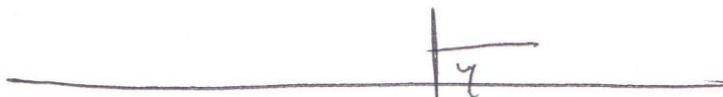
DRA. ROCÍO ÁLVAREZ ROMÁN
Director de Tesis



DR. LUIS ALEJANDRO PÉREZ LÓPEZ
Comisión de Tesis



DRA. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS
Comisión de Tesis



DR. MED. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi cariño a mi familia que me apoyó y alentó a seguir adelante.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”

Albert Einstein

*“No te quedes inmóvil
al borde del camino
no congeles el júbilo
no quieras con desgana
no te salves ahora ni nunca
no te salves*

*no te llenes de calma
no reserves del mundo
sólo un rincón tranquilo
no dejes caer los párpados
pesados como juicios*

*no te quedes sin labios
no te duermas sin sueño
no te pienses sin sangre
no te juzgues sin tiempo...”*

Mario Benedetti

Agradecimientos

Dentro de este proceso de formación y aprendizaje muchas personas fueron parte de ello, algunas me ayudaron a seguir adelante, otros me guiaron y otros fueron a lado mío en el camino, el cual fue una experiencia maravillosa y satisfactoria.

Quisiera dar las gracias en general, a todos los que fueron parte de ello por involucrarse de una u otra forma en la realización de este trabajo.

A mis papás por estar al pendiente de mi educación y haberme formado de la forma en que lo hicieron, por su apoyo incondicional, su tiempo y amor sobre todas las cosas.

A mi hermano por estar siempre en las buenas y en las malas, y tenerme paciencia.

A mis tíos Lourdes y Enrique por preocuparse por nosotros, su apoyo y cariño.

A mi abuelita Yolanda por sus consejos, amor y estar siempre que la necesito.

A Jorge por ser una parte muy importante de mi vida, por su paciencia y amor incondicional; y por ser uno de los pilares de mi vida.

A mis amigos Tavas, Moy, Paco, Alma, por apoyarme, darme ánimos siempre y sacarme una sonrisa.

A mi amiga Liz Reyes por acompañarme en este proceso del posgrado, su apoyo y amistad.

A la Dra. Rocío Álvarez por confiar en mí, sus enseñanzas, por apoyarme y fomentar mi creatividad en el laboratorio para desarrollar nuevo conocimiento científico, así también por su gran capacidad y dedicación en la ciencia; siendo siempre amable, sonriente y preocupada por el bienestar de sus alumnos.

Al Dr. Sergio Galindo por iniciarme en el mundo de las nanopartículas, compartir sus conocimientos y apoyarme en este proyecto dejándome trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Alejandro Pérez por su apoyo, su actitud siempre amable, alegre y cooperativa.

A la Dra. Ma. de la Luz Salazar por su apoyo y preocupación por mi trabajo, tratándome siempre con una sonrisa y muy alegre.

A mis compañeros de posgrado por compartir los momentos buenos y malos, su apoyo y también los momentos divertidos.

A los del grupo de la 1 por su amistad y sacarme siempre una carcajada con sus ocurrencias, haciendo más amena mi estancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Por la beca de manutención otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias con orientación terminal en Química Biomédica, con número de becario 247621

A la Secretaría de Educación Pública (SEP)

Por el apoyo recibido para la realización de este trabajo mediante el Fondo Sectorial de investigación para la educación SEP-CONACyT con el proyecto “Obtención y caracterización de sistemas nanoparticulados para su aplicación dermatológica” con el número No.129961.

Por la beca complementaria para el seguimiento de este trabajo con el número 18132.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)

Por el apoyo recibido para la realización de este trabajo con el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica con el proyecto SA377-10.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA LA ENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES POR LA TÉCNICA DE NANOPRECIPITACIÓN

Presentado por:

Q.B.P. LORENA LUGO ESTRADA

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Rocío Álvarez Román.

FIRMA

DIRECTOR DE TESIS



Dra. Rocío Álvarez Román

RESUMEN

Q.B.P. Lorena Lugo Estrada

Fecha de presentación: Septiembre 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del estudio: **OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA LA ENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES POR LA TÉCNICA DE NANOPRECIPITACIÓN**

Número de páginas: 98

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

Área de estudio: Química Analítica/Química de Productos Naturales

Propósito y Método de Estudio: En los últimos años se le ha dado una gran importancia al uso de recursos vegetales (i.e.: aceites esenciales) como alternativa natural en el área biomédica, alimentaria, cosmética y agrícola. El aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo) ha presentado actividad antibacteriana, antimicótica, antioxidante e insecticida. No obstante, sus componentes son moléculas volátiles, inestables y susceptibles a la degradación por el oxígeno del aire y los rayos UV. Su encapsulación en nanopartículas poliméricas (NP), es un alternativa innovadora que previene la volatilización de los componentes activos y al mismo tiempo, extiende su vida útil al protegerlos de reacciones de oxidación y descomposición inducidas por el oxígeno y la luz. Las NP son sistemas coloidales particularizados de tamaño nanométrico (100-1000 nm).

Este trabajo consta de tres etapas: i) Obtención y caracterización física y química del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, ii) Optimización y validación de la técnica de microextracción en fase sólida en modalidad *headspace* (HS-SPME) para la cuantificación de los componentes del aceite esencial encapsulado en NP y iii) Obtención y caracterización de NP poliméricas cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris*. En la primer etapa, se obtuvo el aceite esencial de *Thymus vulgaris* por hidrodestilación, se identificaron sus componentes y la proporción de cada uno por CG-MS y GC-FID. Se realizó la caracterización física determinando densidad relativa, índice de refracción y rotación óptica. Para la segunda etapa, se eligió la mejor fibra de SPME para la extracción de tres componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, se optimizó la técnica de HS-SPME y se validó determinando linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, robustez, selectividad y exactitud. Finalmente, se optimizó la técnica de nanoprecipitación para la obtención de NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris*, posteriormente, se evaluaron dos técnicas de purificación de NP: evaporación a presión reducida y diálisis; para finalmente determinar su potencial Z, índice de polidispersidad, tamaño, porcentaje de eficiencia de encapsulación, porcentaje de encapsulación, apariencia y estabilidad.

Conclusiones y Contribuciones: La técnica de nanoprecipitación permite obtener una formulación de NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* estables. Los métodos cromatográficos desarrollados permitieron obtener una respuesta lineal y precisa de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en NP. Cabe mencionar que es la primera vez que se obtienen NP poliméricas cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por la técnica de diálisis. Con el método de purificación desarrollado fue posible obtener NP cargadas con un aceite esencial de origen natural libre de solvente y con alto porcentaje de encapsulación.



Dra. Rocío Álvarez Román
Directora de Tesis

Índice

Contenido	Página
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	
I.I Aceites esenciales.....	1
<i>I.I.I. Aplicaciones de los aceites esenciales.....</i>	<i>2</i>
<i>I.I.II Formulaciones para aceites esenciales.....</i>	<i>4</i>
<i>I.I.III. Obtención y purificación de NP.....</i>	<i>8</i>
I.II <i>Thymus vulgaris</i>.....	10
I.III Cuantificación de aceites esenciales en diversas formulaciones.....	10
I.IV Justificación.....	14
I.V Objetivo general.....	15
I.VI Objetivos específicos.....	15
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	
II. I. Material, equipo y reactivos.....	16
<i>II.I.I. Reactivos.....</i>	<i>16</i>
<i>II.I.II. Material.....</i>	<i>17</i>
<i>II.I.IV. Material biológico.....</i>	<i>17</i>
<i>II.I.II. Equipo.....</i>	<i>18</i>
II.II. Obtención y caracterización química y física del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>.....	19
<i>II.II.I Obtención del aceite esencia.....</i>	<i>19</i>
<i>II.II.II. Caracterización química.....</i>	<i>19</i>
<i>II.II.III. Caracterización física.....</i>	<i>21</i>

*Índice de refracción.....	21
*Rotación óptica.....	22
*Densidad relativa.....	22
II.III. Desarrollo del método con Microextracción en fase sólida en modo headspace (HS-SPME) por cromatografía de gases (GC-FID).....	23
II.III.I. Acondicionamiento de las fibras de SPME.....	24
II.III.II. Selección de la fibra de SPME.....	24
II.III.III. Optimización del método de extracción por HS-SPME.....	25
II.IV. Validación para la cuantificación del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> en NP.....	26
II.IV.I. Validación del sistema	27
*Linealidad.....	27
*Límite de detección.....	28
*Límite de cuantificación.....	29
*Precisión.....	30
II.IV.II. Validación del método.....	32
*Exactitud.....	32
*Selectividad.....	33
*Precisión.....	33
*Robustez.....	34
II.V. Obtención, optimización y caracterización de las NP.....	36
II.V.I Optimización de la técnica de Nanoprecipitación.....	37
*Optimización de la formulación de NP.....	37
*Técnicas de purificación para la eliminación del solvente.....	37
II.V.II. Caracterización de NP	38
*Tamaño de partícula y potencial Z.....	38
*Estabilidad.....	38
*Contenido de NP.....	38
II.VI. Obtención de una Nanoemulsión del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>.....	39

CAPÍTULO III: RESULTADOS	
III.I. Obtención y caracterización química y física del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>.....	40
III.II. Desarrollo del método con Microextracción en fase sólida en modo <i>headspace</i> (HS-SPME) por cromatografía de gases (GC-FID).....	45
III.III. Validación para la cuantificación del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> en NP.....	49
III.IV. Obtención, optimización y caracterización de las NP.....	51

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	
IV.I. Obtención y caracterización química y física del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>.....	58
IV.II. Desarrollo del método de Microextracción en fase sólida en modo <i>headspace</i> (HS-SPME) por cromatografía de gases (GC-FID).....	62
IV.III. Validación para la cuantificación del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> en NP.....	67
IV.IV. Obtención, optimización y caracterización de las NP.....	70
IV.V. Obtención, optimización y caracterización de la NE.....	74

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	76
---------------------------------	-----------

CAPÍTULO VI: PERSPECTIVAS	70
----------------------------------	-----------

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	79
-----------------------------------	-----------

CAPÍTULO VIII: ANEXOS	85
------------------------------	-----------

Índice de Figuras

Figura	Página
Fig.1.1 Ejemplo de cada tipo de terpeno encontrado en los aceites esenciales.....	2
Fig.1.2 Liposoma formado por fosfolípidos.....	5
Fig.1.3 Nanopartícula sólida lipídica.....	6
Fig.1.4 Tipos de Nanopartículas poliméricas.....	7
Fig.2.1. Técnica de <i>HS-SPME</i> utilizada para la cuantificación de los componentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	23
Fig.2.2 Técnica de nanoprecipitación para la obtención de NP cargadas con el aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	36
Figura 3.1 Cromatograma de una solución del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> (20 mg/mL) en diclorometano por <i>GC-FID</i>	42
Fig. 3.2 Cromatograma de los compuestos probados para la elección del estándar interno en diclorometano (1 mg/mL).....	44
Fig. 3.3 Cromatogramas de los estándares a una concentración total de 10 µg/mL con las cuatro fibras de <i>SPME</i> por <i>GC-FID</i>	46
Fig.3.4 Comparación de las áreas de los tres estándares (concentración total de 10 µg/mL) obtenidas con las fibras de <i>SPME</i> evaluadas por <i>GC-FID</i>	47
Fig 3.5. Diferencias de áreas entre los niveles altos y bajos de las variables en la optimización de la técnica de <i>HS-SPME</i> con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> (10 µg/mL) y la fibra de poliacrilato.....	48

Fig.3.6 Efecto de la cantidad de polímero sobre el tamaño de las nanopartículas preparadas por nanoprecipitación (Fase orgánica: 5 mL de acetona, X mg de poli ϵ -caprolactona; Fase acuosa: 20 mL de Tween 80® al 3% (p/v).....	52
Fig.3.7 Efecto de la cantidad de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> sobre el tamaño de las nanopartículas preparadas por nanoprecipitación (Fase orgánica: 5 mL de acetona, 15 mg de poli ϵ -caprolactona, X mg de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> ; Fase acuosa: 20 mL de Tween 80® al 3% (p/v).....	52
Fig.3.8 Evaluación del tamaño de partícula con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> purificadas por evaporación a presión reducida (NPepr), por diálisis (NPd) y la nanoemulsión (NE) durante 8 semanas.....	54
Fig.3.9 Evaluación del índice de polidispersidad de la formulación de NP con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> purificadas por evaporación a presión reducida (NPepr), por diálisis (NPd) y la nanoemulsión (NE) durante 8 semanas.....	54
Fig. 3.10 Curvas de distribución de tamaño de nanopartículas con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> purificadas por evaporación a presión reducida. (a) a 0 meses, (b) después de 2 meses.....	55
Fig. 3.11 Curvas de distribución de tamaño de nanopartículas con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> purificadas por diálisis. (a) a 0 meses, (b) después de dos meses.....	55
Fig. 3.12 Curvas de distribución de tamaño de partícula de la nanoemulsión con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> purificadas por evaporación a presión reducida. (a) a 0 meses, (b) después de 2 meses.....	56

Índice de Fórmulas

Fórmula	Página
2.1 Porcentaje de rendimiento de la extracción.....	19
2.2 Densidad relativa.....	22
2.3 Estadístico $S_{y/x}$	28
2.4 Desviación estándar de la ordenada al origen.....	28
2.5 Límite de detección.....	29
2.6 Límite de cuantificación.....	29
2.7 Media.....	30
2.8 Desviación estándar.....	31
2.9 Coeficiente de variación.....	31
2.10 Porcentaje de recobro.....	32
2.11 Porcentaje de encapsulación.....	39
2.12 Porcentaje de eficiencia de encapsulación.....	39

Índice de Tablas

Tabla	Página
Tabla 1.1 Aceites esenciales y su aplicación biológica en diferentes ámbitos.....	3
Tabla 1.2 Productos comerciales de aceites esenciales en diferentes formulaciones de liberación de activos.....	4
Tabla. 1.3. Ejemplos de nanopartículas poliméricas de aceites esenciales.....	8
Tabla 2.1 Condiciones para el acondicionamiento de las fibras de SPME.....	24
Tabla 2.2 Condiciones utilizadas en los experimentos de <i>HS-SPME</i> de acuerdo a lo reportado por Rodríguez-Lafuente A.....	25
Tabla 2.3 Matriz del diseño experimental de Plackett Burman utilizada en la optimización de la extracción por <i>HS-SPME</i> del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	25
Tabla 2.4 Matriz del diseño experimental de Plackett Burman utilizada para evaluar la Robustez del método con <i>HS-SPME</i> desarrollado para la cuantificación de componentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	35
Tabla.3.1 Optimización del programa de temperatura por <i>CG-FID</i> (inyección directa) para la caracterización química del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	41
Tabla 3.2 Componentes identificados del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> , contenido porcentual y tipo de compuesto por <i>GC-MS</i> y <i>GC-FID</i>	43

Tabla 3.3 Caracterización física del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> y del anetol según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.....	45
Tabla 3.4 Variables evaluadas en sus niveles altos y bajos para la optimización del método de extracción con la fibra de PA para la HS-SPME.....	48
Tabla 3.5 Condiciones óptimas para la extracción de γ -terpineno, timol y carvacrol a partir del aceite esencial de <i>Tymus vulgaris</i> con HS-SPME por CG.....	49
Tabla 3.6 Valores obtenidos de los parámetros evaluados en la validación del sistema para la cuantificación de los componentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> con HS-SPME por GC-FID.....	50
Tabla 3.7 Valores obtenidos de los parámetros evaluados en la validación del método para la cuantificación de los componentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> con HS-SPME por GC-FID.....	51
Tabla 3.8 Valores obtenidos del tamaño de partícula y potencial Z de nanopartículas con aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> purificadas y de la nanoemulsión.....	53
Tabla 3.9 Porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> en las formulaciones de nanopartículas poliméricas purificadas por evaporación a presión reducida y por diálisis.....	57

Abreviaturas

%E	Porcentaje de encapsulación
%EE	Porcentaje de eficiencia de la encapsulación
%R	Porcentaje de recuperación
°C	Grados centígrados
°C/min	Grados centígrados por minuto
µm	Micrómetros
A _n	Gramos de aceite esencial no encapsulado
A _t	Gramos de aceite esencial total
C	Peso del agua en gramos medida en la calibración
CA	Concentración del analito añadido
Ca	Concentración del analito medida en la muestra adicionada
CAR/PDMS	Carboxen / Poldimetil siloxano
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Cols.	Colaboradores
CU	concentración del analito medida en la muestra sin adicionar
D	peso de la muestra en gramos
D.R.	densidad relativa de la muestra
DER	Desviación estándar relativa
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenceno/Carboxen/polidimetilsiloxano
FPP	Pirofosfato de farnesilo
g	Gramos
GC	Cromatografía de gases
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización en flama
GC-MS	Cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas
GGP	Pirofosfato de geranilo
hrs	Horas
HS	<i>Headspace</i>
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en modo de <i>headspace</i>
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
m	Pendiente de la curva de calibración
mg/mL	Miligramos por mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
n	Número de mediciones
NE	Nanoemulsión

nm	Nanómetros
NP	Nanopartículas poliméricas
NSL	Nanopartículas sólidas lipídicas
o/w	Aceite en agua
P	Gramos de polímero
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
pH	Potencial de hidrógeno
r	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
s	Desviación estándar
Sa	Desviación estándar de la ordenada al origen
SPME	Microextracción en fase sólida
x _i	Valor de cada medición
\bar{x}	Promedio de datos
y _i	Valor de la respuesta
\hat{y}_i	Valor de la respuesta calculada
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros
µm	Micrómetros

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.I Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas, entre lo que destacan los monoterpenos (compuestos de 10 carbonos), los sesquiterpenos (de 15 carbonos) y los Fenilpropanos, aunque se puede encontrar en menos proporción otro tipo de compuestos como algunos alcoholes (Bakkali F., *et al.*, 2008).

La estructura química de los monoterpenos y diterpenos se derivan del geranilpirofosfato (GPP) y farnesilpirofosfato (FPP), respectivamente, los cuales son intermediarios de la vía del mevalonato, una ruta metabólica importante en células eucariotas.

Los fenilpropanos son sustancias derivados del ácido shikímico, con un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos (Wade L.G., 2004). En la figura 1.1 se muestra un ejemplo de cada tipo de terpeno encontrado en los aceites esenciales.

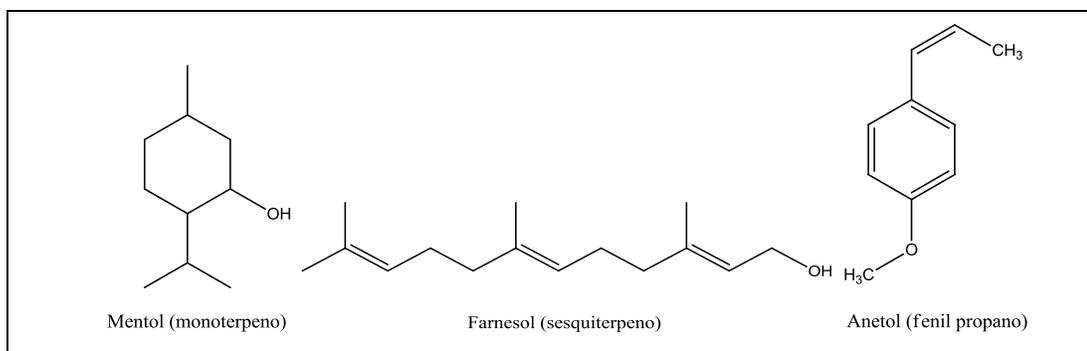


Fig.1.1 Ejemplos de compuestos encontrados en los aceites esenciales.

La composición de los aceites esenciales depende de varios factores como por ejemplo: época de colecta, localización geográfica, momento del día de colecta, forma de recolección del material vegetal y técnica de extracción. Los aceites esenciales se pueden extraer de cualquier parte de la planta. Por ejemplo, se han extraído a partir de las hojas del ajeno, la albahaca y el eucalipto; de las raíces en el caso del cúrcuma y el jengibre; del pericarpio del fruto de cítricos; a partir de las semillas, como en el anís y el hinojo; del tallo de la canela, utilizando las flores como en la lavanda y el tomillo y finalmente de los frutos de la nuez moscada y la pimienta (Domínguez X., 1985).

1.1.1. Aplicaciones de los aceites esenciales

Actualmente no existen muchos aceites esenciales inscritos en las farmacopeas, sin embargo, una amplia investigación realizada a nivel mundial sobre estos aceites ha demostrado una importante actividad biológica. Además, su fácil obtención y baja toxicidad biológica ha permitido que, los aceites esenciales sean una alternativa natural con una amplia gama de aplicaciones y usos en el ámbito médico, agrario, alimentario y

cosmético (Bakkali F.S., *et al.*, 2008). En la tabla 1.1 se mencionan algunas aplicaciones biológicas de los aceites esenciales.

Tabla 1.1 Aceites esenciales y su aplicación biológica en diferentes ámbitos.

Ámbito	Aceite esencial	Actividad/Uso	Referencia
Farmacia y Medicina	<i>Eucalyptus globulus</i>	Antioxidante contra radicales libres con DPPH	(Mishra A.K., <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Lippia sidoides</i>	Antimicrobiano contra cepas de patógenos orales (<i>Candida spp.</i> y <i>Streptococcus spp.</i>)	(Botelho M.A., <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Aloysia triphylla</i>	Antimicótico contra <i>Candida albicans</i> en candidiasis	(Oliva M.L., <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Santulina insularis</i>	Antiviral contra HSV-1	(Valenti D., <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Cymbopogon nardus</i>	Repelente contra <i>Aedes aegypti</i>	(Trongtokit Y., <i>et al.</i> , 2005)
Alimentos	<i>Thymus vulgaris</i> <i>Origanum vulgare</i> <i>Ocimum basilicum</i>	Saborizante en aceite de canola	(Adams A., <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Salvia officinalis</i> <i>Schinus molle</i>	Conservador actuando como antimicrobiano contra <i>Salmonella spp.</i>	(Hayouni E.A., <i>et al.</i> , 2008)
Agricultura	<i>Artemisia arborescens</i>	Pesticida contra los áfidos <i>Aphis gossipy</i> , <i>Bemisia tabaci</i> , en cultivos	(Lai F., <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Pistacia lentiscus</i>	Antifúngico contra hongos fitopatógenos: <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	(Barra A., <i>et al.</i> , 2007)

Sin embargo, el uso de los aceites esenciales como agentes con actividad terapéutica se ha visto limitado por su inestabilidad química atribuida a la degradación de sus componentes por la luz y el oxígeno del aire, así como por la elevada volatilidad de sus componentes activos que disminuye su efectividad terapéutica (Lai F., *et al.*, 2006).

I.I.II Formulaciones para aceites esenciales

En el mercado, ya se encuentran diferentes formulaciones a base de aceites esenciales y/o algunos de sus componentes con variadas actividades biológicas (tabla 1.2.).

Tabla 1.2 Productos comerciales de aceites esenciales en diferentes formulaciones de liberación de activos.

Formulación	Marca	Aceite esencial	Aplicación
Liposomas	Pratima®	Frijol de soya	Cosmética
Micropartículas	L'Occitane®	<i>Oenothera biennis</i> <i>Brago officinalis</i>	Cosmética
Fitosomas	Planti-Oxidants®	<i>Camellia sinensis</i> <i>Silymarin marianum</i> <i>Vitis vinifera</i>	Suplemento alimenticio
Aceite esencial	Vinca Minor ®	<i>Lavandula latifolia</i> <i>Cymbopogon nardus</i> <i>Ocimum basilicum</i>	Repelente

De hecho, durante los últimos quince años, diferentes formulaciones han sido desarrolladas con la intención de proteger y aumentar la vida media de los aceites esenciales, entre los que destacan las micropartículas poliméricas, los liposomas, las nanopartículas sólidas lipídicas y las nanopartículas poliméricas.

Micropartículas poliméricas- son sistemas particularizados de tamaño micrométrico (100-1000µm) constituidos por polímero y principios activos hidrofóbicos. Las

micropartículas poliméricas confieren protección al principio activo evitando su degradación y facilitan el transporte del activo dentro del organismo. Estos sistemas ya han sido utilizados para encapsular aceites esenciales. You J. y cols. (2006) desarrollaron una formulación del aceite esencial de *Curcuma cedoaria* para la administración oral a conejos en el estudio de la actividad hepatoprotectora. Los resultados permitieron demostrar una mejor biodisponibilidad del aceite esencial encapsulado en las micropartículas poliméricas que a partir de la formulación convencional del mismo aceite y por lo tanto una mejor actividad.

Liposomas- son partículas esféricas formados generalmente de fosfolípidos donde se encapsulan moléculas activas tanto hidrofílicas como hidrofóbicas (figura1.2). Valenti D. y cols. (2001) encapsularon aceite esencial de *Santolina insularis* en liposomas de fosfatidilcolina y colesterol para determinar su actividad antiviral *in vitro* contra el virus HSV-1. Se observó que la formulación de liposomas cargados con el aceite fue más eficaces contra el virus que el aceite esencial libre. Al mismo tiempo, establecieron que los liposomas con el aceite esencial presentaban una buena estabilidad evitando la degradación del aceite y la formación de agregados.

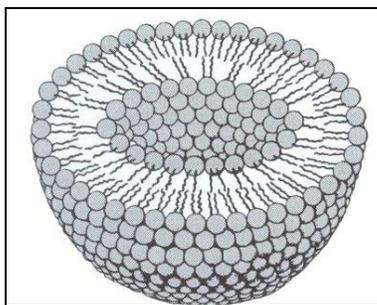


Fig.1.2 Liposoma formado por fosfolípidos

Nanopartículas sólidas lipídicas (NSL)- son sistemas coloidales con una alta proporción de agua (70-95%) elaborados a partir de lípidos fisiológicos sólidos (figura 1.3). Lai F. y cols. (2006) obtuvieron formulaciones de NSL con aceite esencial de *Artemisa arborescens* para su aplicación agrícola como pesticida. Demostraron que las NSL tienen una alta estabilidad y buena capacidad para reducir la evaporación de los aceites esenciales, siendo buenos acarreadores para pesticidas ecológicos.

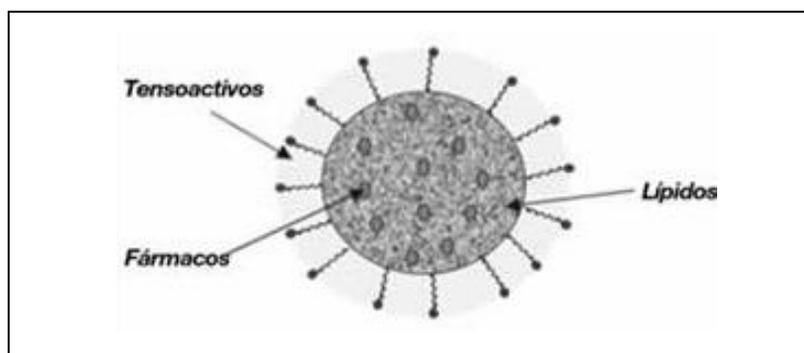


Fig.1.3 Nanopartícula sólida lipídica

Nanopartículas poliméricas (NP)- son sistemas coloidales sólidos con un tamaño de partícula en el rango de 10 a 1000 nm. Básicamente, las NP están formadas por el polímero y el principio activo disuelto, atrapado o encapsulado en la matriz polimérica. En base a su morfología y arquitectura (figura 1.4), existen dos tipos de NP: las nanoesferas (sistema monolítico matricial donde el principio activo sólido es adsorbido o incorporado) y las nanocápsulas (sistema vesicular donde el principio activo líquido está disuelto o disperso en el núcleo o en la pared polimérica) (Fessi H., *et al.*, 1989).

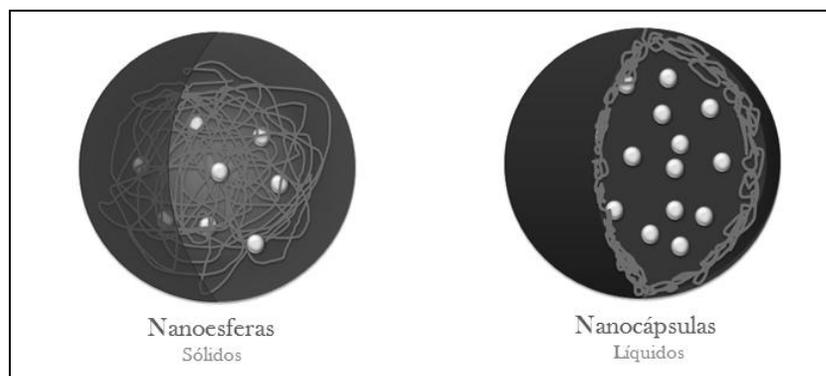


Fig.1.4 Tipos de Nanopartículas poliméricas

Sohn S.O. y cols. (2007) desarrollaron una formulación de NP y micropartículas poliméricas con aceite esencial de *Lavandula latifolia* para su aplicación sobre una tela para aromaterapia, demostraron que la encapsulación del aceite esencial en las NP mejoró su estabilidad.

Las propiedades fisicoquímicas de las NP le brindan mayores beneficios y ventajas respecto a otros sistemas particulados:

- Tamaño nanométrico. Permite entrar a las células atravesando su membrana o por endocitosis.
- Recubrimiento sólido. Permite proteger al principio activo de la degradación por oxígeno del aire, enzimas hidrolíticas, pH, luz y algunos otros factores, aumentando su estabilidad.
- Gran área superficial. Aumenta la biodisponibilidad y posiblemente la bioactividad del principio activo en sistemas biológicos.

I.II.III. Obtención y purificación de NP

Actualmente, existen variadas técnicas para la obtención de NP a partir de polímeros preformados que permiten encapsular aceites esenciales. En la tabla 1.3 se muestran formulaciones de NP utilizando diferentes polímeros y técnicas de obtención.

Tabla. 1.3. Ejemplos de nanopartículas poliméricas de aceites esenciales.

Aceite encapsulado	Técnica de obtención	Polímero	Tamaño (nm)	Aplicación	Referencia
<i>Allium sativum</i> L.	<i>Melted dispersion</i>	PEG ^a	233	Insecticida contra el escarabajo rojo del harina (<i>Tribolium castaneum</i>)	(Yang F.L., <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lippia sidoides</i>	<i>Spray drying</i>	Quitosan y goma de mascar	335-558	Insecticida contra el mosquito <i>Aedes aegypti</i>	(Abreu F., <i>et al.</i> , 2012)
<i>Curcuma longa</i>	Emulsificación o/w y gelificación	Alginato	263-373	Medicina y alimentos	(Lertsutthiwong P., <i>et al.</i> , 2008)
<i>Lavandula latifolia</i>	Emulsificación-Difusión	PVAc ^b	244	Aromaterapia	(Sohn S.O., <i>et al.</i> , 2007)

^aPEG: Polietilenglicol

^bPVAc: Acetato de polivinilo

Específicamente, la nanoprecipitación es una técnica que permite encapsular principios activos hidrofóbicos con buenos porcentajes de encapsulación. Brevemente, consiste en una fase orgánica compuesta por un polímero y el principio activo disueltos en un solvente orgánico parcialmente miscible en agua; esta fase se incorpora en una fase acuosa compuesta por tensoactivo y agua con agitación constante. Al estar en contacto las dos fases, las cadenas poliméricas se agregan con las moléculas del principio activo

quedando formadas las NP, mientras que el solvente orgánico difunde hacia la fase acuosa.

Después de la formación de las NP el solvente orgánico debe ser eliminado para evitar desestabilizar el sistema, formar agregados y por ende aumentar el tamaño de partícula y en el índice de polidispersidad (Chorny M., *et al.*, 2002).

Comúnmente, el solvente orgánico es eliminado por medio de evaporación a presión reducida permitiendo una purificación rápida y controlada (Fessi H., *et al.*, 1989). Al tratarse de aceites esenciales encapsulados en NP, el uso del rotavapor conllevaría a la evaporación de sus componentes más volátiles afectando la eficiencia de encapsulación y probablemente su actividad terapéutica.

Una técnica alternativa de purificación de sistemas coloidales es la diálisis. En donde el solvente orgánico presente en la formulación de NP debe difundir a través de una membrana semipermeable hacia el agua que se encuentra en el exterior (Villiers M.M., *et al.*, 2009). Las NP se mantienen al interior de la membrana debido a que son de un tamaño mayor que el poro de la misma.

El uso de esta técnica podría tener ventajas sobre la evaporación a presión reducida debido a que no requiere el uso de altas temperaturas y presiones que favorecerían la evaporación de los componentes más volátiles del aceite esencial.

I.II *Thymus vulgaris*

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* está compuesto principalmente por o-cimeno, timol y γ -terpineno (Guerra-Boone L., 2011). Diferentes investigaciones le confieren la mayor parte de sus actividades biológicas a la presencia de estos tres compuestos. Por ejemplo, se le ha atribuido una buena actividad antioxidante al aceite esencial de *Thymus vulgaris* contra el estrés oxidativo inducido por aflatoxinas en ratas macho (El-Nekeety A.A., et al., 2011), una alta actividad antimicrobiana contra 10 patógenos contaminantes de alimentos (i.e.: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*) (Rota M.C., et al., 2008), una importante actividad antimicótica contra algunos tipos de hongos (i.e.: *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*) lo que favorece su uso como conservador post cosecha (Kumar A., et al., 2008), y por último una buena actividad repelente e insecticida contra *Meligethes aeneus* en cultivos de canola (Pavela R., 2011).

En general, la actividad antioxidante, antimicótica y antibacteriana se debe a los terpenos oxigenados presentes en el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, principalmente el timol y el carvacrol (El-Nekeety A.A., et al., 2011).

I.III Cuantificación de aceites esenciales en diversas formulaciones

Los componentes de los aceites esenciales son identificados y cuantificados principalmente con métodos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y de Cromatografía de Gases (GC).

La CLAR permite analizar compuestos volátiles, semivolátiles y no volátiles. Además, es rápida, de bajo consumo de solventes orgánicos y con altos porcentajes de recuperación. Sin embargo, en algunos casos, la sensibilidad está limitada por la baja concentraciones de los componentes presentes en los aceites esenciales y además un gran número de estos componentes no absorben en el rango del ultravioleta.

Una alternativa, ampliamente utilizada es la *GC-FID* (por sus siglas en inglés *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*) porque tiene una mayor sensibilidad en su detector y pueden analizarse muestras de analitos volátiles a concentraciones muy bajas.

Por otro lado, cuando el aceite esencial 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 aceite esencial es la *GC* con *headspace* (*HS*, por sus siglas en inglés).

La técnica de *HS*, consiste en mantener a los analitos volátiles y semivolátiles en su fase de vapor con la aplicación de temperatura a la muestra líquida. Los analitos en fase de vapor son detectados y posteriormente cuantificados por *GC*. Sin embargo, el uso de esta técnica en aceite esencial conllevaría una menor recuperación de los componentes generando métodos analíticos menos sensibles.

Una técnica que tiene la capacidad de combinar extracción y preconcentración en un solo paso es la microextracción en fase sólida en modo *headspace* (*HS-SPME*, por sus siglas en inglés). Los analitos en fase gaseosa en el *HS* se adsorben en una fibra recubierta de una fase estacionaria y se extraen directamente del *HS*. Posteriormente, la fibra de *SPME* se introduce en el cromatógrafo de gases, donde los analitos se desorben en el inyector a altas temperaturas.

Cabe mencionar que la técnica de *HS-SPME* es selectiva, rápida, relativamente barata y libre de solventes orgánicos, reduciendo el daño hacia el analista y el medio ambiente (Pawliszyn J., 1997).

Se ha reportado el uso de la *HS-SPME* para el análisis de aceites esenciales y/o sus componentes. Por ejemplo Bicchi C. y cols. (2007) evaluaron directamente la composición de dos plantas: *Matricaria chamomilla* L. y *Salvia lavandulifolia* demostrando la utilidad de la *HS-SPME* para el control de calidad de plantas medicinales.

De igual forma Adams A. y cols. (2011) determinaron los perfiles de un aceite de canola enriquecido con orégano, albahaca y tomillo. Demostraron que la *HS-SPME* es una técnica eficaz y sensible para la extracción de componentes volátiles vegetales.

La *HS-SPME* también ha sido utilizada en matrices biológicas. Kolhert C. y cols. (2002) analizaron el timol en plasma humano después de cierto tiempo de ingesta de una

preparación de *Thymus vulgaris*. Demostraron que la *HS-SPME* es una técnica eficaz para estudios de biodisponibilidad de productos herbales.

Esta técnica ha resultado ser una alternativa conveniente para la extracción de analitos volátiles y semivolátiles en sistemas matriciales. Baranauskiené R. y cols. (2005) determinaron los componentes de los aceites esenciales de casia, tomillo y orégano encapsulados en micropartículas con cuatro cubiertas diferentes por *HS-SPME*. Demostraron que los analitos volátiles se pueden extraer fácilmente y que la técnica de *HS-SPME* es sensible y reproducible para el análisis de aceites esenciales en matrices complejas.

Recientemente, Cavazos-Rodríguez M.R. (2010) desarrolló un método con *HS-SPME* para la cuantificación de carvacrol encapsulado en NP para su aplicación dermatológica. Estableció que la *HS-SPME* es una técnica eficaz para la cuantificación del carvacrol (componente del aceite esencial de *Thymus vulgaris*) a partir de un sistema vesicular polimérico como las NP (Álvarez-Román R., *et al.*, 2011).

I.IV JUSTIFICACIÓN

Teniendo como evidencia el gran potencial de los aceites esenciales como antimicóticos, antibacterianos, pesticidas, antioxidantes, saborizantes y/o conservadores en el ámbito médico, farmacéutico, agrícola y alimentario, así como la gran problemática existente respecto a la degradación química del aceite esencial causada por la luz y el oxígeno del aire, y la pérdida de sus compuestos activos volátiles; considerando las ventajas y beneficios que ofrecen los sistemas particulados, la encapsulación de aceites esenciales de origen natural en nanopartículas poliméricas es una alternativa innovadora y eficaz que favorecería el desarrollo de nuevos productos estables y su futura aplicación biológica para la mejoría de los productos existentes en el mercado actual.

I.V OBJETIVO GENERAL

Obtener una formulación de nanopartículas poliméricas (NP) cargadas con un aceite esencial de origen natural (*Thymus vulgaris*) para evaluar la encapsulación de sus componentes en base a su caracterización física y química.

I.VI OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características físicas y químicas del aceite esencial de *Thymus vulgaris* obtenido por hidrodestilación.
- Implementar y validar un método de microextracción en fase sólida para la cuantificación de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.
- Optimizar la técnica de nanoprecipitación para la obtención de NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris*.
- Determinar las características fisicoquímicas de las NP cargadas con el aceite esencial.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

II. I. Material, equipo y reactivos

II.I.I. Material

- Agitadores magnéticos
- Columna de cromatografía de gases, HP-5MS, (5%-Fenil)-metilpolisiloxano, (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm), Agilent Technologies
- Fibras de SPME: Poliacrilato (PA) de 85 μm, Divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) y Polidimetilsiloxano (PDMS), Supelco
- Portafibras, Supelco
- Membrana para diálisis de celulosa regenerada
- Picnómetro de vidrio (1 mL), Thomas Scientific
- Viales claros de 7 mL con tapa con septa de PTFE/silicón, Supelco

II.I.II. Material biológico

- Planta de *Thymus vulgaris* (Tomillo) del Mercado Juárez, en Monterrey, México (Colectada en Matehuala, SLP).

II.I.III. Equipo

- Hidrodestilador modificado de Clevenger
- Rotavapor, Laborota
- Cromatógrafo de gases Perkin Elmer ® Autosystem XL con inyector split/splitless y detector de ionización en flama.
- Balanza analítica, Shimadzu AX 200
- Baño de inmersión circulador, Thermo-circulator, LabTech
- Ultracentrífuga 64R Allegra™, Beckman Coulter
- Placa de agitación, IKA-Werke, RO-10, IKA-HS 260 basic
- Purificador de agua, Purelab UHQ
- Zetasizer Nanoseries, Nano-Zs90, Malvern Instruments
- Polarímetro 341, Perkin Elmer
- Refractómetro 10406, AO Reichert.

II.IV. Reactivos

- Acetona, grado HPLC, Burdick & Jackson
- Cloruro de metileno, J.T. Baker
- Solución estándar de n-alcanos C8-C20, Sigma-Aldrich
- Carvacrol, 97% (CG), Fluka
- γ -terpineno, limoneno, anetol y mentol, Sigma-Aldrich
- Acetato de linalilo, mirceno, eucaliptol y timol, Fluka
- Poli- ϵ -caprolactona, Mw ~14,000, Fluka
- Tween® 80, Sigma-Aldrich

II.II. Obtención y caracterización química y física del aceite esencial de *Thymus vulgaris*

II.II.I Obtención del aceite esencial

Se adquirió el *Thymus vulgaris* (tomillo) en el Mercado Juárez de Monterrey, Nuevo León, México. Las hojas y los tallos fueron cortados con tijeras para determinar posteriormente su peso. Se colocó el material vegetal en un matraz bola para integrarlo al equipo Clevenger modificado para iniciar la hidrodestilación durante 4 hrs a partir de la ebullición del agua.

El aceite esencial fue colectado, pesado y guardado en un vial de vidrio ámbar a -4°C. Posteriormente se calculó el porcentaje de rendimiento de la extracción de acuerdo a la fórmula 2.1

$$\%Rendimiento = \left(\frac{\text{Peso del aceite esencial}}{\text{Peso de la planta}} \right) * 100 \quad (2.1)$$

II.II.II. Caracterización química

Con el fin de identificar los componentes del aceite esencial del *Thymus vulgaris*, se realizó un análisis cualitativo por Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS por sus siglas en inglés). Se utilizó una columna HP-5MS.

Las condiciones cromatográficas se establecieron en base a la elución de los alcanos (C8 al C20). El programa del horno inició a 35 °C, se mantuvo durante 9 min, después se calentó hasta 150 °C (a 3 °C/min) y se mantuvo por 10min, posteriormente se elevó a 250 °C (a 10 °C/min) y finalmente se calentó hasta 270 °C (a 3 °C/min). La temperatura del inyector fue de 220 °C y del detector de 150°C. Se usó el helio como gas acarreador, con un flujo de 0.5 mL/min, con pureza del 99.9%.

Se inyectaron 2 µL de aceite esencial de *Thymus vulgaris* a una concentración de 2 mg/mL en hexano. Sus componentes se identificaron en base a la comparación con la biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*), al índice aritmético y al índice de Kovats (n-alcanos C8 al C20) (Adams R.P., 2007).

Con el fin de obtener la separación de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* se optimizó un método por Cromatografía de gases con detector de ionización en flama (GC-FID por sus siglas en inglés) con inyección directa.

Se inyectaron 2 µL del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en cloruro de metileno a una concentración de 20 mg/mL. Se analizó con condiciones cromatográficas previamente establecidas por Guerra-Boone L. (Guerra-Boone L., *et al.*, 2011). El programa del horno inició a 50 °C, después se calentó hasta 120 °C (a 6 °C/min) y se mantuvo durante 1min, posteriormente se elevó a 280 °C (a 25 °C/min) y se mantuvo por 1 min. La temperatura del inyector fue de 270 °C en modo *Split* (1:20). La temperatura del detector FID fue de 250°C. Se usó el helio como gas acarreador, con un flujo de 2 mL/min, con una

pureza del 99.9%. Las condiciones fueron modificadas hasta obtener todos los picos cromatográficos resueltos.

Una vez establecido el programa de temperatura óptimo, se calculó el porcentaje en el que aparecían cada uno de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*. Posteriormente se procedió a seleccionar tres componentes del aceite esencial como analitos para su seguimiento en las formulaciones de NP. Se calculó la proporción en la que aparecían los componentes seleccionados considerando el área de los tres como el 100%.

Para seleccionar el estándar interno, se inyectaron soluciones de estándares de mentol, acetato de linalilo, limoneno, eucaliptol y mirceno a una concentración de 1 mg/mL de dicloro metano.

II.II.II. Caracterización física

Índice de refracción

Para obtener el índice de refracción se empleó un refractómetro AO Reichert Modelo 10430 y se realizó en base a la ficha MGA 0741 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Previo a la determinación, el equipo fue calibrado con agua destilada a 25°C. Posteriormente, se depositó una gota del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre

la superficie del prisma de medición evitando la formación de burbujas de aire, se cerró y se obtuvo el resultado por triplicado. Se utilizó el anetol como control.

Rotación óptica

Para obtener la rotación óptica del aceite esencial de *Thymus vulgaris* se utilizó un polarímetro 341 Perkin Elmer y se realizó en base a la ficha MG 0771 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Previo a la determinación, el equipo fue calibrado a 25 °C con una solución de sacarosa de 260 mg/mL. Posteriormente, se llenó la celda de 1 mL y se obtuvo el resultado por sextuplicado. Se utilizó el anetol como control.

Densidad relativa

Para determinar la densidad relativa del aceite esencial de *Thymus vulgaris* se utilizó un picnómetro de 1 mL y se realizó en base a la ficha MG 0251 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Primero, se determinó el peso del picnómetro seco y vacío. Posteriormente, se llenó el picnómetro con agua destilada a 20°C (previamente llevada a ebullición), se calentó en el baño de agua a 25°C y se pesó. Se siguió el mismo procedimiento para el aceite esencial de *Thymus vulgaris* y el control de anetol. Cada determinación se realizó por triplicado usando la fórmula 2.2.

$$D.R. = \frac{D}{C} \quad (2.2)$$

Donde:

D.R. = densidad relativa de la muestra (g/mL)

D = peso de la muestra en gramos y

C = peso del agua en gramos medida en la calibración

II.III. Desarrollo del método con Microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME) por cromatografía de gases (GC-FID)

Para cuantificar los tres componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* seleccionados para su seguimiento en las NP, se desarrolló un método analítico de GC con HS-SPME. Brevemente, esta técnica consiste en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta por un sorbente, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura. En la figura 2.1 se muestra el esquema de la técnica de HS-SPME.

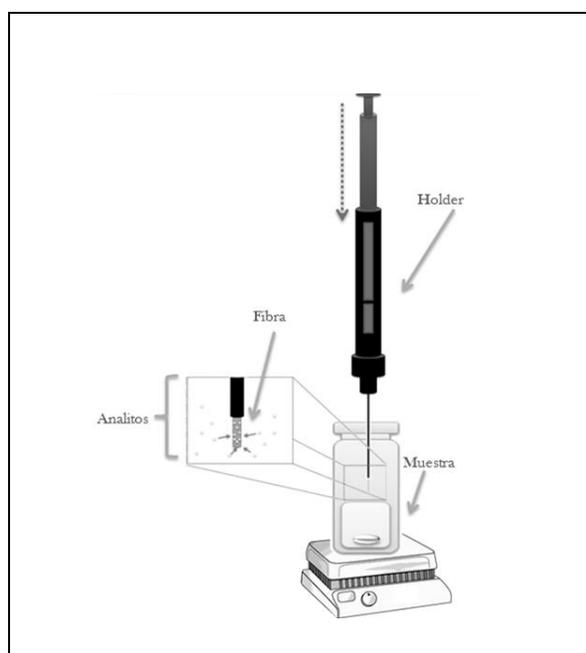


Fig.2.1. Técnica de HS-SPME utilizada para la cuantificación de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

II.III.I. Acondicionamiento de las fibras de *SPME*

Antes del uso de las fibras en los experimentos de *HS-SPME*, fue necesario acondicionarlas de acuerdo a los datos establecidos por el proveedor. En la tabla 2.1 se muestran las condiciones utilizadas para cada fibra. Se utilizó un cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL, usando como gas acarreador el helio con un flujo de 2 mL/min.

Tabla 2.1. Condiciones para el acondicionamiento de las fibras de *SPME*

Recubrimiento	Grosor (μm)	Temperatura de acondicionamiento ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo de acondicionamiento (Hrs)
PA ¹	85	280	1
CAR/PDMS ²	75	300	1
DVB/CAR/PDMS ³	50/30	270	1
PDMS ⁴	100	250	0.5

¹PA: Poliacrilato

³DVB/CAR/PDMS: Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano

²CAR/PDMS: Carboxen/Polidimetilsiloxano

⁴PDMS: Polidimetilsiloxano

II.III.II. Selección de la fibra de *SPME*

Con el fin de seleccionar la fibra que permitiera una mejor extracción de los tres componentes del aceite de *Thymus vulgaris* de manera reproducible y al mismo tiempo mantener la proporción previamente establecido, se probaron cuatro fibras de diferentes características. Para los experimentos de *HS-SPME* se utilizó una solución de estándares de los 3 componentes seleccionados y las condiciones experimentales establecidas por Rodríguez-Lafuente A. (2009) (tabla 2.2). El análisis por *GC-FID* se realizó usando el método cromatográfico previamente optimizado.

Tabla 2.2. Condiciones utilizadas en los experimentos de *HS-SPME* de acuerdo a lo reportado por Rodríguez-Lafuente A.

Parámetro	Condiciones
<i>HS</i> : muestra	1:1
Velocidad de agitación	250 rpm
Temperatura	55 °C
Tiempo de equilibrio	10 min
Extracción	10 min

II.III.III. Optimización del método de extracción por *HS-SPME*

Con la finalidad de optimizar el método de extracción por *HS-SPME*, se estableció un diseño experimental de Plackett Burman. Se plantearon 8 experimentos con la combinación ordenada de 7 variables a niveles altos y bajos. En la tabla 2.3 se representan las 7 variables con una letra mayúscula para el nivel alto y letra minúscula para el nivel bajo.

Tabla 2.3. Matriz del diseño experimental de Plackett Burman utilizada en la optimización de la extracción por *HS-SPME* del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Variables	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A*,a**	+	+	+	+	-	-	-	-
B*,b**	+	+	-	+	+	+	-	-
C*,c**	+	-	+	+	+	-	+	-
D*,d**	+	+	-	+	-	-	+	+
E*,e**	+	-	+	+	-	+	-	+
F*,f**	+	-	-	+	+	-	-	+
G*,g**	+	-	-	+	-	+	+	-
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

*Letra mayúscula: nivel alto

**Letra minúscula: nivel bajo

Signo (+) : Nivel alto

Signo (-) : Nivel bajo

Las variables a evaluar fueron: relación *HS* : Muestra ($A = 1:1.33$, $a = 1:0.85$), velocidad de agitación de muestra ($B = 350$ rpm, $b = 250$ rpm), distancia fibra-muestra ($C = 6$ mm, $c = 4$ mm), tiempo de equilibrio ($D = 20$ min, $d = 5$ min) temperatura de extracción ($E = 70^{\circ}\text{C}$, $e = 55^{\circ}\text{C}$), tiempo de extracción ($F = 20$ min, $f = 5$ min) y concentración de polímero presente en las NP ($G = 16.5$ $\mu\text{g/mL}$, $g = 11.25$ $\mu\text{g/mL}$). Todo se realizó por duplicado. Se utilizó una solución del aceite esencial de *Thymus vulgaris* a una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$ en agua (con trazas de metanol y diclorometano).

La respuesta de cada una de las variables fue el área de los picos obtenidos con el método cromatográfico previamente optimizado. Para establecer el efecto de cada variable sobre la respuesta, se obtuvieron las diferencias entre los promedios de las respuestas de los niveles bajos y los altos de cada variable. Cuanto menor sea la diferencia, menor será la influencia de esa variable sobre la respuesta.

II.IV. Validación para la cuantificación del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en NP

El método analítico para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* se validó bajo los criterios para la validación de métodos fisicoquímicos expedidos por la comisión de control analítico y ampliación de cobertura de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058, 2011). Se determinó linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión para la validación del sistema. Para finalmente validar el método, se determinó exactitud, precisión y robustez.

II.IV.I. Validación del sistema

Linealidad

La linealidad se determinó por la construcción de una curva de calibración con 5 niveles de concentraciones por triplicado. Se prepararon mezclas de los estándares seleccionados en la proporción previamente establecida. Los niveles de concentración total de los estándares fueron: 2, 3, 4, 5 y 6 $\mu\text{g/mL}$. En todos los estándares se utilizó el acetato de linalilo como estándar interno, a una concentración de 0.01 $\mu\text{g/mL}$.

Los estándares se sometieron al procedimiento de extracción previamente establecido. Con los datos obtenidos se graficó la respuesta cromatográfica (área) en función de la concentración y se realizó un análisis de regresión lineal.

Los criterios de linealidad determinados para la curva de calibración fueron:

- Coeficiente de correlación (r): para estimar la bondad con que se ajustan los puntos experimentales en una línea recta. Entre más cercano a 1 indica una mayor correlación lineal de la concentración con la respuesta cromatográfica. El coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.99 (Secretaría de Salud, CCAYAC-P-058, 2011).
- Coeficiente de determinación (r^2): es el cuadrado del coeficiente de correlación y nos indica la variación de la respuesta cromatográfica respecto

a la variación de la concentración. El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.99 (Secretaría de Salud, CCAYAC-P-058, 2011).

Límite de detección

Para determinar el límite de detección del sistema se utilizaron los valores obtenidos en la curva de calibración. La pendiente y la ordenada al origen, se obtuvieron a partir del análisis de regresión.

Primero, se estimaron los errores aleatorios en la dirección calculando el estadístico $S_{y/x}$ con la siguiente fórmula:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (2.3)$$

Donde:

\hat{y}_i = Valor de la respuesta calculada

y_i = valor de la respuesta

n = número de mediciones

Después, se determinó la desviación estándar de la ordenada al origen (S_a)

$$S_a = \frac{S_y}{\bar{x}} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.4)$$

Donde:

S_a = Desviación estándar de la ordenada al origen

\bar{x} = Media

x_i = valor de cada medición

n = número de mediciones

Para finalmente, estimar el límite de detección con la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{3.3 * Sa}{m} \quad (2.5)$$

Donde:

LD = Límite de detección

Sa = Desviación estándar de la ordenada al origen

m = Pendiente de la curva de calibración

Límite de cuantificación

Para determinar el límite de cuantificación del sistema se utilizaron los valores obtenidos en la curva de calibración. La pendiente y la ordenada al origen, se obtuvieron a partir del análisis de regresión.

Primero, se estimaron los errores aleatorios en la dirección calculando el estadístico Sy/x con la Fórmula 2.3. Después, se determinó la desviación estándar de la ordenada al origen (Sa) con la Fórmula 2.4. Para finalmente, estimar el límite de cuantificación con la siguiente fórmula:

$$LQ = \frac{10 * Sa}{m} \quad (2.6)$$

Donde:

LQ = Límite de cuantificación

Sa = Desviación estándar de la ordenada al origen

m = Pendiente de la curva de calibración

Precisión

Repetibilidad

La repetibilidad se determinó usando 3 niveles de concentraciones por sextuplicado.

Se prepararon mezclas de los estándares seleccionados en la proporción previamente establecida. Los niveles de concentración total de los estándares fueron 2, 4, y 6 $\mu\text{g/mL}$, se analizaron el mismo día y por la misma persona.

En todos los estándares se utilizó el acetato de linalilo como estándar interno, a una concentración de 0.01 $\mu\text{g/mL}$. Los estándares se sometieron al procedimiento de extracción previamente establecido.

Se calcularon los porcentajes de recuperación por medio de la ecuación de la recta obtenida en la linealidad. Posteriormente, se calculó:

Media (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (2.7)$$

Donde:

\bar{x} = Media

x = valor de cada medición

n = número de mediciones

Desviación estándar (s)

$$s = \sqrt{\sum_i \frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (2.8)$$

Donde:

s = Desviación estándar

\bar{x} = Media

x_i = valor de cada medición

n = número de mediciones

El coeficiente de variación o desviación estándar relativa (CV o DER)

$$DER = 100 s / \bar{x} \quad (2.9)$$

Donde:

DER = Desviación estándar relativa

s = Desviación estándar

\bar{x} = Media

Precisión Intermedia

La repetibilidad se determinó usando 3 niveles de concentraciones por sextuplicado.

Se prepararon mezclas de los estándares seleccionados en la proporción previamente establecida. Los niveles de concentración total de los estándares fueron 2, 4, y 6 $\mu\text{g/mL}$, se analizaron por la misma persona el mismo día, en 3 días no consecutivos.

En todos los estándares se utilizó el acetato de linalilo como estándar interno, a una concentración de 0.01 $\mu\text{g/mL}$. Los estándares se sometieron al procedimiento de extracción previamente establecido. Se calcularon los porcentajes de recuperación por medio de la ecuación de la recta obtenida en la linealidad. Posteriormente, se calculó:

la media (\bar{x}) con la Fórmula 2.7, la desviación estándar (s) con la Fórmula 2.8, y el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (CV o DER) con la Fórmula 2.9.

II.IV.II. Validación del método

Para la validación del método con *HS-SPME*, se usaron muestras (NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris*) adicionadas con estándares de los componentes del aceite esencial en la proporción previamente establecida. Se utilizaron diferentes niveles de concentración de acuerdo a cada parámetro evaluado.

Exactitud

La exactitud se determinó usando 5 niveles de concentraciones por triplicado. Se prepararon mezclas de los estándares, en la proporción previamente establecida, a los niveles de concentración total de los estándares fueron 2, 3, 4, 5 y 6 $\mu\text{g/mL}$ (en la proporción previamente establecida) y se adicionaron a la muestra. En todos los estándares se utilizó el acetato de linalilo como estándar interno, a una concentración de 0.01 $\mu\text{g/mL}$. Los estándares se sometieron al procedimiento de extracción previamente establecido.

Posteriormente, se calculó el porcentaje de recobro (%R):

$$\%R = \left(\frac{\text{Ca}-\text{CU}}{\text{CA}} \right) * 100 \quad (2.10)$$

Donde:

Ca = concentración del analito medida en la muestra adicionada

CU = concentración del analito medida en la muestra sin adicionar

CA = concentración del analito añadido

Selectividad

Se determinó la selectividad por medio del efecto que la matriz ejerce sobre las señales cromatográficas de los compuestos analizados. Para ello, se analizaron muestras del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en ausencia y en presencia de la ϵ -policaprolactona a dos concentraciones con *HS-SPME* por *GC*. Se dice que el método es selectivo para un compuesto o varios cuando su señal no se ve afectada por interferencias, en este caso fue la matriz.

Precisión

Repetibilidad

La repetibilidad se determinó usando 3 niveles de concentraciones por sextuplicado. Se prepararon mezclas de los estándares seleccionados en la proporción previamente establecida. Los niveles de concentración total de los estándares fueron 2, 4, y 6 $\mu\text{g/mL}$, los cuales fueron adicionados a la muestra. Se analizaron el mismo día y por la misma persona. En todos los estándares se utilizó el acetato de linalilo como estándar interno, a una concentración de 0.01 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras adicionadas se sometieron al procedimiento de extracción previamente establecido.

Se calcularon los porcentajes de recuperación de acuerdo a la Fórmula 2.10. Posteriormente, se calculó: la media (\bar{x}) con la Fórmula 2.7, la desviación estándar (s) con la Fórmula 2.8, y el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (CV o DER) con la Fórmula 2.9.

Precisión Intermedia

La repetibilidad se determinó usando 3 niveles de concentraciones por sextuplicado. Se prepararon mezclas de los estándares seleccionados en la proporción previamente establecida. Los niveles de concentración total de los estándares fueron 2, 4, y 6 $\mu\text{g/mL}$, los cuales se adicionaron a la muestra. Se analizaron por la misma persona el mismo día, en 3 días no consecutivos. En todos los estándares se utilizó el acetato de linalilo como estándar interno, a una concentración de 0.01 $\mu\text{g/mL}$. Los estándares se sometieron al procedimiento de extracción previamente establecido. Se calcularon los porcentajes de recuperación de acuerdo a la Fórmula 2.10. Posteriormente, se calculó: la media (\bar{x}) con la Fórmula 2.7, la desviación estándar (s) con la Fórmula 2.8, y el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (CV o DER) con la Fórmula 2.9

Robustez

Para evaluar que tan robusto era el método por HS-SPME desarrollado, se estableció un diseño experimental de Plackett Burman, planteando 8 experimentos con la combinación ordenada de 7 variables a niveles altos y bajos. En la tabla 2.4 se representan las 7 variables con una letra mayúscula para el nivel alto y letra minúscula para el nivel bajo.

Tabla.2.4. Matriz del diseño experimental de Plackett Burman utilizada para evaluar la Robustez del método con *HS-SPME* desarrollado para la cuantificación de componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Variables	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A*,a**	+	+	+	+	-	-	-	-
B*,b**	-	+	+	+	+	-	-	-
C*,c**	-	-	+	+	+	+	-	-
D*,d**	-	-	-	+	+	+	+	-
E*,e**	-	-	-	-	+	+	+	+
F*,f**	+	-	-	-	-	+	+	+
G*,g**	+	+	-	-	-	-	+	+
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

*Letra mayúscula: nivel alto

**Letra minúscula: nivel bajo

Signo (+): Nivel alto

Signo (-): Nivel bajo

Las variables a evaluar fueron: temperatura de *HS-SPME* (A= 71°C, a= 69°C), concentración de polímero (B= 12 µg/mL, b= 11 µg/mL), superficie del *HS* cubierta (C= 100%, c= 75%), volumen de muestra en el vial de 7mL (D= 3.005 mL, d= 2.995 mL), distancia de la fibra sobre la muestra (E= 7 mm, e= 5 mm) tiempo de extracción (F= 10.2 min, f= 9.4 min) y tiempo de equilibrio (G= 10.2 min, g= 9.4 min). Cada experimento se realizó por duplicado, a una concentración de 4 µg/mL de la mezcla de estándares adicionado a la muestra.

La respuesta de cada una de las variables fue el área de los picos cromatográficos obtenidos con el programa de temperatura previamente optimizado. Para establecer el efecto de cada variable sobre la respuesta, se obtuvieron las diferencias entre los promedios de los niveles bajos y los altos de cada variable. Cuanto menor sea la

diferencia, menor será la influencia de esa variable sobre la respuesta. Si cualquiera de estas diferencias entre los promedios de los subgrupos de cada variable es mayor que $2^{1/2}$ s, entonces esa variable tendrá una influencia significativa sobre el método.

II.V. Obtención, optimización y caracterización de las NP

Las NP se obtuvieron por la técnica de Nanoprecipitación. Se incorporó la fase orgánica que contenía el acetona (5 mL), la ϵ -policaprolactona (10-20 mg) y el aceite esencial de *Thymus vulgaris* (10-20 mg), a una fase acuosa (20 mL) con Tween®80 al 3% (p/p), con agitación constante (700 rpm). Una vez formadas las NP la formulación tomó un color blanco-azulado. Posteriormente, se eliminó el solvente orgánico por evaporación a presión reducida obteniendo finalmente las NP purificadas. En la figura 2.2 se muestra la técnica de nanoprecipitación utilizada en la obtención de NP.

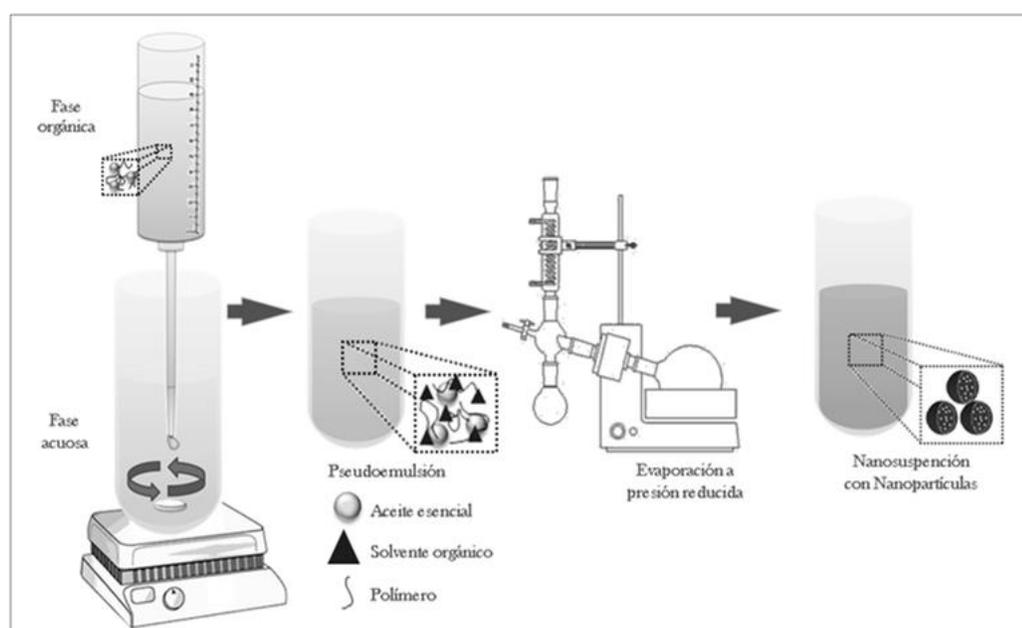


Fig.2.2. Técnica de Nanoprecipitación para la obtención de NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

II.V.I Optimización de la técnica de nanoprecipitación

Optimización de la formulación de NP

Con el fin de optimizar la técnica de nanoprecipitación para la obtención de NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, se modificaron dos variables en las formulaciones: la cantidad de aceite esencial de *Thymus vulgaris* (10, 15 y 20 mg) con 15 mg de ϵ -policaprolactona, y la cantidad de ϵ -policaprolactona (10, 15 y 20 mg) con 15 mg de aceite esencial. Para seleccionar la mejor formulación de NP se evaluó el tamaño de partícula y su variabilidad (desviación estándar).

Técnicas de purificación para la eliminación del solvente

Originalmente después de obtener las NP, la acetona se elimina utilizando la evaporación a presión reducida. Sin embargo al tratarse de la encapsulación de un aceite esencial con componentes volátiles, se evaluó la diálisis como una técnica alternativa para eliminar acetona. Para ambos métodos se realizó un seguimiento de la acetona presente en las formulaciones de NP durante el proceso de purificación.

Para la purificación por evaporación a presión reducida, la formulación de NP se colocó en un matraz bola en un rotavapor Laborota. Se mantuvo a 37°C con una presión de 600 psi. El seguimiento de la acetona se realizó cada minuto durando 10 minutos.

En el caso de la purificación por diálisis, se utilizó una membrana de celulosa regenerada. La formulación de NP se colocó y se dejó en agitación a 25°C. El

seguimiento de la acetona se realizó cada hora. Para cuantificar la acetona presente en las formulaciones de NP, fue necesario desarrollar un método por *GC-FID*.

II.V.II. Caracterización de NP

Tamaño de partícula y potencial Z

A las NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* se les midió el tamaño y el potencial Z por espectroscopia de correlación fotónica con un Nanosizer Malvern de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL).

Estabilidad

Las formulaciones de NP se colocaron en frascos ámbar a 25 °C protegido de la luz durante 2 meses. Se determinó el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad cada 15 días. Además, se evaluó la apariencia física de las formulaciones de NP verificando la ausencia de agregados y sedimentos.

Contenido de aceite esencial de *Thymus vulgaris* en NP

Las NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* se centrifugaron a 25,000 rpm durante 2 horas en una Ultracentrífuga Allegra™, obteniendo una pastilla y un sobrenadante. La pastilla se disolvió en 100 µL de acetona y se diluyó en agua analizándola por el método validado con *HS-SPME* por *GC*. El sobrenadante también fue analizado por el método validado con *HS-SPME* por *GC*.

Posteriormente se calcularon los porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación con las siguientes fórmulas:

$$\%E = \left(\frac{A_t - A_n}{P + A_t} \right) * 100 \quad 2.11$$

Donde:

%E = Porcentaje de encapsulación

A_t = Gramos de aceite esencial total

A_n = Gramos de aceite esencial no encapsulado

P = Gramos de polímero

$$\%EE = \left(\frac{A_t - A_n}{A_t} \right) * 100 \quad 2.12$$

Donde:

%EE = Porcentaje de la eficiencia de encapsulación

A_t = Gramos de aceite esencial total

A_n = Gramos de aceite esencial no encapsulado

II.VI. Obtención de una Nanoemulsión del aceite esencial de *Thymus vulgaris*

Con el fin de comparar la estabilidad de las NP con una formulación sin la influencia de polímero, se preparó una nanoemulsión (NE) adicionando 15 mg de aceite esencial de *Thymus vulgaris* a 20 mL de Tween 80® al 3% (p/v) con agitación de 700 rpm. Se determinó su tamaño y potencial Z por espectroscopía de correlación fotónica. Posteriormente, se determinó su estabilidad, manteniéndola protegida de la luz a temperatura ambiente, durante 2 meses. Se evaluó el tamaño de partícula e índice de polidispersidad.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

II.II. Obtención y caracterización química y física del aceite esencial de *Thymus vulgaris*

La obtención del aceite esencial de *Thymus vulgaris* se realizó por hidrodestilación en un equipo Clavenger modificado.

Se obtuvieron 3.3 g del aceite esencial, lo cual representa un porcentaje de rendimiento del 0.52% (p/p).

Para obtener una mejor separación de las señales cromatográficas del aceite esencial de *Thymus vulgaris* se optimizó un método de *GC-FID* por inyección directa. En la tabla 3.1 se muestran los diferentes programas de temperatura probados.

En base a la resolución de los picos cromatográficos, se estableció el programa 9 como el mejor programa de temperatura. De forma paralela, se detectaron e identificaron 17 componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* por CG-MS.

Tabla.3.1 Optimización del programa de temperatura por *CG-FID* (inyección directa) para la caracterización química del aceite esencial de *Thymus vulgaris*

Programa de temperatura	Condiciones
1	Inició a 50 °C, se aumentó a 120 °C (a 6 °C/min) se mantuvo 1 min, se elevó a 280 °C (a 25 °C/min) se mantuvo 1 min.
2	Inició a 50 °C, se aumentó a 116 °C (6 °C/min) se mantuvo 1 min, se elevó a 125 °C (3 °C/min) se mantuvo 1min, se elevó a 280 °C (30 °C/min) se mantuvo 1 min.
3	Inició a 50 °C, se aumentó a 116 °C (6 °C/min) se mantuvo 3 min, se elevó a 125 °C (3 °C/min) se mantuvo 1 min, se elevó a 280 °C (30 °C/min) se mantuvo 1 min.
4	Inició a 50 °C, se aumentó a 120 °C (6 °C/min) se mantuvo 6 min, se elevó a 280 °C (28 °C/min) se mantuvo 1 min.
5	Inició a 50 °C, se aumentó a 116 °C (6 °C/min) se mantuvo 6min, se elevó a 125 °C (3 °C/min) se mantuvo 1min, se elevó a 280 °C (35 °C/min) se mantuvo 1 min.
6	Inició a 50 °C, se aumentó a 116°C (6°C/min) se mantuvo 3 min, se elevó a 120 °C (1 °C/min) se mantuvo 1 min, se elevó a 280 °C (45 °C/min) se mantuvo 1 min.
7	Inició a 50 °C, se aumentó a 116 °C (6 °C/min), se elevó a 120 °C (1 °C/min), se elevó a 280 °C (45 °C/min) se mantuvo 1 min.
8	Inició a 50 °C, se aumentó a 117 °C (6 °C/min) se mantuvo 1 min, se elevó a 119 °C (0.5 °C/min), se elevó a 280 °C (45 °C/min) se mantuvo 1 min.
9	Inició a 50 °C, se aumentó a 117 °C (6 °C/min) se mantuvo 3 min, se elevó a 119 °C (0.5 °C/min), se elevó a 280 °C (45 °C/min) se mantuvo 1 min.

A partir del cromatograma del aceite obtenido por *GC-FID* se determinaron las áreas de 17 picos cromatográficos de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (Figura 3.1).

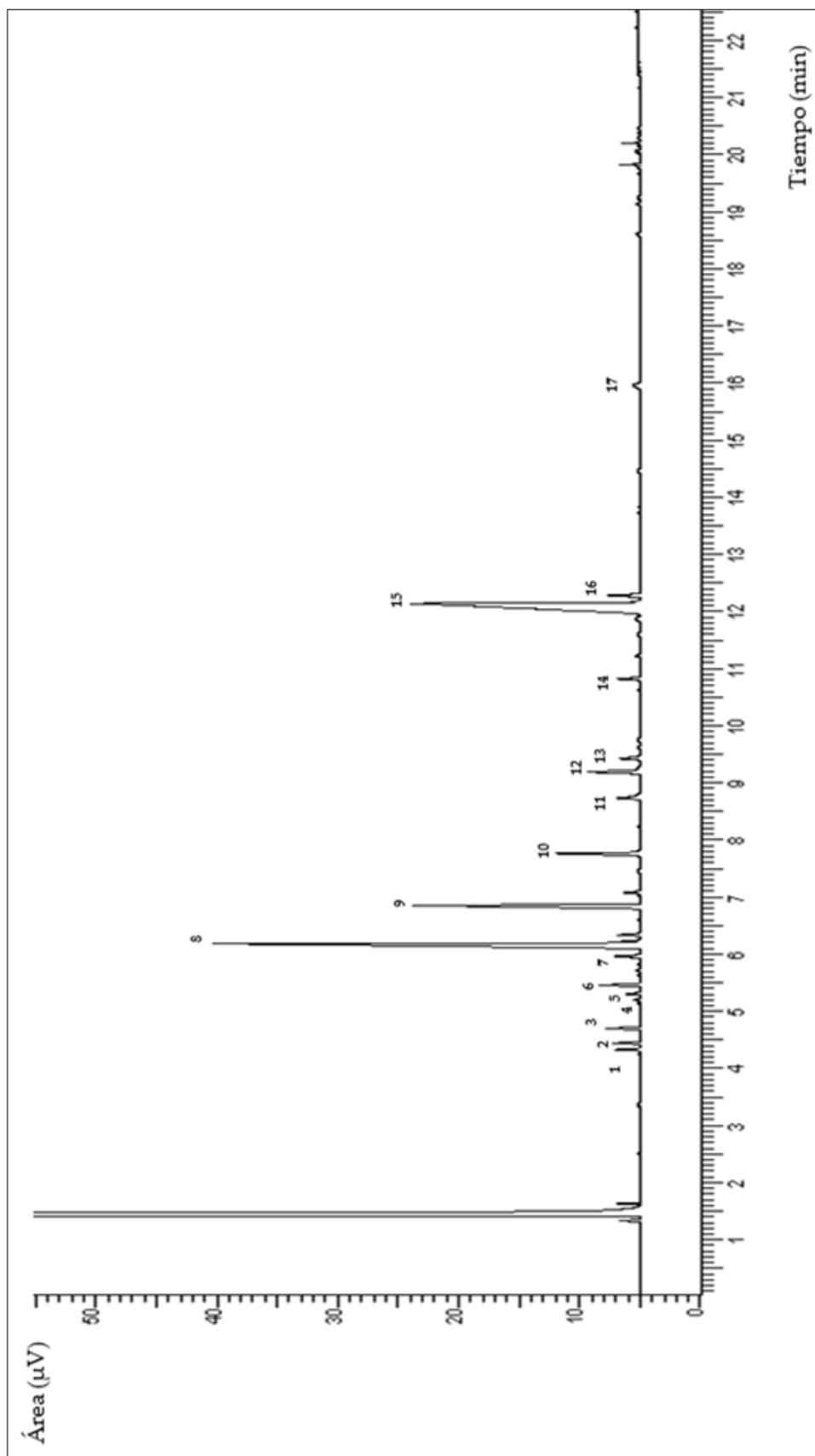


Figura 3.1 Cromatograma de una solución del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (20 mg/mL) en diclorometano con el programa de temperatura 9 por GC-FID. Los componentes son: α - tujeno (1), α - pineno (2), camfeno (3), sabineno (4), 3- octenol (5), mirceno (6), α - terpineno (7), o - cimenol (8), γ -terpineno (9), linalool (10), borneol (11), borneol (12), 4- terpinenol (13), carvacrol metil éter (14), timol (15), carvacrol (16), ϵ -cariofileno (17).

Posteriormente, se calculó el contenido porcentual de cada uno de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (Tabla 3.2). Los componentes mayoritarios fueron timol, o-cimeno y γ -terpineno, con un 34%, 32% y 13% respectivamente. Así también, se determinó que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* está compuesto en su mayoría por monoterpenos alifáticos (51.81%), monoterpenos oxigenados (47.61%) y sesquiterpenos alifáticos (0.85%). En la tabla 3.2 se presenta el contenido porcentual y el tipo de compuesto del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Tabla 3.2 Componentes identificados del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, contenido porcentual y tipo de compuesto por GC-MS y GC-FID.

#	Compuesto	Contenido porcentual (%)	Tipo de compuesto
1	α - tujeno	0.99	Monoterpeno alifático
2	α - pineno	1.07	Monoterpeno alifático
3	camfeno	1.45	Monoterpeno alifático
4	sabineno	0.24	Monoterpeno alifático
5	3- octenol	0.57	Alcohol
6	mirceno	1.75	Monoterpeno alifático
7	α - terpineno	1.32	Monoterpeno alifático
8	o- cimeno	31.78	Monoterpeno alifático
9	γ -terpineno	13.22	Monoterpeno alifático
10	linalool	4.40	Monoterpeno oxigenado
11	Camfor	1.67	Monoterpeno oxigenado
12	borneol	3.12	Monoterpeno oxigenado
13	4- terpinenol	1.14	Monoterpeno oxigenado
14	carvacrol metil éter	1.04	Monoterpeno oxigenado
15	Timol	34.28	Monoterpeno oxigenado
16	carvacrol	1.97	Monoterpeno oxigenado
17	ϵ -cariofileno	0.86	Sesquiterpeno alifático

Para el seguimiento del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en las formulaciones de NP, se eligieron el γ -terpineno, el timol y el carvacrol. En base al área de las señales cromatográficas de los 3 compuestos, se estableció que el γ -terpineno, el timol y el carvacrol están en una proporción de 26:70:4, respectivamente.

Para seleccionar el estándar interno se analizaron seis terpenos con el programa 9 (Tabla 3.1) en la figura 3.2 se presenta el cromatograma de los cinco compuestos. En base al tiempo de retención y a la resolución se seleccionó el acetato de linalilo como estándar interno.

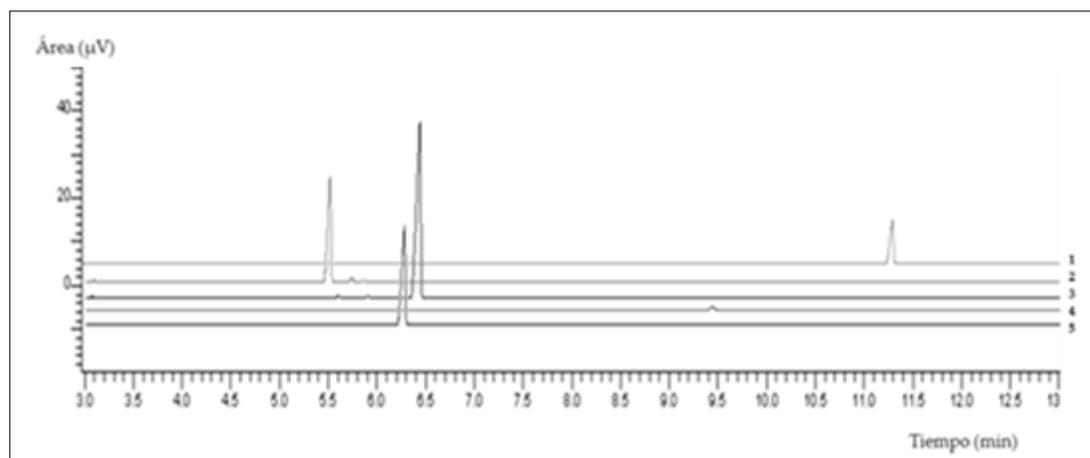


Fig. 3.2 Cromatograma de los compuestos probados para la elección del estándar interno en diclorometano (1 mg/mL). Compuestos: acetato de linalilo (1), mircenno (2), eucaliptol (3), mentol (4), y limoneno (5).

La caracterización física del aceite esencial de *Thymus vulgaris* se realizó de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Se determinó el índice de refracción, la actividad óptica y la densidad relativa.

En base a las características fisicoquímicas del anetol descritas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, se estableció como control de las determinaciones físicas. En la tabla 3.3 se muestran los valores obtenidos en la caracterización física del anetol (control) y el aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Tabla 3.3 Caracterización física del aceite esencial de *Thymus vulgaris* y del anetol según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Prueba	Anetol ^a	Anetol ^b	Aceite esencial ^b
Rotación Óptica ($\bar{x} \pm s$; n=6)	-0.15 ° y +0.15 °	+0.15 ° \pm 6.32x10 ⁻⁰⁴	-0.084 \pm 5.16x10 ⁻⁰⁴
Densidad Relativa ($\bar{x} \pm s$; n=3)	0.983 - 0.988 g/cm ³	0.988 \pm 5.02x10 ⁻⁰⁴ g/cm ³	0.934 \pm 9.98x10 ⁻⁰⁵ g/cm ³
Índice de Refracción ($\bar{x} \pm s$; n=3)	1.557 y 1.561	1.561 \pm 4x10 ⁻⁰³	1.559 \pm 4x10 ⁻⁰³

^a Valores establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

^b Valores obtenidos experimentalmente.

III.III. Desarrollo del método con Microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME) por cromatografía de gases (GC-FID)

Para cuantificar el γ -terpineno, el timol y el carvacrol en las formulaciones de NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, se desarrolló un método analítico de GC con HS-SPME. Con el fin de seleccionar la fibra que permitiera por un lado, la mejor extracción de los tres componentes seleccionados de manera reproducible y, por el otro lado mantener su proporción (26:70:4), se probaron cuatro fibras con características diferentes. En la Figura 3.3 se muestran los cromatogramas obtenidos al analizar la solución de estándares a una concentración total de 10 μ g/mL con las cuatro

fibras utilizando las condiciones de *SPME* mostradas en la Tabla 2.2 y con el método cromatográfico establecido previamente.

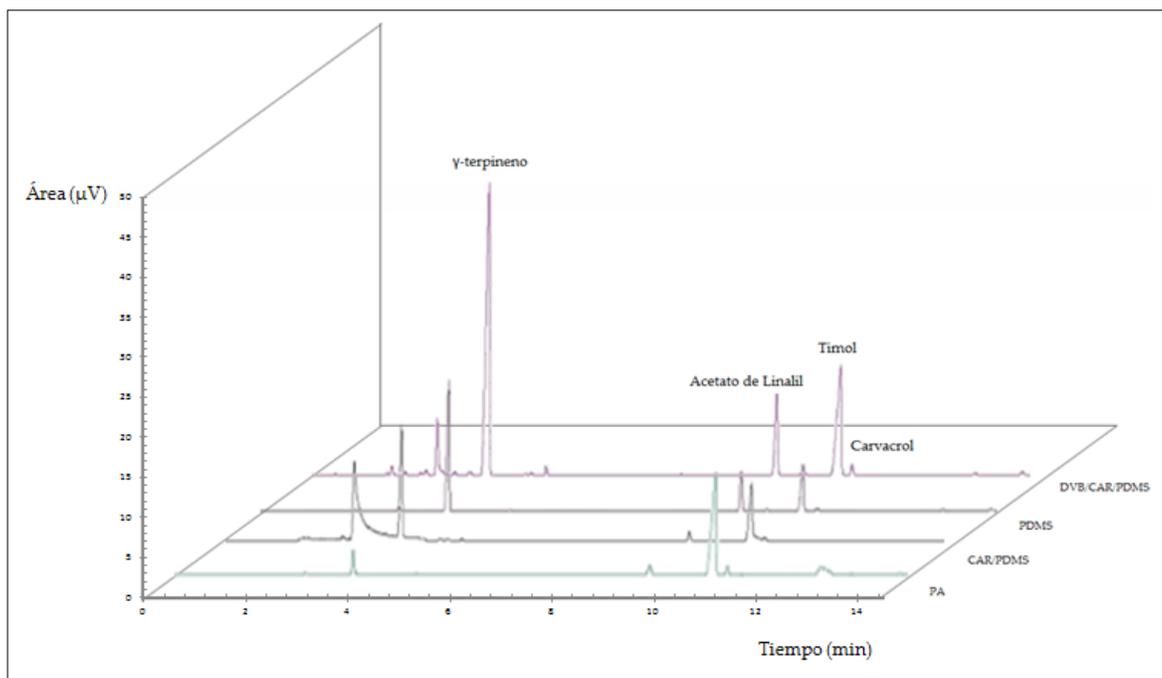


Fig. 3.3 Cromatogramas de los estándares a una concentración total de 10 µg/mL con las cuatro fibras de *SPME* por *GC-FID*.

Con la finalidad de determinar la variabilidad de la extracción de las fibras, se obtuvieron las áreas de los picos cromatográficos de cada estándar con las cuatro fibras. En la Figura 3.4 se muestran las áreas del γ -terpineno, timol y carvacrol obtenidas con las cuatro fibras con *HS-SPME* por *GC-FID*.

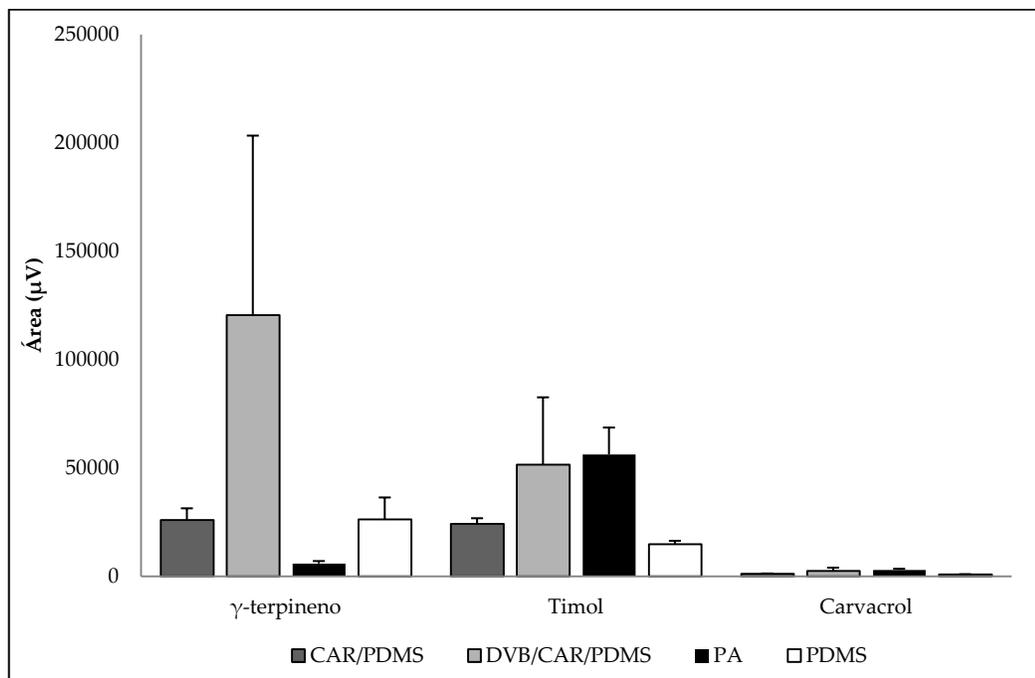


Fig.3.4 Comparación de las áreas de los tres estándares (concentración total de 10 $\mu\text{g/mL}$) obtenidas con las fibras de SPME evaluadas por GC-FID ($\bar{x} \pm s$; n=3).

En base a la mejor extracción de los 3 componentes con la menor variabilidad en los resultados, se seleccionó la fibra de poliacrilato (PA) como fibra de extracción para los experimentos con el aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Con la finalidad de optimizar el método de extracción por HS-SPME, se estableció un diseño experimental de Plackett Burman. En la Tabla 3.4 se representan las 7 variables en sus niveles altos y bajos.

Tabla 3.4 Variables evaluadas en sus niveles altos y bajos para la optimización del método de extracción con la fibra de PA para la HS-SPME

Variable	Nivel bajo	Nivel alto
HS:Muestra	1:0.85	1:1.33
Velocidad de agitación	250 rpm	350 rpm
Distancia fibra-muestra	4 mm	6 mm
Tiempo de equilibrio	5 min	20 min
Temperatura de extracción	55 °C	70 °C
Tiempo de extracción	5 min	20 min
Concentración de polímero (NP blanco)	11.25 µg/mL	16.5 µg/mL

La respuesta de cada una de las variables fue el área de los picos cromatográficos obtenidos con el método cromatográfico optimizado previamente. Para establecer el efecto de cada variable sobre la respuesta, se obtuvieron las diferencias entre los promedios de los niveles bajos y los altos de cada variable y se representan en la figura 3.5.

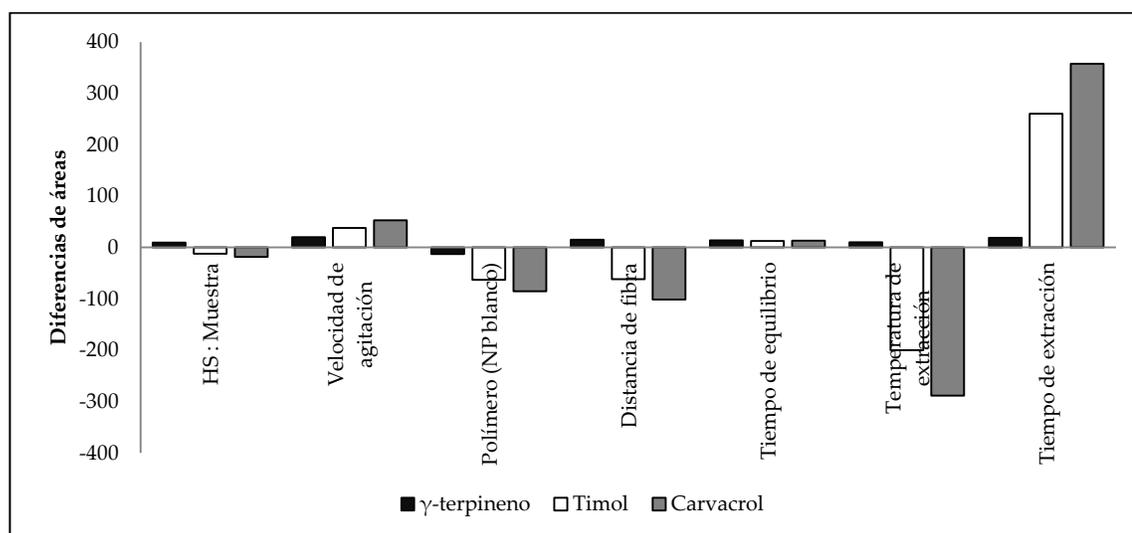


Fig 3.5. Diferencias de áreas entre los niveles altos y bajos de las variables en la optimización de la técnica de HS-SPME con aceite esencial de *Thymus vulgaris* (10 µg/mL) y la fibra de poliacrilato (n= 2). NP blanco = NP sin aceite esencial.

Considerando que cuanto menor sea la diferencia, menor será la influencia de esa variable sobre la respuesta; las condiciones óptimas en la extracción del γ -terpineno, timol y carvacrol a partir del aceite esencial de *Thymus vulgaris* con HP-SPME se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Condiciones de extracción óptimas para la extracción de γ -terpineno, timol y carvacrol a partir del aceite esencial de *Thymus vulgaris* con HS-SPME por CG.

Variable	Condición óptima
HS : Muestra	1 : 1.33
Velocidad de agitación	250 rpm
Distancia fibra-muestra	6 mm
Tiempo de equilibrio	10 min
Temperatura de extracción	70°C
Tiempo de extracción	10 min
Concentración de polímero	11.25 $\mu\text{g/mL}$

III.IV. Validación para la cuantificación del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en NP

El método analítico para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* se validó bajo los criterios de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058).

Para validar el sistema se determinó linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión (repetibilidad y precisión intermedia). En la tabla 3.6 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros evaluados.

Tabla 3.6 Valores obtenidos de los parámetros evaluados en la validación del sistema para la cuantificación de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* con *HS-SPME* por *GC-FID*

Parámetro de validación	γ -terpineno	Timol	Carvacrol	Referencia
Linealidad	0.98	0.99	0.99	$r \geq 0.99^*$
L.D.	0.69ppm	0.40ppm	0.39ppm	--
L.Q.	2.11ppm	1.22ppm	1.20ppm	$L \leq$ nivel inferior estimado en la linealidad*
Repetibilidad (D.E.R.)	20.23%	4.18%	4.42%	DER<15%**
Precisión intermedia (D.E.R.)	16.16%	5.36%	5.22%	

*Secretaría de Salud, CCAYAC-P-058, 2011

** Jimenez C., et al., 2002

Para la validación del método con *HS-SPME*, se usaron muestras (NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris*) adicionadas con estándares de γ -terpineno, timol y carvacrol en una proporción de 26:70:4.

Se determinó exactitud, selectividad, precisión y robustez, de acuerdo a la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058). En la tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros evaluados para la validación del método.

Tabla 3.7 Valores obtenidos de los parámetros evaluados en la validación del método para la cuantificación de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* con HS-SPME por GC-FID.

Parámetro de validación		γ -terpineno	Timol	Carvacrol	Referencia
Exactitud (%R)		99.35	109.40	98.84	70-110% ^a
Repetibilidad (D.E.R.)		7.02	10.33	8.60	DER<15% ^b
Precisión intermedia (D.E.R.)		10.60	10.60	10.99	
Selectividad		El método es selectivo para los componentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>			Depende de la exactitud
Robustez	Temperatura de HS-SPME	Si	Si	Si	Diferencias entre niveles altos y bajos ^c
	Concentración de polímero	No	No	Si	
	Superficie del HS cubierta	Si	Si	Si	
	Volumen de muestra en un vial de 7mL	No	No	Si	
	Distancia de la fibra sobre la muestra	Si	Si	Si	
	Tiempo de extracción	No	No	Si	
	Tiempo de equilibrio	Si	Si	Si	

^a AOAC, 2002

^b Jimenez C., et al., 2002

^c Los valores y las diferencias de las áreas se encuentran en el Anexo A

^d Si = afecta significativamente

^e No = no afecta significativamente

III.V. Obtención, optimización y caracterización de las NP

Con el fin de optimizar la obtención de NP por la técnica de nanoprecipitación se modificaron dos variables:

- a) Cantidad de polímero (ϵ -policaprolactona) en la fase orgánica. Los resultados obtenidos se observan en la figura 3.6.

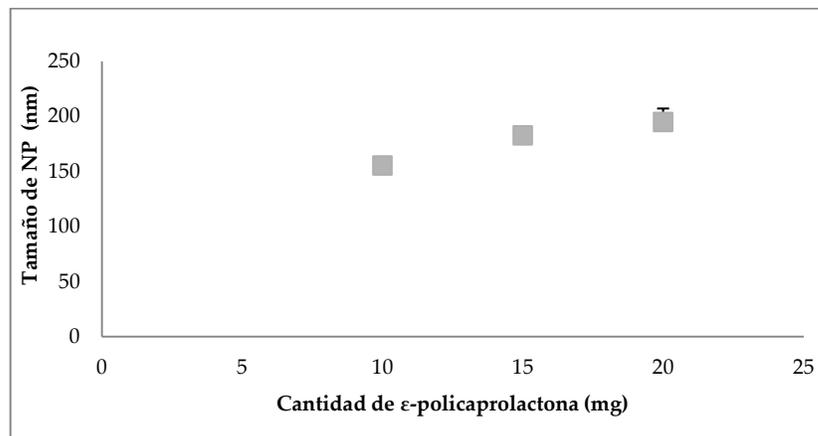


Fig.3.6 Efecto de la cantidad de polímero sobre el tamaño de las nanopartículas preparadas por nanoprecipitación (Fase orgánica: 5 mL de acetona, X mg de poli ϵ -caprolactona; Fase acuosa: 20 mL de Tween 80® al 3% (p/v) ($\bar{x} \pm s$; n=3).

- b) Cantidad de aceite esencial de *Thymus vulgaris* en la fase orgánica. Los resultados obtenidos se observan en la figura 3.7.

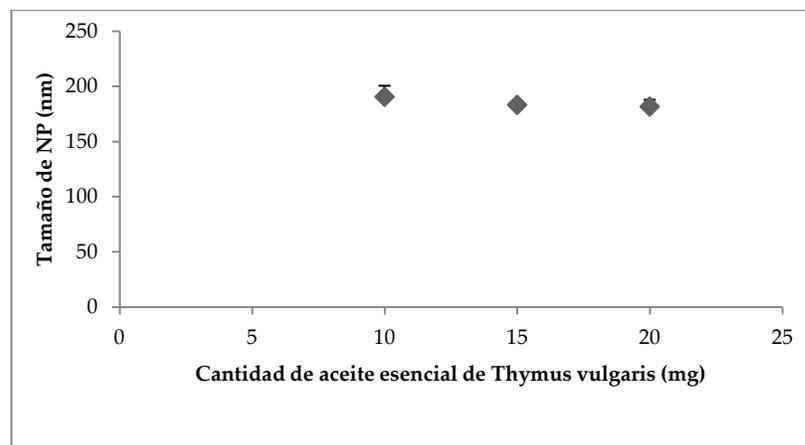


Fig.3.7 Efecto de la cantidad de aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre el tamaño de las nanopartículas preparadas por nanoprecipitación (Fase orgánica: 5 mL de acetona, 15 mg de poli ϵ -caprolactona, X mg de aceite esencial de *Thymus vulgaris* ; Fase acuosa: 20 mL de Tween 80® al 3% (p/v) ($\bar{x} \pm s$; n=3).

La formulación de NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* que presentó mejor rendimiento de NP (ausencia de polímero precipitado y de aceite esencial libre en la superficie) y menor variación fue aquella con 15 mg de ϵ -policaprolactona y 15 mg de aceite esencial de *Thymus vulgaris*. Las NP presentaron un tamaño de partícula de 183 ± 2.5 nm y un índice de polidispersidad de 0.142 ± 0.02 .

Después de obtener las NP fue necesario eliminar la acetona de las formulaciones. Se evaluaron dos técnicas de purificación: la evaporación a presión reducida y la diálisis. Para ambos métodos se realizó un seguimiento de la pérdida de acetona presente en las formulaciones de NP. Las formulaciones de NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por las dos técnicas y la nanoemulsión fueron caracterizadas. En la tabla 3.8 se muestran el tamaño de partícula y potencial Z de las NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas y de la nanoemulsión, obtenidos por espectroscopia de correlación fotónica.

Tabla 3.8 Valores obtenidos del tamaño de partícula y potencial Z de nanopartículas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas y de la nanoemulsión ($\bar{x} \pm s$; n=3).

Formulación	Tamaño de NP (nm)	Potencial Z
NP epr ^a	143.53 ± 9.4	-4.99 ± 0.26
NP d ^b	117.23 ± 0.4	-8.69 ± 1.45
NE ^c	130.8 ± 12.06	-8.78 ± 0.61

^a NP epr: nanopartículas poliméricas purificadas por evaporación a presión reducida

^b NP d: nanopartículas poliméricas purificadas por diálisis

^c NE: nanoemulsión

La estabilidad de las formulaciones de NP con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por evaporación a presión reducida y por diálisis se determinó midiendo el tamaño de partícula (Figura 3.8), el índice de polidispersidad (Figura 3.9) y la apariencia física de la formulación durante 2 meses.

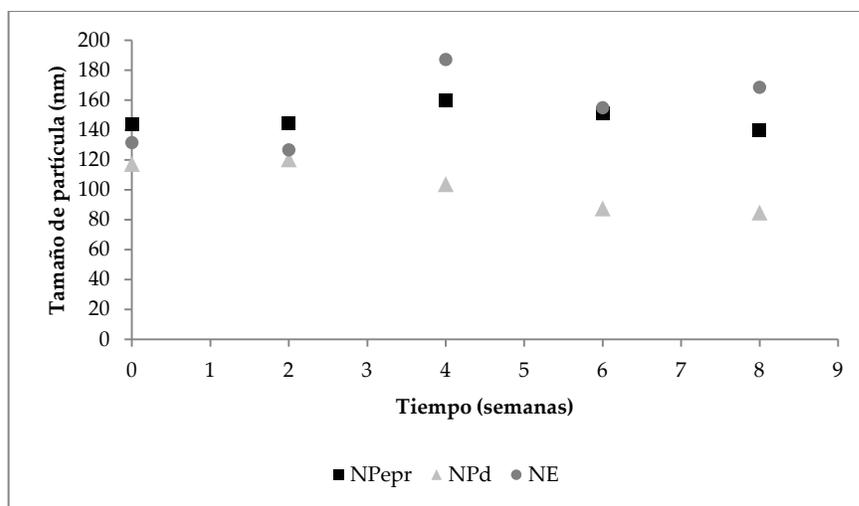


Fig.3.8 Evaluación del tamaño de partícula con aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por evaporación a presión reducida (NPepr), por diálisis (NPd) y la nanoemulsión (NE) durante 8 semanas. ($\bar{x} \pm s$; n=3).

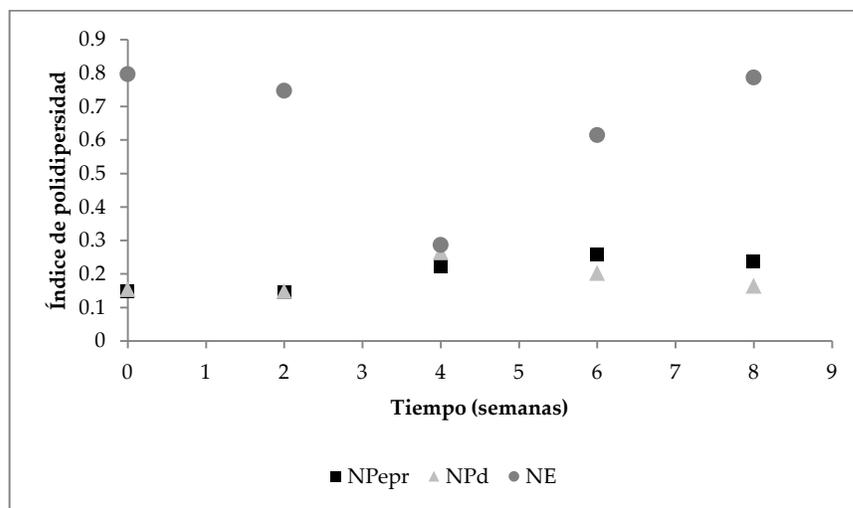


Fig.3.9 Evaluación del índice de polidispersidad de la formulación de NP con aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por evaporación a presión reducida (NPepr), por diálisis (NPd) y la nanoemulsión (NE) durante 8 semanas. ($\bar{x} \pm s$; n=3).

En la figura 3.10 se presentan las curvas de distribución del tamaño de las NP con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por evaporación a presión reducida obtenidas inicialmente y después de dos meses.

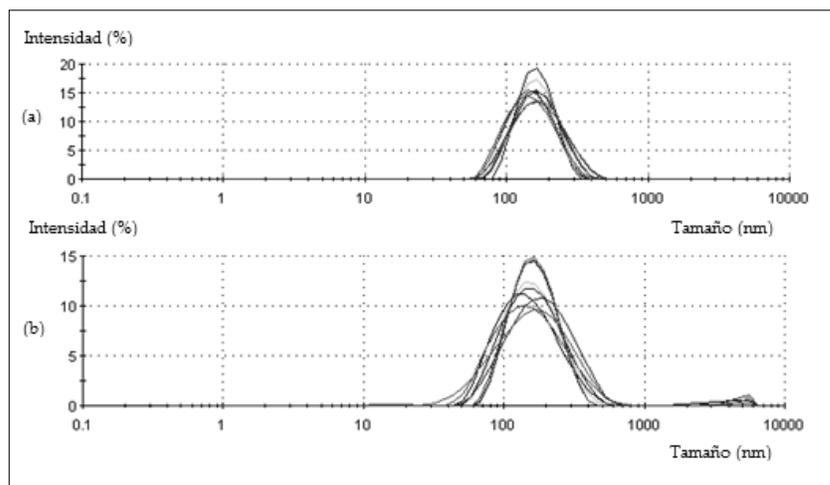


Fig. 3.10 Curvas de distribución de tamaño de nanopartículas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por evaporación a presión reducida. (a) a 0 meses, (b) después de 2 meses.

En la figura 3.11 se presentan las curvas de distribución del tamaño de las NP con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por diálisis obtenidas inicialmente y después de dos meses.

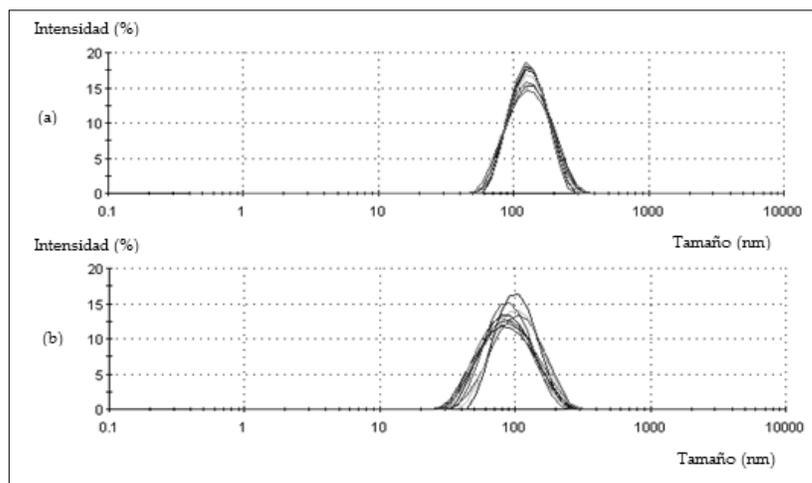


Fig. 3.11 Curvas de distribución de tamaño de nanopartículas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por diálisis. (a) a 0 meses, (b) después de 2 meses.

En la figura 3.12 se presentan las curvas de distribución del tamaño de partícula de la nanoemulsión obtenidas inicialmente y después de dos meses.

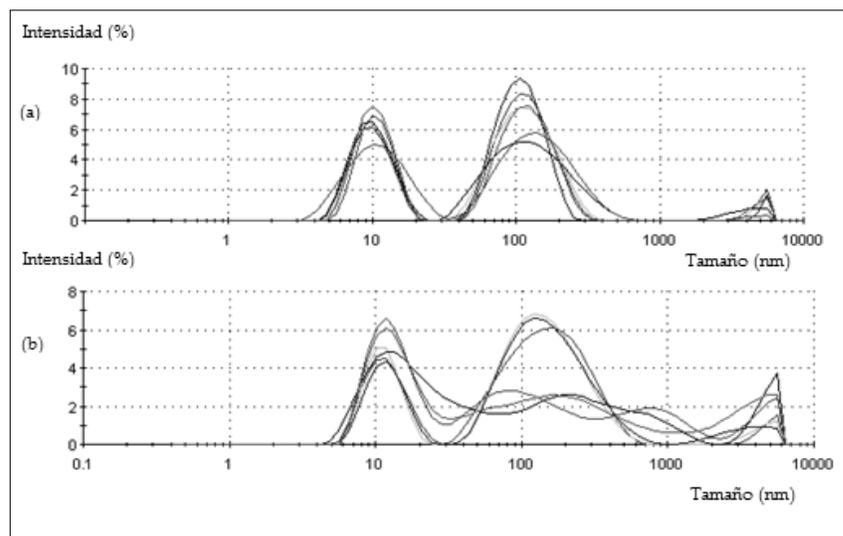


Fig. 3.12 Curvas de distribución de tamaño de partícula de la nanoemulsión con aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por evaporación a presión reducida. (a) a 0 meses, (b) después de 2 meses.

Respecto a la apariencia física, ninguna de las formulaciones presentó agregados, precipitados y/o sedimentos durante los dos meses.

En la tabla 3.9 se muestran los porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación para las NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por evaporación a presión reducida y por diálisis.

Tabla 3.9 Porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en las formulaciones de nanopartículas poliméricas purificadas por evaporación a presión reducida y por diálisis. ($\bar{x} \pm s$; n=3).

Formulación	%Encapsulación			%Eficiencia de encapsulación		
	<i>γ-terpineno</i>	<i>Timol</i>	<i>Carvacrol</i>	<i>γ-terpineno</i>	<i>Timol</i>	<i>Carvacrol</i>
NP epr ^a	20.48 \pm 0.01	39.92 \pm 0.38	3.26 \pm 0.32	25.80 \pm 0.01	67.87 \pm 0.65	3.40 \pm 0.33
NP d ^b	20.51 \pm 0.37	39.73 \pm 0.16	3.36 \pm 0.01	25.85 \pm 0.47	67.55 \pm 0.28	3.49 \pm 0.01

^a NP epr- nanopartículas poliméricas purificadas por evaporación a presión reducida

^b NP d- nanopartículas poliméricas purificadas por diálisis

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

IV.I. Obtención y caracterización química y física del aceite esencial de *Thymus vulgaris*

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* se obtuvo por hidrodestilación a partir de la planta seca. El porcentaje de recuperación del aceite fue del 0.52%, lo cual concuerda con lo reportado por Domínguez X. (1985) donde se menciona que la obtención de los aceites esenciales a partir de plantas puede variar de milésimas hasta 1%.

Para la caracterización química, se partió del método de *GC-FID* previamente utilizado para el análisis del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (Guerra-Boone L., 2011). Con el fin de mejorar la resolución de los picos cromatográficos, se plantearon las modificaciones establecidas en la Tabla 3.1. Se analizaron los cromatogramas y se seleccionó el programa 9 de dicha tabla ya que permitió que todos los componentes aparecieran con tiempos de retención diferentes y no solapados (Figura 3.1).

Una vez obtenido el cromatograma del aceite esencial de *Thymus vulgaris* por *GC-FID* (inyección directa), se comparó con el cromatograma obtenido por *GC-MS*. En esta

etapa, la identificación de los componentes se llevó a cabo en base a la biblioteca NIST, al índice de Kovats, al índice aritmético y a los datos de referencia (Adams R., *et al.*, 2001).

En el cromatograma de la figura 3.1 se muestran los 17 compuestos identificados. La composición del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (Tabla 3.2), concuerda con lo reportado por Guerra-Boone L. (2011). Posteriormente, se calcularon las áreas totales y el contenido porcentual de cada uno de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, observando que el timol, el o-cimeno y el γ -terpineno fueron los componentes mayoritarios con un contenido porcentual del 34%, 31% y 13%, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportado para el *Thymus vulgaris* de Turquía, donde encontraron que el componente mayoritario fue el timol (Özcan, *et al.*, 2004).

Sin embargo, en estudios previos se menciona a otros compuestos como los mayoritarios. Tal es el caso de lo reportado por Guerra-Boone L. (2011) donde se menciona al o-cimeno como componente mayoritario o lo reportado para el *Thymus vulgaris* de Marruecos, en el cual se encontró que el componente mayoritario fue el alcanfor (Imelouane B., *et al.*, 2009). Esta diferencia puede ser atribuida al año de la colecta, a la región y/o al clima donde crece la planta (Domínguez X., 1985).

Así también, se determinó que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* está compuesto en su mayoría por monoterpenos alifáticos (51.81%), monoterpenos oxigenados (47.61%) y

sesquiterpenos alifáticos (0.85%). A los monoterpenos alifáticos y oxigenados presentes en el aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i.e timol y carvacrol), se les han conferido propiedades antimicrobianas (Imelouane B., *et al.*, 2009), antifúngica (Bhaskara-Reddy M.V., *et al.*, 1998) y antioxidante (Seung-Joo L., *et al.*, 2004).

Se eligió el γ -terpineno, el timol y el carvacrol como analitos para ser monitoreados en las formulaciones de NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, en base a su contenido porcentual y actividad biológica. Cabe mencionar que, a pesar de que el o-cimeno fue uno de los componentes mayoritarios, no se eligió debido a su elevada volatilidad. Dicha característica podría acarrear una mayor variabilidad en los ensayos con la HS-SPME.

Con la finalidad de seleccionar un compuesto como estándar interno, se evaluaron 5 terpenos con el método cromatográfico de GC establecido previamente. De acuerdo al cromatograma de la Figura 3.2, se estableció al acetato de linalilo como estándar interno debido a que su tiempo de retención fue diferente a los 17 componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, y no causó interferencia durante el análisis.

Con el propósito de realizar la caracterización física del aceite esencial de *Thymus vulgaris* se evaluó el índice de refracción, la densidad relativa y la actividad óptica. Estos parámetros son importantes en la caracterización de los aceites esenciales ya que brindan información respecto al tipo de moléculas que lo componen (Domínguez X.

1985). Además, el índice de refracción y la rotación óptica son parámetros indispensables en las fichas de control de calidad de los aceites esenciales comerciales (Biolandes P00628117000).

Previo a la caracterización física del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, se seleccionó al anetol como control de acuerdo a: su similitud fisicoquímica (i.e solubilidad, volatilidad) con los componentes del aceite esencial y a que sus propiedades físicas y químicas ya estaban reportadas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2010). En la tabla 3.3, se observa que los valores obtenidos experimentalmente para el anetol son muy cercanos a los reportados en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Esta concordancia permitió caracterizar al aceite esencial de *Thymus vulgaris* de forma confiable.

Domínguez X. (1985) reportó que un índice de refracción mayor a 1.47 y una densidad relativa mayor a 0.9, indica que el aceite esencial contiene compuestos alifáticos y/o aromáticos oxigenados. En la tabla 3.3, se presentan los valores obtenidos en la caracterización física del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, donde se observa un índice de refracción de $1.559 \pm 4 \times 10^{-03}$ y una densidad relativa de $0.934 \pm 9.9 \times 10^{-05}$ g/cm³. Estos valores coinciden con lo esperado según la tabla 3.2, donde se muestra que más del 99% de los compuestos del aceite esencial son monoterpenos (oxigenados y alifáticos) y sesquiterpenos alifáticos.

Sin embargo, el valor del índice de refracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* de este estudio difiere al reportado por Damiani N. y cols. (2009) para el aceite esencial de *Thymus vulgaris* argentino (índice de refracción de 1.496), esta diferencia puede ser atribuida al origen geográfico de la planta.

Por otra parte, Soto E.A. y cols. (2006) reportaron una densidad relativa de 0.939 para el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, cuyos componentes principales fueron el borneol y el timol, valor muy cercano al obtenido en este estudio (0.934).

A pesar de que Domínguez X. (1985) mencionó que la rotación óptica no brinda mucha información acerca de los componentes de los aceites esenciales, actualmente, es una evaluación indispensable en el control de calidad para aceites esenciales en el área industrial (Biolandes).

IV.II. Desarrollo del método de Microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME) por cromatografía de gases (GC-FID)

Con el propósito de cuantificar el γ -terpineno, el timol y el carvacrol del aceite esencial de *Thymus vulgaris* encapsulado en las formulaciones de NP, se optimizó y validó un método de HS-SPME por GC. Se seleccionó el modo de *headspace* (HS) debido a la alta selectividad que presenta esta técnica para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles como es el caso de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Además, como la fibra no tiene contacto directo con las NP, se reducen los efectos de matriz causados por el polímero y el tensoactivo presente en las formulaciones y al mismo tiempo, se aumenta el tiempo de vida de las fibras de *SPME*.

El desarrollo del método con microextracción en fase sólida en modo *HS* se llevó a cabo en dos etapas: la primera consistió en la selección de la fibra más adecuada para la extracción del γ -terpineno, el timol y el carvacrol y la segunda etapa, en la optimización de la extracción de estos tres compuestos usando un diseño de experimentos de Plackett Burman.

Una adecuada elección de la fibra o fase de extracción es fundamental en un método de *SPME*. Con el fin de seleccionar la fibra que permitiera la mejor extracción del γ -terpineno, el timol y el carvacrol de manera selectiva y reproducible, se evaluaron cuatro fibras con polaridad diferente. En la figura 3.4 se presentan las áreas del γ -terpineno, del timol y del carvacrol obtenidas para cada una de las fibras de *SPME* evaluadas. Se puede observar que las cuatro fibras de *SPME* si extraen a los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*. Sin embargo, cada componente del aceite esencial de *Thymus vulgaris* muestra un comportamiento diferente con cada una de las fibras. La selectividad de la fibra depende principalmente de la volatilidad, la polaridad y el peso molecular del compuesto (Pawliszyn, 1997).

La fibra de DVB/CAR/PDMS extrajo mejor al γ -terpineno, componente más volátil y no polar de los tres. Esta fibra mixta tiene una combinación de recubrimientos de diferentes polaridades permitiendo adsorber mayor cantidad de moléculas con diferentes características físicoquímicas. Sin embargo, esta fibra no fue seleccionada debido a que presentó una gran variabilidad en la respuesta.

Con la fibra de PDMS, la extracción del timol y principalmente del carvacrol fue más baja, debido a la limitada afinidad que presenta este recubrimiento por compuestos menos hidrófobos, como los fenólicos. Con la fibra de CAR/PDMS, la extracción del carvacrol también fue baja, además se obtuvo otra señal cromatográfica diferente a las de los tres componentes evaluados, este comportamiento, atribuido a posibles contaminaciones, son comúnmente encontradas en fibras mixtas.

Por el contrario, la fibra de poliacrilato presentó mejor extracción del timol y carvacrol, con baja variabilidad. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Bicchi C. y cols. (2000), que utilizaron la fibra de PA para cuantificar el aceite esencial de *Thymus vulgaris*. Por lo anterior, la fibra con recubrimiento de PA fue seleccionada para la cuantificación de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

En la etapa de optimización de la extracción del γ -terpineno, el timol y el carvacrol, se usó un diseño experimental de Plackett Burman ya que permite evaluar el mayor número de variables posible con el menor número de experimentos. En la literatura, ya

se ha demostrado la utilidad de un diseño experimental de Plackett Burman en la optimización de las condiciones de extracción de componentes volátiles en vino por *HS-SPME* (Cabredo-Pinillos S., *et al.*, 2004). Sin embargo este modelo experimental no permite determinar las interacciones entre las variables.

De acuerdo a Pawliszyn J. (1997), las variables que más influyen en el análisis de componentes volátiles y semivolátiles con la técnica de *HS-SPME* son: la relación *HS:muestra*, la temperatura de extracción y el tiempo de extracción. Además, se ha reportado que variables como: la temperatura y el tiempo de extracción, la relación *HS:muestra*, el tiempo de equilibrio, el efecto de matriz, la velocidad de agitación y la distancia a la que se coloca la fibra de *SPME* sobre la muestra; afectan directamente la transferencia de los compuestos hacia la fibra disminuyendo la sensibilidad del análisis (Cabredo-Pinillos S., *et al.*, 2004; Rodríguez-Lafuente A., *et al.*, 2009; Ho C.W., *et al.*, 2006; Kovacevic M., *et al.*, 2001). En base a lo anterior se establecieron las siete variables seleccionadas para la optimización de la extracción, en sus niveles altos y bajos (Tabla 3.4).

Para evaluar los resultados del diseño experimental de Plackett Burman, se calcularon las diferencias entre las respuestas de los niveles altos y bajos restando los promedios de las respuestas de los niveles altos menos los promedios de las respuestas de los niveles bajos para cada variable. La diferencia obtenida se graficó para evaluar

visualmente la influencia que ejercía cada variable sobre la *HS-SPME* (Figura 3.5). Entre mayor sea la diferencia mayor será la influencia sobre el sistema de extracción.

Se estableció que las variables que más influyen en el sistema de *HS-SPME* son: la temperatura de extracción y el tiempo de extracción. En el caso de la temperatura de extracción, la mayor influencia se observó a nivel bajo. Esto, muestra que la temperatura de 55 °C no es suficiente para que los analitos en fase de vapor lleguen al estado de equilibrio en los tiempos establecidos, afectando directamente la transferencia de masa entre la muestra y el recubrimiento de PA de la fibra de *SPME*.

Con respecto al tiempo de extracción, la mayor influencia se presentó a nivel alto, lo cual concuerda con la literatura que indica que entre más tiempo se deje la muestra en extracción menor será la variabilidad, mostrando que el tiempo de extracción es indirectamente proporcional a la variabilidad (Bicchi C., *et al.*, 2005).

Otras variables que también influyen son: la concentración de polímero, la velocidad de agitación y la distancia fibra sobre la muestra. La concentración de polímero presente en la muestra ejerce probablemente, un efecto de matriz, es decir los componentes del aceite esencial se podrían adsorber en el polímero afectando su transferencia de masa hacia la fibra de *SPME*. Con respecto a la velocidad de agitación, esta variable afecta directamente la transferencia de masa de la muestra al *HS* y del *HS* a la fibra. Al

aumentar la energía cinética en el sistema, se favorece el paso de los componentes del aceite esencial que están en fase líquido a la fase gaseosa

Los resultados relacionados con la distancia de la fibra sobre la muestra, no coinciden con lo esperado ya que teóricamente, después de cierto tiempo, el sistema está en equilibrio y la posición de la fibra no debería modificar la cantidad de compuesto extraído. Sin embargo, considerando que la muestra está compuesta principalmente por agua, las moléculas de vapor de agua pudieron adsorberse en la fibra de PA que se encontraba más cercana a la muestra modificando así su polaridad y por tanto la adsorción de los compuestos del aceite esencial.

Las variables del tiempo de equilibrio y la relación *HS:muestra*, fueron las que aportaron una menor influencia sobre la extracción. En la tabla 3.5 se muestran las condiciones óptimas establecidas para la extracción del γ -terpineno, el timol y el carvacrol a partir de una muestra de aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

IV.III. Validación para la cuantificación del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en NP

Con el propósito de validar el método con *HS-SPME* por CG para cuantificar el aceite esencial de *Thymus vulgaris* en formulaciones de NP, se evaluaron los siguientes parámetros para la validación del sistema: linealidad, precisión, límite de cuantificación

y límite de detección; mientras que para el método se evaluó: exactitud, selectividad, precisión y robustez.

En la tabla 3.6 se muestran los valores de los parámetros evaluados en la validación del sistema. En relación a la linealidad, para el timol y el carvacrol se obtuvo un coeficiente de determinación mayor a 0.99. Se estableció que los datos obtenidos de la curva de calibración (de 2 a 6 $\mu\text{g/mL}$) son lineales de acuerdo a la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058, 2011). Sin embargo para el γ -terpineno se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.98, lo cual no cumple con el criterio establecido (≥ 0.99) por la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058, 2011).

Para la precisión, se calculó el %DER de los porcentajes de recuperación respecto a la curva de calibración de la linealidad. Se estableció que el sistema fue preciso ya que presentó un %DER menor a 15% reportado por Jiménez C. (2002). Los límites de detección y cuantificación para el timol y el carvacrol, fueron menores al nivel inferior de la curva de calibración, lo cual es aceptable de acuerdo a la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058). Sin embargo para el γ -terpineno, se obtuvo un límite de cuantificación mayor al nivel más bajo de su curva de calibración, debido posiblemente a que no presentaba linealidad.

En la tabla 3.7 se muestran los valores de los parámetros evaluados en la validación del método. Para la exactitud, se calcularon los porcentajes de recuperación de los tres

componentes (99.35% para el γ -terpineno, 109.4% para el timol y 98.84% para el carvacrol), los cuales de acuerdo a la AOAC (2002) son exactos. Estos datos concuerdan con los reportados por Hajimehdipoor H. (2010), donde se determinó la exactitud por HPLC y GC a partir del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, obteniendo un porcentaje de recuperación del 97.7% para timol y del 97.6% para el carvacrol.

Por otra parte, como se observa en los cromatogramas de la figura 8.1 (Anexo B), tanto la técnica de HS-SPME como el método cromatográfico, garantizaron la adecuada selectividad del método frente a los componentes de la matriz (NP poliméricas), ya que no hubo ni interferencias, ni cambios en los tiempos de retención, y en cambio, si se observaron los tres componentes analizados.

Para la precisión del método se calculó el %DER a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos con las formulaciones de NP cargadas con el aceite esencial y adicionadas con la mezcla de estándares. Los valores obtenidos fueron menores al 15% y fueron aceptables de acuerdo a Jiménez C. (2002). La robustez se evaluó usando un diseño de experimentos de Plackett Burman, donde se analizaron las diferencias de las respuestas (área) a niveles altos y bajos. Para establecer las variables que afectan significativamente el método, las diferencias obtenidas entre los niveles altos y bajos deben ser menores al valor de $21/2 S$ (FAO, TCP/RLA/3013A, 2005).

Las variables que afectaron significativamente al método con *HS-SPME* por *GC* para el γ -terpineno, el timol y el carvacrol, fueron la temperatura de *HS-SPME*, el volumen del baño de agua utilizado, la distancia de la fibra de *SPME* y el tiempo de equilibrio. Además, para el carvacrol también afecta significativamente el volumen de la muestra en el vial, atribuido a la baja concentración en la que se encuentra el carvacrol en el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, acarreado una mayor variabilidad al método con *HS-SPME* por *GC*.

IV.IV. Obtención, optimización y caracterización de las NP

Durante la optimización de la obtención de NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris*, se determinó que un incremento en la cantidad de polímero (10-20 mg) en la fase orgánica indujo un aumento del tamaño de partícula como se puede observar en la Figura 3.6; esto puede explicarse tomando en cuenta el mecanismo de formación de NP por nanoprecipitación: al entrar en contacto las fases orgánica y acuosa, el solvente presente en la fase orgánica difunde a la fase acuosa e induce la agregación de las cadenas de polímero, en consecuencia, la formación de las NP. Por lo tanto, al existir una mayor cantidad de cadenas poliméricas por unidad de volumen de solvente, se favorecerá la formación de NP de mayor tamaño (Galindo-Rodríguez S.A., *et al.*, 2004).

Para determinar el efecto de la cantidad de aceite esencial de *Thymus vulgaris* en la fase orgánica sobre el tamaño de partícula, se adicionó aceite esencial en la fase orgánica en

un rango de 10-20 mg. En la Figura 3.7 se muestran los resultados en los cuales se determinó que a mayor cantidad de aceite esencial de *Thymus vulgaris*, menor fue el tamaño de partícula de las NP obtenidas. Estos resultados indican que la cantidad de aceite esencial de *Thymus vulgaris* presente en la fase orgánica influye de manera directa en el tamaño de las NP.

Las condiciones experimentales que nos permitieron obtener NP menores a 200 nm, con un rendimiento del 100% de conversión de polímero a NP (es decir, sin agregados) y con una mayor encapsulación de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* fueron: una fase orgánica compuesta por 5 mL de acetona, 15 mg de ϵ -policaprolactona y 15 mg de aceite esencial de *Thymus vulgaris*, y una fase acuosa compuesta por 20 mL de Tween 80® al 3% (p/v). Las NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris* obtenidas presentaron un tamaño de 180 ± 3 nm y su índice de polidispersidad fue de 0.142 ± 0.02 .

En particular, el índice de polidispersidad resulta aceptable si se considera que este puede variar en un rango de 0 a 1, en donde el valor más cercano al 0 indica una distribución homogénea de tamaño de partícula (Galindo-Rodríguez S.A., *et al.*, 2004).

En cuanto a la etapa de purificación de las NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, se evaluaron dos técnicas: la evaporación a presión reducida y la diálisis. Generalmente, la técnica de evaporación a presión reducida es la técnica más empleada

en la purificación de las NP cargadas con principios activos no volátiles como por ejemplo el clotrimazol (Velazquez-Dávila L. A., 2011). Sin embargo, cuando se encapsulan moléculas volátiles en NP, se ha reportado el uso de diálisis para la eliminación del solvente orgánico (Sohn S.O., *et al.*, 2007).

En relación a la evaporación a presión reducida, se puede observar que la acetona se eliminó aproximadamente al 100%, obteniendo así NP libres de acetona. Esto se puede corroborar por la ausencia de la señal cromatográfica atribuida a la acetona.

Para la purificación de NP cargadas con aceite esencial por diálisis, inicialmente se observó una eliminación del 70% de acetona durante el tiempo de estudio. Sin embargo, al analizar la formulación de NP después de la diálisis, no se observó ninguna señal cromatográfica atribuida a la acetona. En base a lo anterior, se estableció que las formulaciones de NP estaban libres de acetona y, que es muy posible que, el 30% de acetona faltante se haya evaporado durante la manipulación experimental.

Las NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* purificadas por evaporación a presión reducida, presentaron un tamaño de 143.53 ± 9.4 nm y, para la diálisis, de 117.23 ± 0.4 nm. Las NP tuvieron un potencial Z de -4.29 ± 0.26 después de la evaporación a presión reducida y de -8.69 ± 1.45 después de la diálisis (tabla 3.8). La carga negativa de las NP purificadas, le confiere fuerzas de repulsión electrostática entre las partículas vecinas favoreciendo su suspensión en el medio que las contiene.

Con respecto a la estabilidad de la formulación de NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris*, se determinó el tamaño de partícula e índice de polidispersidad por espectroscopía de correlación fotónica cada 15 días. En la Figura 3.8 se aprecia que, al menos en un periodo de 2 meses, el tamaño de las NP cargadas con el aceite esencial y purificadas por evaporación a presión reducida, aumento cerca de un 4%, con respecto al diámetro inicial. En contraste, en las NP cargadas y purificadas por diálisis, su tamaño disminuyó en un 30% (más de 30 nm).

En la figura 3.9 se puede observar como el índice de polidispersidad evaluado para las NP purificadas por evaporación a presión reducida y por diálisis no tuvieron diferencias significativas (valor muy cercano a 0), por lo que se estableció que son formulaciones estables por al menos dos meses

En la figura 3.10 y 3.11 se puede observar que el tamaño de partícula presentó una distribución normal, es decir, la muestra fue homogénea, y la mayor parte de las partículas son del mismo tamaño. Después de dos meses se mantuvieron las mismas condiciones. Además se realizó una evaluación visual de las formulaciones de NP cargadas y purificadas y no se observó aceite esencial de *Thymus vulgaris* libre en la superficie de las NP, ni agregados de polímero confirmando su estabilidad.

La incorporación del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en las NP purificadas por evaporación a presión reducida y por diálisis fue excelente, obteniendo un porcentaje

de eficiencia de encapsulación del 97% para el aceite esencial total (tabla 3.9); lo que indica que el 97% del aceite esencial de *Thymus vulgaris* añadido durante el proceso de preparación de las NP logró ser encapsulado. De forma específica, el porcentaje de eficiencia de encapsulación del γ -terpineno, el timol y el carvacrol en las NP cargadas y purificadas por ambas técnicas, fueron del 25%, 68% y 3% respectivamente (tabla 3.9). Estos resultados concuerdan con un reciente estudio donde se reportó un porcentaje de eficiencia de encapsulación del 77% para el timol en nanoesferas poliméricas (Wattanasatchaa A., *et al.*, 2012).

El porcentaje de encapsulación para el aceite esencial de *Thymus vulgaris* en NP purificadas por ambas técnicas, fue del 64%, lo cual indica que el 64% de la NP está formada por aceite esencial de *Thymus vulgaris* y el 36% restante corresponde al polímero. El porcentaje de encapsulación para el γ -terpineno, el timol y el carvacrol en las NP cargadas y purificadas por ambas técnicas, fueron del 20.5%, 40% y 3.3% respectivamente. En particular, para el timol, Wattanasatchaa A. y cols. (2012) reportaron un porcentaje de encapsulación del 43.5% en nanoesferas poliméricas obtenidas por el método de desplazamiento de solvente.

Con el fin de comparar la estabilidad de las NP con una formulación sin la presencia del polímero, se preparó una nanoemulsión (NE) conteniendo aceite esencial de *Thymus vulgaris*. Se obtuvo una NE con un tamaño de partícula de 130.8 ± 12.06 nm y un potencial Z de -8.78 ± 0.61 (tabla 3.8). La NE aumentó significativamente su índice de

polidispersidad después de dos meses (figura 3.9), en la figura 3.12 se observan varias poblaciones de tamaños de partícula diferentes, lo que nos indica que no es homogénea, además durante su evaluación visual, se presentaron agregados. Con lo anterior se confirmó que la encapsulación del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en NP favorece la estabilidad de la formulación.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- La técnica de hidrodestilación permitió obtener aceite esencial de *Thymus vulgaris* con un porcentaje de rendimiento del 0.52%. Se detectaron e identificaron 17 compuestos por CG-MS y CG-FID. Los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Thymus vulgaris* fueron el timol (34%), el o-cimeno (31%) y el γ -terpineno (13%).
- Con respecto a la caracterización física del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, se demostró que el índice de refracción, la actividad óptica y la densidad relativa son parámetros de calidad que brindan información respecto al tipo de compuestos presentes en los aceites.
- Se desarrolló y validó un método analítico con *HS-SPME* por *GC* para la cuantificación directa de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en formulaciones de NP., siendo una aplicación innovadora en la cuantificación de

moléculas volátiles de aceites esenciales de origen natural encapsulados en sistemas nanoparticulados.

- La técnica de nanoprecipitación permitió obtener NP cargadas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* con un tamaño de partícula de 117.23 ± 0.4 nm y 143.53 ± 9.4 nm con diálisis y con evaporación a presión reducida, respectivamente; un porcentaje de encapsulación del 64% y un porcentaje de eficiencia de encapsulación del 97%, y una estabilidad superior a los dos meses. En base a lo anterior, se considera que el procedimiento de formulación de NP fue adecuado, debido a la ausencia de agregados poliméricos y un elevado rendimiento de encapsulación.
- En relación al estudio de las variables de formulación, se demostró que la cantidad de ϵ -policaprolactona y de aceite esencial de *Thymus vulgaris* en la fase orgánica, afectan directamente al tamaño de las NP.
- Con respecto a las dos técnicas de purificación utilizadas, se demostró que tanto la evaporación a presión reducida como la diálisis son eficaces para la eliminación de la acetona en formulaciones de NP cargadas con un aceite esencial de origen natural.

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de purificación de NP para la eliminación del tensoactivo excedente y su influencia sobre la estabilidad de las partículas.
- Evaluar la estabilidad de las NP a largo plazo para una futura aplicación biológica.
- Evaluar distintos polímeros para la preparación de NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris*.
- Realizar estudios *in vitro* e *in vivo* de liberación del aceite esencial de *Thymus vulgaris* encapsulado en NP.
- Encapsular otros aceites esenciales con actividades biológicas en diversas áreas.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu F.O.M.S., Oliveira E.F., Paula H.C.B., Paula R.C.M. (2012) Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 89, 1277-1282.
- Adams R.P. (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation.
- Adams A., Kruma Z., Verhé R., De Kimpe N., Kreichbergs V. (2011) Volatile Profiles of Rapeseed Oil Flavored with Basil, Oregano, and Thyme as a Function of Flavoring Conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 201-212.
- Álvarez-Román R., Cavazos-Rodríguez M. R., Chávez-Montes A., Castro-Ríos R., Waksman de Torres N., Salazar-Cavazos M. L., Galindo-Rodríguez S.A. (2011) Formulación y caracterización de nanopartículas con un antioxidante natural para su aplicación cutánea. *Química Hoy Chemistry Sciences*. 4: 29-35.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
- Baranauskienė R., Venskutonis P.R., Galdikas A., Senulienė D. (2005) Testing of microencapsulated flavours by electronic nose and SPME–GC. *Food Chemistry*, 92, 45–54.
- Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P., Angioni P. (2007) Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7093-8.

- Bhaskara-Reddy M. V., Angers P., Gosselin A., Arul J. (1998) Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 47, 1515–1520.
- Bicchi C., Cordero C., Liberto E., Sgorbini B., Rubiolo P. (2007) Reliability of fibres in solid-phase microextraction for routine analysis of the headspace of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 1152, 138–149.
- Bicchi C., Drigo S., Rubiolo P. (2000) Influence of fibrecoating in head space solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 892, 469–485.
- Botelho M. A., Nogueira N.A., Bastos G.M., Fonseca S.G., Lemos T.L., Matos F.J., Montenegro D., Heukelbach J., Rao V.S., Brito G.A. (2007) Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, 349-56.
- Cabredo-Pinillos S., Cedrón-Fernández T., Parra-Manzanares A., Sáenz-Barrio C. (2004) Determination of Volatile Compounds in Wine by Automated Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography. *Chromatographia*, 733-738.
- Cavazos-Rodríguez M. R. (2011) Encapsulación de moléculas antioxidantes en nanopartículas poliméricas para su aplicación dermatológica. Tesis de Maestría.
- Cavazos-Rodríguez M.R., Galindo-Rodríguez S.A., Catro-Ríos R., Waksman de Torres N., Álvarez-Román R. (2010) Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de un aceite esencial en nanopartículas poliméricas. *Boletín de la Sociedad Química de México* 4: 141.
- Chorny M., Fishbein I., Danenberg H., Golomb G. (2002) Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of Controlled Release* 83, 389–400.
- Damiani N., Gende L.B., Bailac P., J.A. Marcangeli, Eguaras M.J. (2009) Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Parasitol Research*. 106:145-152
- Domínguez X. (1985) *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa S.A.

- El-Nekeety A. A., Mohamed S.R., Hathout A.S., Hassan N.S., Aly S.E., Abdel-Wahhab M.A. (2011) Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicon*, 57, 984-991.
- Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., Ammoury N., Benita S. (1989) Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55, R1-R4.
- Galindo-Rodriguez S., Allemann E., Fessi H., Doelker E. (2004) Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21, 1428-39.
- Guerra-Boone, L. (2011) Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas en medicina tradicional. Tesis de Maestría.
- Hayouni E. A., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J.Y., Mohammed H., Hamdi M. (2008) Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 242-251.
- Ho C. W., Wan Aida M.W., Maskat M.Y., Osman H. (2006) Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compound in palmsugar (*Arenga pinnata*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 822-830.
- Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J.P., Ankit M., Khedid K., El-Bachiri A. (2009) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11, 205-208.
- Jimenez C., Ventura R., Segura J. (2002) Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories. *Journal of Chromatography B.*, 767, 341-51.
- Kohlert C., Abel G., Schmid E., Veit M. (2002) Determination of thymol in human plasma by automated headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B.* 767, 11-18.

- Kovacevic M., Kac M. (2001) Solid-phase microextraction of hop volatiles. Potential use for determination and verification of hop varieties. *J Chromatogr A*, 918, 159-67.
- Kumar A., Shukla R., Singh P., Prasad C.S., Dubey N.K. (2008) Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 575–580.
- Lai F., Loy G., Manconi M., Manca M.L., Fadda A.M. (2007) *Artemisia arborescens* L essential oil loaded beads: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech*, 8, E67.
- Lai F., Wissing S.A., Muller R.H., Fadda A.M. (2006) *Artemisia arborescens* L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech*, 7, E2.
- Lee S. J., Umamo K., Shibamoto T., Lee K. (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91, 131–137.
- Lertsutthiwong P., Noomun K., Jongaroonngamsang N., Rojsitthisak P., Nimmannit U. (2008) Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers*, 74, 209-214.
- Mishra A. K., N. Sahu, A. Mishra, A. K. Ghosh, S. Jha & P. Chattopadhyay (2010) Phytochemical screening and antioxidant activity of essential oil of Eucalyptus leaf. *Pharmacognosy Journal*, 2, 21-24.
- Musa-Özcan M., Chalchat J.C. (2007) Composición química de semillas de zanahoria (*Daucus carota* L.) cultivadas en Turquía: caracterización del aceite de semilla y del aceite esencial. *Grasas y Aceites*, 58, 359-365.
- Naranjos-Ramírez N., Torres-Cantú D. I., Castillo-Rodríguez V. I., Galindo-Rodríguez S. A., Chávez-Montes A. (2011) Preparación de nanopartículas poliméricas con aplicación farmacéutica usando técnicas basadas en emulsificación. *Revista Mexicana de Física*. 57: 41-43.
- Oliva M. d. L., Carezzano M.E., Gallucci M.N., Demo M.S. (2011) Antimycotic effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies. In *Nat Prod Commun*, 1039-43.

- Pavela R. (2011) Insecticidal and repellent activity of selected essential oils against of the pollen beetle, *Meligethesaeneus* (Fabricius) adults. *Industrial Crops and Products*, 34, 888–892.
- Pawliszyn, J. 1997. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH.
- Rodriguez-Lafuente A., Nerin de la Puerta C., Batlle R. (2009) Determination of fifteen active compounds released from paraffin-based active packaging in tomato samples via microextraction techniques. *Anal Bioanal Chem*, 395, 203-11.
- Rota M. C., Herrera A., Martínez R.M., Sotomayor J.A., Jordán M.J. (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19, 681–687.
- Sohn S., Lee S., Kim Y., Yeum J., Choi J., Ghim H. (2007) Aroma finishing of PET fabrics with PVAc nanoparticles containing lavender oil. *Fibers and Polymers*, 8, 163-167.
- Soto-Mendivil E. A., Moreno-Rodríguez J.F., Estarrón-Espinosa M., García-Fajardo J.A., Obledo-Vázquez E.N.(2012) Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. *e-Gnosis*.
- Trongtokit Y., Rongsriyam Y., Komalamisra N., Apiwathnasorn C. (2005) Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research*, 19, 303-309.
- Valenti D., De Logu A., Loy G., Sinico C., Bonsignore L., Cottiglia F., Garau D., Fadda A.M. (2001) Liposome-incorporated santolina insularis essential oil: preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *J Liposome Res*, 11, 73-90.
- Velázquez-Dávila, L. (2011) Efecto de la encapsulación de clotrimazol en nanopartículas poliméricas sobre su grado de penetración en piel de cerdo. Tesis de Maestría
- Villiers M. M., Aramwit P., Kwon. G.S., (2009) *Nanotechnology in Drug Delivery*. Springer.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A. (2007) Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*, 27, 91-101.

- Wattanasatcha A., Rengpipat S., Wanichwecharungruang S. (2012) Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*, 434, 360–365.
- Wade L.G. 2004 Química Orgánica. Quinta edición, Editorial Pearson Prentice Hall.
- Yang F.L., Li X.G., Zhu F., Lei C.L. (2009) Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10156-10162.
- You J., Cui F.D., Han X., Wang Y.S., Yang L., Yu Y.W., Li Q.P. (2006) Study of the preparation of sustained-release microspheres containing zedoary turmeric oil by the emulsion–solvent-diffusion method and evaluation of the self-emulsification and bioavailability of the oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48, 35-41.

Capítulo VIII

Anexo A

Para evaluar que tan robusto era el método por *HS-SPME*, se estableció un diseño experimental de Plackett Burman, planteando 8 experimentos con la combinación ordenada de 7 variables a niveles altos y bajos para el γ -terpineno, timol y carvacrol.

Tabla 8.1 Análisis del diseño de experimentos de Plackett Burman utilizado para evaluar la robustez del método desarrollado con *HS-SPME* por *GC-FID* para la cuantificación de los componentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Variable	Diferencia entre las respuestas de los niveles bajos y altos para γ -terpineno ^a	Diferencia entre las respuestas de los niveles bajos y altos para timol ^b	Diferencia entre las respuestas de los niveles altos y bajos para carvacrol ^c
Temperatura	5823.955	19935.4538	60449.77
Concentración de polímero	58.5125	5378.65125	3155.58
Volumen de baño de agua	-5894.5575	-19154.5863	-60436.96
Volumen de muestra en un vial de 7mL	-950.3625	-3752.90125	-59692.335
Distancia de la fibra sobre la muestra	-5823.955	-19935.4538	-60449.77
Tiempo de extracción	-58.5125	-5378.65125	-3155.58
Tiempo de equilibrio	5894.5575	19154.5863	60436.96

^a Si la diferencia entre las variables mayores y menores es mayor a $1472.49 \left((2)^{\frac{1}{2}} DS \right)$, significa que hay una influencia significativa en el análisis al alterar esa variable

^b Si la diferencia entre las variables mayores y menores es mayor a $18401.01 \left((2)^{\frac{1}{2}} DS \right)$, significa que hay una influencia significativa en el análisis al alterar esa variable

^c Si la diferencia entre las variables mayores y menores es mayor a $903.65 \left((2)^{\frac{1}{2}} DS \right)$, significa que hay una influencia significativa en el análisis al alterar esa variable.

Anexo B

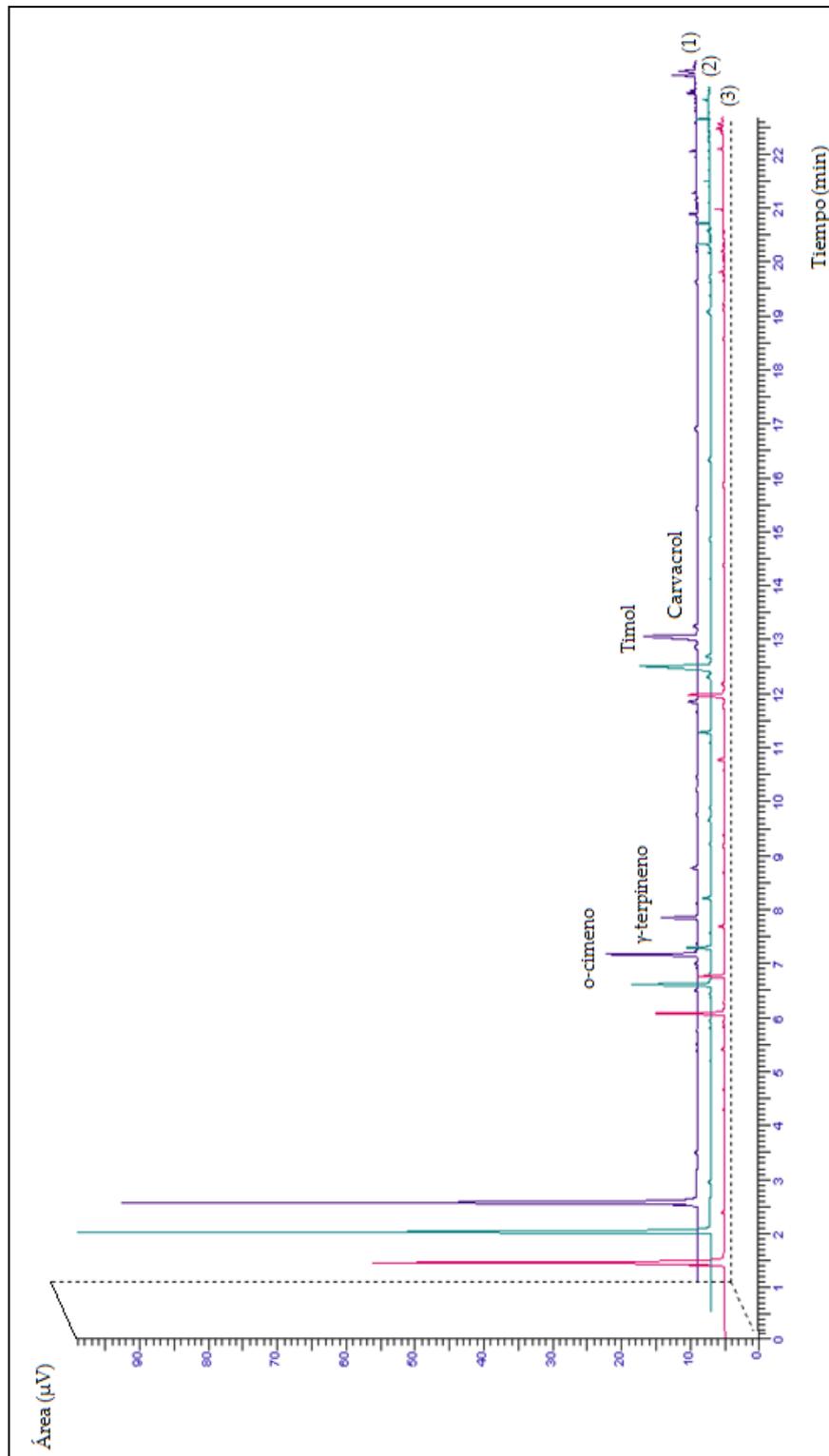


Fig. 8.2 Cromatogramas de aceite esencial de *Thymus vulgaris* con diferentes concentraciones de polímero.
(1) Concentración alta de polímero, (2) Sin polímero y (3) Concentración baja de polímero.

Anexo C

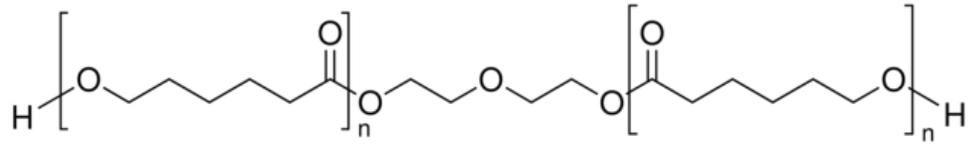
Estructuras químicas y generalidades de los materiales utilizados:

Aceite esencial de *Thymus vulgaris*



Fig.8.3 *Thymus vulgaris*

Es una mata perenne aromática de la familia de las labiadas, tiene un tamaño de hasta 30cm de altura con tallos leñosos y grisáceos. Sus hojas son lanceoladas u ovaladas, enteras, pecioladas y con el envés cubierto de vellosidad blanquecina. Tiene flores rosadas y blancas, con la corola de labio superior escotada y el inferior dividido en tres lóbulos. Su hábitat comprende de matorrales secos y soleados sobre todo tipo de sustrato en lugares secos. Es originario de toda la región Mediterránea occidental, pero se cultiva en otras regiones donde las condiciones son favorables como los climas semiáridos.

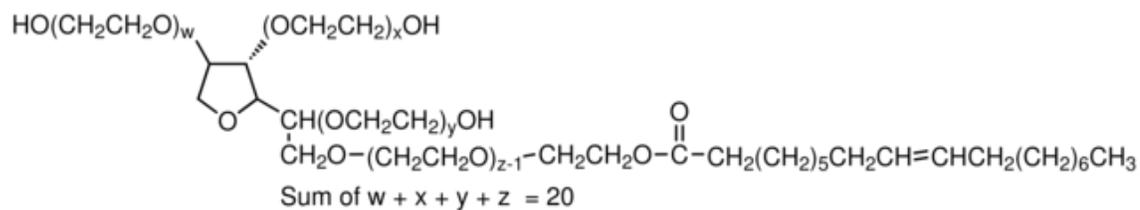
ϵ -policaprolactona

Nombre común: ϵ -policaprolactona, caprolactona

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Valor
Peso molecular	14 000 g/mol
Estado	Sólido (Perlas)
Color	Blanco
Punto de fusión	58-63°C
Solubilidad	Acetona, Tolueno, Tetrahidrofurano

Aplicaciones: polímero biodegradable usado en formulaciones farmacéuticas.

Tween ® 80

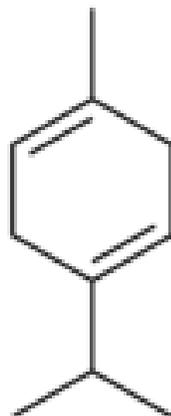
Nombre común: Polisorbato 80

Nombre químico: Polioxietilen sorbitano monooleatano

Propiedades físicas y químicas:

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

Aplicaciones: materia prima industrial como agente solubilizador y estabilizante de fármacos coloidales.

γ -terpineno

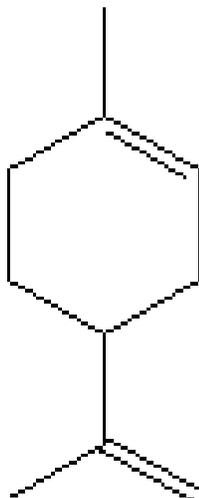
Nombre químico: 1-Isopropil-4-metil-1,4-ciclohexadieno, p-Menta-1,4-dieno

Nombre común: γ -terpineno, terpineno

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₆
Peso molecular	136.23 g/mol
Estado	Líquido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.85g/cm ³
Punto de ebullición	182 °C
Índice de refracción	1.474
Coefficiente de partición	4.75
Solubilidad	Solventes orgánicos

Aplicaciones: fabricación de fragancias y saborizantes.

Limoneno

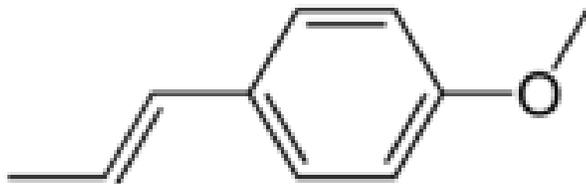
Nombre químico: 1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexeno

Nombre común: limoneno

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₆
Peso molecular	136.24g/mol
Estado	Líquido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.8411g/cm ³
Punto de ebullición	176°C
Coefficiente de partición	4.23
Solubilidad	Solventes orgánicos, poco en agua

Aplicaciones: área farmacéutica y alimentaria.

Anetol

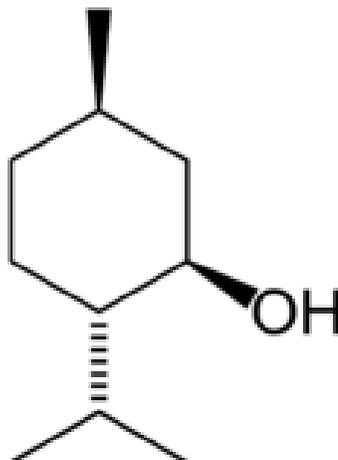
Nombre químico: 4-propenil-anisol, 1-Metoxi-4-(1-propenil)-benzol

Nombre común: anetol

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₂ O
Peso molecular	148.22g/mol
Estado	Líquido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.99 g/cm ³
Punto de ebullición	234–237 °C
Coefficiente de partición	3.39
Solubilidad	Solventes orgánicos

Aplicaciones: área farmacéutica, alimentaria y como precursor de otros compuestos.

Mentol

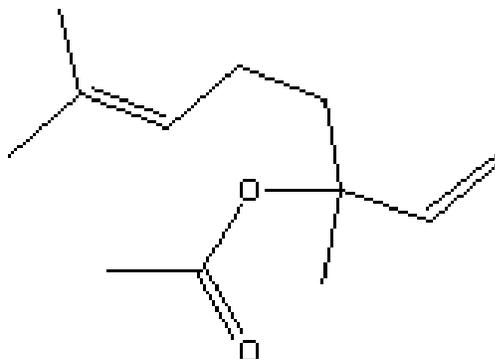
Nombre químico: 2-Isopropyl-5-methylcyclohexanol

Nombre común: mentol

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₂₀ O
Peso molecular	156.27 g/mol
Estado	sólido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.89 g/cm ³
Coefficiente de partición	3.40
Punto de ebullición	216 °C
Solubilidad	Poca en agua, buena en etanol, cloroformo y éter dietílico

Aplicaciones: área farmacéutica, alimentaria y cosmética.

Acetato de linalilo

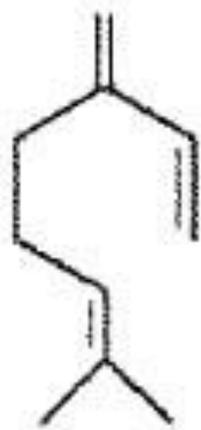
Nombre químico: acetato de 1,5-Dimetil-1-vinil-4-hexenilo

Nombre común: acetato de linalilo

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
Peso molecular	196.29 g/mol
Estado	Líquido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.9 g/cm ³
Punto de ebullición	220°C
Coefficiente de partición	3.9
Solubilidad	Poca en agua y mala en etanol

Aplicaciones: se usa comúnmente para adulterar los aceites esenciales y hacerlos más comerciales.

Mirceno

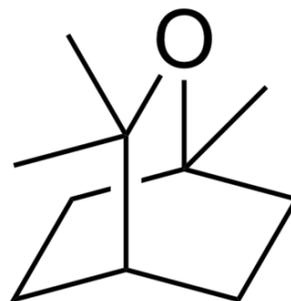
Nombre químico: 7-Metil-3-metileno-1,6-octadieno

Nombre común: mirceno

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₆
Peso molecular	136.23g/mol
Estado	Líquido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.794 g/cm ³
Punto de ebullición	166-168°C
Coefficiente de partición	4.17
Solubilidad	Solventes orgánicos

Aplicaciones: para la fabricación de fragancias.

Eucaliptol

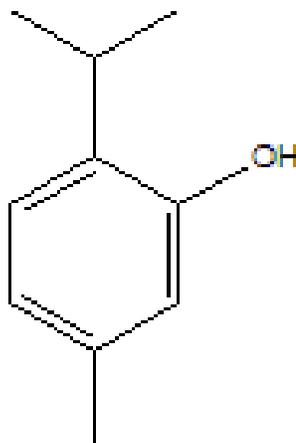
Nombre químico: 1,3,3-trimethyl- 2-oxabicyclo[2,2,2]octane

Nombre común: eucaliptol

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₈ O
Peso molecular	154.24 g/mol
Estado	Líquido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.93 g/cm ³
Coefficiente de partición	2.74
Punto de ebullición	174–177°C
Solubilidad	Solventes orgánicos, mala en agua

Aplicaciones: área farmacéutica, alimentaria y agrícola como insecticida y repelente.

Timol

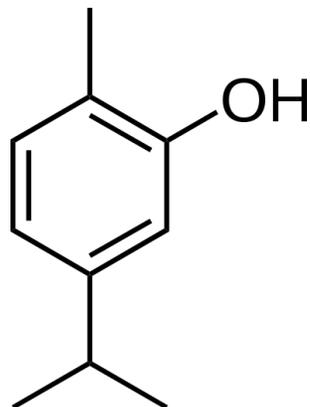
Nombre químico: 2-Isopropil-5-metil-fenol

Nombre común: timol

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₄ O
Peso molecular	150.22 g/mol
Estado	sólido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.97g/cm ³
Coefficiente de partición	3.3
Punto de ebullición	232°C
Solubilidad	Solventes orgánicos, mala en agua

Aplicaciones: área farmacéutica, cosmética y veterinaria.

Carvacrol

Nombre químico: 5-isopril-2-metilfenol

Nombre común: carvacrol, comofenol

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₄ O
Peso molecular	150.217 g/mol
Estado	Líquido
Color	Incoloro-amarillento
Densidad relativa	0.9772g/cm ³
Punto de ebullición	237.7 °C
Coefficiente de partición	3.4
Solubilidad	Metanol, etanol, dietil éter, acetona

Aplicaciones: fabricación de bases aromáticas y conservador alimentario.

Asistencia a congresos

1. 2do. Seminario sobre Fitoterapia y Química de Productos Naturales. DAAD - Cuerpo Académico de Química Biológica. UANL, Monterrey, N.L. 30 de septiembre-1 de octubre del 2011.
2. XXV Congreso Nacional de Química Analítica. México, D.F. 27-29 de junio 2012.
3. 8va Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales "Dr. Alfredo Ortega Hernández". Huatulco, Oaxaca. 23-25 de mayo del 2012.

Asistencia a cursos

1. "Introducción a la validación de métodos y su estadística". XXIV Congreso Nacional de Química Analítica. Saltillo, Coahuila, México. 22-24 de junio 2011.
2. "Primera inmersión para Químicos Analíticos en el Análisis Multivariable de Datos". XXV Congreso Nacional de Química Analítica. México, D.F. 27-29 de junio 2012.

Presentaciones en congresos internacionales y nacionales

1. "Optimización de la técnica de Microextracción en fase sólida para la cuantificación de aceite esencial de *Thymus vulgaris* en nanopartículas poliméricas". Presentación en modalidad Cartel Profesional. XXV Congreso Nacional de Química Analítica. México, D.F. 27-29 de junio 2012.
2. "Aceite esencial de *Thymus vulgaris*: caracterización química y nanoencapsulación". Presentación en modalidad Cartel Profesional. 8va Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales "Dr. Alfredo Ortega Hernández". Huatulco, Oaxaca. 23-25 de mayo del 2012.
3. "Influence of process parameters on the encapsulation of *Thymus vulgaris* and *Chrysactinia mexicana* essential oils into polymeric nanoparticles". Presentación en modalidad Cartel Profesional. 9th International Topical Meeting on Nanostructured Materials and Nanotechnology. San Luis Potosí, México. 20-23 de mayo del 2012.

Publicaciones

4. Lugo-Estrada L, Pérez-López L.A., Galindo-Rodríguez S.A., Salazar-Cavazos M.L., Waksman-de Torres N., Álvarez-Román R. (2012). "Aceite esencial de *Thymus vulgaris*: caracterización química y nanoencapsulación". Revista Latinoamericana de Química, 39 (Suplemento especial): 188. ISSN: 0370-5943.

5. Lugo-Estrada L, Salazar-Cavazos M.L., Pérez-López L.A., Galindo-Rodríguez S.A., Waksman-de Torres N., Álvarez-Román R. (2012) "Optimización de la técnica de Microextracción en fase sólida para la cuantificación de aceite esencial de *Thymus vulgaris* en nanopartículas poliméricas". Memorias del XXV Congreso Nacional de Química Analítica. ISBN: 978-607-9048-03-7.

1. Lugo-Estrada L, Pérez-López L.A., Waksman-de Torres N., Galindo-Rodríguez S.A., Álvarez-Román R. (2012) "Influence of process parameters on the encapsulation of *Thymus vulgaris* and *Chrysactinia mexicana* essential oils into polymeric nanoparticles". Memorias de la 9th Internacional Meeting on Nanostructured Materials and Nanotechnology.