



HAL
open science

Nanomedicinas a base de productos naturales para el tratamiento de la tuberculosis

Brenda Armendariz-Barragan

► **To cite this version:**

Brenda Armendariz-Barragan. Nanomedicinas a base de productos naturales para el tratamiento de la tuberculosis. Pharmacology. Université de Lyon; Universidad autónoma de Nuevo León, 2018. Español. NNT: 2018LYSE1022 . tel-01784734

HAL Id: tel-01784734

<https://theses.hal.science/tel-01784734v1>

Submitted on 3 May 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1022

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED205
Ecole Doctoral Interdisciplinaire Science-Santé

Doctorat en Sciences

Soutenue publiquement le 23/02/2018, par :

ARMENDÁRIZ-BARRAGÁN Brenda

**Nanomedicines à base de produits naturels pour
le traitement de la tuberculose**

**THÈSE EN COTUTELLE: Université Claude Bernard Lyon 1
et Universidad Autónoma de Nuevo León**

COMPOSITION DU JURY:

REPPORTEURS

Pr. Adriana GARIBAY-ESCOBAR
Pr. M. Luis PEÑA-RODRÍGUEZ
Pr. Begoña DELGADO-CHARRO

Depto. CQB, Universidad de Sonora
U. de Biotec, CICY-Yucatán
Depto. Pharmacy, University of Bath

EXAMINATEURS

Pr. Salima SAIDI-BESBES
Pr. Dr. Serge STOLL-MER

LSOA, Université d'Oran
SSTE, Université de Genève

DIRECTEUR ET CO-DIRECTEUR

Pr. Hatem FESSI
Dr. Abdelhamid ELAISSARI

LAGEP UMR CNRS 5007, Université Lyon 1
LAGEP UMR CNRS 5007, Université Lyon 1

DIRECTEUR ET CO-DIRECTRICE EN ÉTABLISSEMENT PARTENAIRE

Pr. Sergio GALINDO-RODRÍGUEZ
Pr. Rocío ÁLVAREZ-ROMÁN

FCB, Universidad Autónoma de Nuevo León
FM, Universidad Autónoma de Nuevo León

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS NATURALES PARA EL
TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS**

Por

QBP. BRENDA ARMENDÁRIZ BARRAGÁN

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con
ACENTUACIÓN en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

FEBRERO, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



TESIS EN COTUTELA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE NUEVO LEÓN
(MÉXICO)**

Y

**UNIVERSITÉ CLAUDE
BERNARD LYON I
(FRANCIA)**

**NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS NATURALES PARA EL
TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS**

Por


QBP. BRENDA ARMENDÁRIZ BARRAGÁN

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con
ACENTUACIÓN en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

FEBRERO, 2018

**NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS NATURALES PARA EL
TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS**

Comité de Tesis



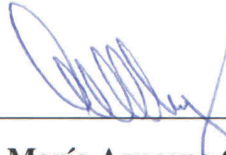
Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Presidente



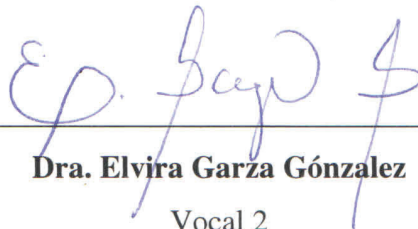
PhD. Hatem Fessi

Secretario



Dra. María Azucena Oranday Cárdenas

Vocal 1



Dra. Elvira Garza González

Vocal 2



Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Vocal 3

**NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS
NATURALES PARA EL TRATAMIENTO
DE LA TUBERCULOSIS**

Dirección de Tesis

El presente trabajo fue dirigido por los abajo firmantes dentro de un convenio de colaboración para realizar tesis en cotutela entre la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL) y el *Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés* (UCBL-I), el cual fue firmado en junio del 2013. Como resultado del convenio, la sustentante, Brenda Armendáriz Barragán, obtendrá el grado de Doctor en Ciencias por ambas instituciones.



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Director
UANL-México



Prof. Hatem Fessi
Co-Director
UCBL I-Francia



Dra. Rocío Álvarez Román
Directora Externa
UANL-México



Prof. Abdelhamid Elaïssari
Director Externo
UCBL I-Francia

AGRADECIMIENTOS ACÁDEMICOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.



A la Université Claude Bernard Lyon I (Francia) por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de este trabajo en cotutela.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de posgrado (No. 486227).

A la Red Multidisciplinaria de Tuberculosis, SEP-PROMEPE 103.5/13/9254.



Al Fondo de CONACYT Ciencia Básica, número 129961.

Al Programme Jeunes Équipes de l'IRD y l'AIIRD, Équipe Nanobiosa, JEAI-2011 (Francia).



Al Programme Avenir Lyon Saint-Etienne (PALSE-2015) por la beca para la estancia de investigación en Francia.

Al Laboratoire d'Automatiques et des Génies de Procédés (LAGEP-CNRS) por el apoyo y facilidades brindadas para la estancia de investigación en Francia.



Al Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del Hospital Universitario de la UANL por las facilidades brindadas para las pruebas microbiológicas de este trabajo.

SOMMAIRE

Contenu	Page
Índice de tablas	II
Índice de figuras	III
Abreviaturas	V
Résumé	1
Justificación del trabajo	8
Hipótesis	9
Objetivo General	10
Objetivos Específicos	11
Capítulo I: Productos Naturales contra la Tuberculosis	12
I.1 Introducción	13
I.2 Extractos naturales obtenidos de plantas con potencial actividad antituberculosa	14
I.3 Compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antituberculosa	20
I.4 Conclusiones	32
Capítulo II: Nanotecnología aplicada a sistemas de liberación controlada de productos naturales	44
II.1 Introducción	45
II.2 Nanopartículas poliméricas	46
II.3 Nanopartículas sólidas lipídicas	50
II.4 β -Ciclodextrinas	52
II.5 Otros sistemas de liberación nanoparticulados	53
Nanoemulsiones	53
Micro/nanocomplejos	53
Nanogeles	54
Niosomas	54
II.6 Conclusiones	55
Capítulo III: Desarrollo de una formulación de nanopartículas con clofazimina y ensayos <i>in vitro</i> contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	61
III.1 Introducción	62
III.2 Materiales	64
III.3 Metodología	64
III.4 Resultados y Discusión	66
III.5 Conclusiones	80
Capítulo IV: Desarrollo y caracterización de nanoformulaciones con extractos de <i>Schinus molle</i> para su aplicación contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	86
IV.1 Introducción	87
IV.2 Materiales	89
IV.3 Metodología	89
IV.4 Resultados y Discusión	95
IV.5 Conclusiones	117
Conclusions	125
Anexo I	128
Anexo II	130
Resumen Bibliográfico	143

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
I.1	Extractos naturales obtenidos de plantas con potencial actividad antituberculosa <i>in vitro</i> .	16
I.2	Compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antituberculosa <i>in vitro</i> .	22
III.1	Modificaciones a la técnica de nanoprecipitación para la obtención de las NP biodegradables de PLA cargadas con clofazimina.	68
III.2	Caracterización física de las NP biodegradables blanco y cargadas con clofazimina.	70
III.3	Parámetros de validación establecidos para la cuantificación de CFM por CLAR.	71
III.4	Cuantificación de CFM incorporada en las NP biodegradables.	73
III.5	Determinación de la CMI <i>in vitro</i> para el fármaco libre y las formulaciones de NP (blanco y cargadas) contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.	79
IV.1	Análisis de regresión lineal para las curvas de calibración de HMM elaboradas por CLAR para los picos con TR de 28, 38 y 39 min.	91
IV.2	Evaluación cualitativa y de preidentificación fitoquímica por pruebas colorimétricas del extracto HMM.	96
IV.3	Pruebas de solubilidad del extracto HMM en solventes parcialmente miscibles en agua	97
IV.4	Caracterización fisicoquímica de las nanoformulaciones con extracto HMM.	100
IV.5	Actividad antituberculosa del extracto HMM y las nanoformulaciones por la técnica de AMBA en microplaca contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.	110
IV.6	Determinación de CL ₅₀ por bioensayo con <i>Artemia salina</i> para el extracto HMM libre y las nanoformulaciones.	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
II.1	Estructura de los dos tipos de nanopartículas poliméricas: A) Nanocápsulas y B) Nanoesfera.	47
II.2	Estructura de una nanopartícula sólida lipídica.	51
II.3	Estructura de la B-Ciclodextrina.	52
III.1	Perfiles calorimétricos para los materiales y las nanoformulaciones por DSC. A) Clofazimina, B) PLA, C) PVA, D) NP-blanco y NP-CFM	74
III.2	Espectros de IR con transformada de Fourier. A) PVA, B) PLA, C) CFM, D) NP blanco y E) NP-CFM.	75
III.3	Perfil de liberación <i>in vitro</i> para las NP biodegradables cargadas con CFM ($n = 2; \bar{x} \pm DS$).	78
IV.1	Perfil cromatográfico obtenido por CLAR para el extracto crudo HMM de <i>Schinus molle</i> .	92
IV.2	Influencia de la cantidad de polímero presente en la fase orgánica sobre el tamaño de nanopartícula ($n = 3; \bar{x} \pm DS$).	98
IV.3	Comparación entre formulaciones en base a la cantidad de polímero utilizada en la fase orgánica y la eficiencia de encapsulación del extracto HMM ($n = 5; \bar{x} \pm DS$).	103
IV.4	Microscopía Electrónica de Barrido de las nanoformulaciones. A) NP PLGA blanco, B) NP PLGA cargadas, C) NP EL100-55 blanco, D) NP EL100-55 cargadas.	104
IV.5	Calorimetría Diferencial de Barrido para las nanoformulaciones elaboradas con PLGA. A) PLGA, B) PVA, C) Extracto HMM, D) NP PLGA blanco, E) NP PLGA cargadas.	105

IV.6	Calorimetría Diferencial de Barrido para las nanoformulaciones elaboradas con EL100-55. A) EL100-55, B) PVA, C) Extracto HMM, D) NP EL100-55 blanco, E) NP EL100-55 cargadas.	106
IV.7	Análisis por Espectroscopía FT-IR de los materiales utilizados en las nanoformulaciones. A) PVA, B) PLA, C) PLGA, D) EL100-55, E) Extracto HMM	107
IV.8	Análisis por Espectroscopía FT-IR de las nanoformulaciones. A) NP PLA blanco, B) NP PLA cargadas, C) NP PLGA blanco, D) NP PLGA cargadas, E) NP EL100-55 blanco, F) NP EL100-55 cargadas.	109
IV.9	Perfil de liberación para las nanoformulaciones cargadas (durante 28h) ($n = 2; \bar{n} \pm DS$).	113
IV.10	Esquema representativo de la liberación de extracto HMM a partir de las nanoformulaciones elaboradas.	115
IV.11	Porcentaje de citotoxicidad del extracto HMM libre y nanoencapsulado por hemólisis inducida en eritrocitos humanos ($n = 3; \bar{x} \pm DS$).	116

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Absorbancia	Abs
Ácido poliláctico	PLA
Ácido poli(láctico- <i>co</i> -glicólico)	PLGA
Área bajo la curva	ABC
Azul de alamar	AMBA
Calorimetría Diferencial de Barrido	DSC
Clofazimina	CFM
Cromatografía de líquidos de alta resolución	CLAR
Etambutol	ETO
Eudragit L100-55	EL100-55
Índice de polidispersidad	IPD
Infrarrojo	IR
Isoniazida	INA
Microscopía Electrónica de Barrido	MEB
Nanopartículas poliméricas	NP
Pirazinamida	PZA
Rifampicina	RIF

RÉSUMÉ

RÉSUMÉ

Actuellement, la tuberculose (TB) est la deuxième maladie infectieuse au monde avec une forte prévalence et un taux de mortalité annuel élevé. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a récemment dévoilé sa nouvelle stratégie, appelée «Mettre fin à la tuberculose», pour la prévention, le contrôle et l'éradication de cette maladie. Les résultats doivent mener à une éradication totale d'ici au 2035. Dans le cadre des objectifs spécifiques de cette stratégie, l'OMS a intégré la recherche de nouvelles connaissances et innovations scientifiques qui améliorent et augmentent l'efficacité des traitements qui sont utilisés contre cette maladie.

Deux des stratégies pharmaceutiques qui ont été les plus étudiées pendant ces dernières années ayant comme objectif principal d'augmenter l'efficacité globale des régimes thérapeutiques utilisés dans la tuberculose comprennent: i) l'incorporation de médicaments antituberculeux de première et de seconde ligne dans des systèmes de libération contrôlé, en particulier les nanoparticules polymères (NP); et, ii) l'utilisation de produits naturels (par exemple, des extraits de plantes ou des composés isolés) comme adjuvants, c'est-à-dire des substances qui, lorsqu'elles sont administrées conjointement avec des médicaments existants, augmentent leur activité.

Dans ce contexte, ce travail de recherche a conduit au développement de deux stratégies pour rendre le traitement de la tuberculose plus efficace. D'une part, on a proposé le développement d'une nanomédecine à base de NP biodégradables contenant un principe actif antituberculeux de deuxième ligne, la clofazimine (CFM). D'autre part, on a conçu le développement des systèmes adjuvants provenant d'extraits végétaux obtenus à partir de l'arbre *Schinus molle*, lesquels ont été aussi incorporés dans des NP (biodégradables et non biodégradables). Dans cette deuxième stratégie,

l'objectif principal a été l'obtention de potentielles nanoformulations qui permettent une application sûre de ces extraits par diverses voies d'administration (p. ex. par voie intraveineuse, pulmonaire ou orale).

Dans ce travail, le Chapitre I est une revue de la littérature sur l'étude des produits naturels (spécifiquement des extraits de plantes) qui ont été proposés comme des agents potentiellement antibactériens contre *Mycobacterium tuberculosis*. En particulier, le Tableau I.1 montre différentes études d'extraits de plantes qui ont été évaluées en fonction de leur potentiel pour inhiber la croissance des différentes souches de *M. tuberculosis*, ainsi, les extraits de plantes sont devenus une source potentielle de traitements contre la tuberculose. Considérant les différents résultats obtenus jusqu'à présent, les extraits d'*Actiniopteris radiata*, *Allium sativum*, *Aristolochia brevipes*, *Callophyllum brasiliense*, *Cassia fistula*, *Leucas marrubioides*, *Quercus infectoria* et *Syzygium aromaticum* ont présenté une concentration inhibitrice minimale (CMI) importante, inférieure à 25 µg / ml, contre des souches de *M. tuberculosis*. D'autre part, le Tableau I.2 montre les principaux composés isolés des plantes qui ont un potentiel antituberculeux relevant, avec une CMI inférieure à 10 µg / ml. Par exemple, la N-oxyde d'oridine (*Allium stipitatum*) et la bidebiline E (*Polyalthia cerasoides*) ont montré des activités contre la souche H37Rv. En plus, l'éthyl-p-méthoxycinnamate (*Kaempferia galanda*) a montré une CMI *in vitro* de 0.485 et 0.242 mM contre les souches H37Ra et H37Rv, respectivement. Cette activité antituberculeuse est similaire à celle-là montrée par des principes actifs antituberculeux utilisés dans des médicaments brevetés. D'autres composés, par exemple, la bisnordihydroxiférine (*Strychnos mitscherlichii*) et la 7 α -acétoxy-6 β -hydroxyleanone (*Plectranthus grandidentatus*), présentent une activité antituberculeuse significative contre les souches de *M. tuberculosis* résistants aux

médicaments de premier choix. Globalement, les extraits de plantes et les composés isolés ouvrent une opportunité importante pour être appliqués dans des schémas thérapeutiques ou comme des coadjuvants de médicaments existants pour augmenter l'efficacité de la lutte contre la tuberculose. Cependant, pour leur application chez l'homme, ces actifs doivent être formulés, ce qui représente certaines limitations et difficultés qui sont mentionnées tout au long de ce travail.

Le Chapitre II concerne une revue de la littérature sur la formulation des produits naturels, comme, des extraits de plantes, des huiles essentielles et des composés isolés dans des systèmes particuliers pharmaceutiques dans le but de protéger, administrer, biodiriger et augmenter les activités biologiques que ces produits naturels présentent sous leur forme libre. Des formulations basées sur des nanoparticules lipidiques solides, des cyclodextrines et des nanoparticules polymériques, parmi d'autres, ont démontré d'importantes activités biologiques, par exemple, antioxydantes, antifongiques, antibactériennes, anticancéreuses, de conservation alimentaire et cosmétique dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Particulièrement, en raison de leurs propriétés physicochimiques, les NP sont choisis pour la formulation d'extraits de plantes, permettant une administration thérapeutique par différentes voies, ainsi qu'une augmentation de leur activité biologique. Par exemple, des extraits de *Polygala senega* et de *Garcinia mangostana*, avec une activité anticancéreuse potentielle, ont été encapsulés dans des NP montrant des résultats *in vitro* importants. Des formulations comme les précédentes permettent d'établir que l'incorporation des extraits de plantes aux NP pourrait augmenter leur potentiel thérapeutique et leur application par diverses voies (par exemple, orale, intraveineuse ou pulmonaire) dans des nouveaux schémas du traitement de la TB.

Le Chapitre III décrit le design et le développement d'une nanomédecine à partir de NP biodégradables et d'un principe actif de deuxième ligne, la clofazimine. C'est un principe actif hautement lipophile, ce qui limite son absorption et, par conséquent, son administration pendant des périodes prolongées, comme dans le cas des schémas thérapeutiques de la TB. Dans le but d'obtenir une nanomédecine permettant l'application intraveineuse et la libération prolongée de la clofazimine, des NP ont été élaborées à partir d'un polymère biodégradable, l'acide polylactique (PLA) et, ensuite, leur activité *in vitro* contre *M. tuberculosis* H37Rv a été évaluée. La nanoformulation contenant la clofazimine a donné une taille de particules de 170 ± 20 nm, une distribution de taille uniforme et un potentiel zêta de $-18,80 \pm 6,60$ mV. Pour la détermination de la quantité de principe actif encapsulé, une méthode de quantification par chromatographie liquide haute performance (CLHP) a été développée et validée. Cette méthode a permis d'établir un pourcentage d'encapsulation de $2,05 \pm 0,20$ et une efficacité d'encapsulation de $62,50 \pm 2,16\%$. Dans l'analyse du profil thermique par calorimétrie différentielle à balayage (CDB), au cas des NP chargées, l'absence d'un endotherme caractéristique pour le point de fusion de la clofazimine nous a fait supposer que ces molécules sont probablement dans un état amorphe dans le NP, immergé dans le réseau complexe du polymère avec un accommodement aléatoire dans le système. De son côté, l'analyse par spectroscopie infrarouge (FT-IR) de la formulation a suggéré qu'il n'y a pas de formation de nouveaux composés à partir des composants du NP, ce qui indique qu'il n'y a qu'une interaction chimique entre les composés formant le système. L'évaluation de la libération *in vitro* du principe actif réalisée pendant 28h, a montré une libération de 50% jusqu'à 5h. Par la suite, une libération finale de 73% de la clofazimine a été obtenue à partir des NP (5 à 28h). Concernant l'évaluation *in vitro* de la nanomédecine contre *M. tuberculosis*, il a été

montré que l'encapsulation de la clofazimine augmente son activité antituberculeuse en enregistrant une diminution de la CMI à 123 ng/ml en comparaison à celle du médicament libre (136 ng/ml). Enfin, lorsque les NP-clofazimine ont été lyophilisées pour leur conservation, elles ont retrouvé leur taille d'origine et ont montré une grande stabilité au stockage pendant 2 ans. Finalement, à partir des résultats de cette étape de la thèse, il est possible d'affirmer que la nanomédecine élaborée à base de PLA et de la clofazimine a potentiellement un grand intérêt pour être utilisée dans le traitement de la TB.

Le Chapitre IV traite sur le design et le développement de trois formulations des NP (biodégradables et non biodégradables) contenant l'extrait méthanolique de la feuille de *Schinus molle*, lesquelles pourraient être utilisées comme des adjuvants dans le traitement de la tuberculose. Des études faites ultérieurement ont montré que des extraits de *S. molle* avaient une activité potentielle contre *M. tuberculosis* H37Rv ; cependant, en raison du mélange complexe des molécules contenues dans un extrait végétal et de la présence du solvant organique, son dosage et son application *in vivo* et *in vitro* est considérablement difficile. Afin de développer des formulations permettant l'application orale, intraveineuse ou pulmonaire de l'extrait méthanolique de feuilles de *S. molle*, des formulations à base de deux polymères biodégradables (PLA et l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA)) et un polymère non biodégradable (Eudragit® L100-55) ont été conçues, élaborées et caractérisées. Les NP chargées d'extrait végétal présentaient une taille comprise entre 180 et 230 nm, une distribution de taille uniforme et un potentiel zêta légèrement négatif (entre -14 et -22 mV). Le profil chromatographique de l'extrait végétal brut et encapsulé a été obtenu par HPLC, permettant d'établir pour celui-ci des pourcentages d'encapsulation compris entre 33 et 45%, dans les trois nanoformulations. L'analyse morphologique par MEB a montré

des NP avec une forme sphérique et a confirmé la taille et la distribution uniforme de taille déterminées précédemment. L'analyse par calorimétrie différentielle à balayage, a permis d'établir que dans la formulation de polymère biodégradable (PLGA), les composés de l'extrait ont été incorporés à l'état amorphe ou dispersés dans la matrice du polymère. Cependant, dans le cas de la formulation des NP non biodégradables (EL100-55), les composés pourraient être dans un état cristallin dans le réseau polymère. L'analyse par spectroscopie infrarouge a aussi permis d'établir qu'il est possible que l'encapsulation de l'extrait soit sélective (seuls quelques composés ont été incorporés) dans chacune des formulations. Dans l'évaluation *in vitro* de l'activité antituberculeuse des nanoformulations, il a été déterminé que l'activité de l'extrait végétal encapsulé augmentait de 2 à 4 fois par rapport à celle de l'extrait libre, obtenant une CMI comprise entre 30 et 44 µg/ml. En général, la taille nanométrique des formulations pourrait favoriser l'internalisation et l'accumulation de l'extrait dans la mycobactérie. D'autre part, le profil de libération *in vitro* de l'extrait dans différentes formulations a montré un effet d'éclatement initial (0 à 3h) et une libération prolongée subséquente de l'extrait jusqu'à 28h du test. Enfin, les essais de toxicité *in vivo* avec le crustacé *Artemia salina* et *in vitro* avec les érythrocytes humains ont montré que l'encapsulation de l'extrait de *S. molle* dans des NP a permis de diminuer considérablement la toxicité du produit naturel en augmentant sa biocompatibilité avec les organismes (*A. salina*) ou les cellules humaines (érythrocytes).

Ces résultats ont montré que ces nanoformulations permettent d'utiliser les extraits de *S. molle* par différentes voies et pourront être utilisés comme adjuvants dans le traitement de la TB.

Les conclusions du travail sont détaillées à la fin du manuscrit.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La TB es una enfermedad con altastasas de incidencia y número de muertes. Aunado a esto, el desarrollo de cepas de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes complican la atención y seguimiento de la infección. En este sentido, diversas organizaciones de salud pública nacionales e internacionales señalan la gran importancia y problema de salud que representa la TB en todo el mundo. Recientemente, la OMS dio a conocer su estrategia “Un mundo sin tuberculosis”, en la cual señala de manera puntual la necesidad de generar nuevo conocimiento científico e innovaciones que permitan eficientizar el tratamiento que se sigue en la enfermedad. En este contexto, el desarrollo de nanomedicinas a base de NP y fármacos existentes, o el desarrollo de coadyuvantes en nanoformulaciones representan dos de las opciones más innovadoras y prometedoras para dicho fin. Así, en el presente trabajo de investigación, se propuso, por un lado, la elaboración de una formulación de NP biodegradables con un fármaco de segunda línea (clofazimina) con potencial aplicación dentro de los esquemas terapéuticos que se tienen establecidos contra la TB; por otro lado, se desarrollaron formulaciones a partir de NP y extractos naturales obtenidos de *Schinus molle* para su potencial aplicación oral, intravenosa o pulmonar, las cuales podrían ser empleadas como coadyuvantes en el tratamiento de la TB.

HIPÓTESIS

La encapsulación de un extracto natural (*Schinus molle* L.) y de un fármaco antituberculoso (clofazimina) en nanopartículas poliméricas potenciará su actividad antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar, elaborar y evaluar la actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* de nanopartículas poliméricas que contengan al fármaco clofazimina y/o el extracto de *Schinus molle* L. para determinar su potencial uso en los esquemas de tratamiento de la tuberculosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener extractos de *Schinus molle* L. por método de soxhlet/maceración y realizar su caracterización fitoquímica y fisicoquímica.
2. Desarrollar formulaciones con el extracto de *Schinus molle* L. en nanopartículas poliméricas y caracterizarlas fisicoquímicamente en función de la medición de tamaño de partícula e índice de polidispersidad, porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación, perfil calorimétrico, perfil de liberación *in vitro*, análisis por espectroscopía de infrarrojo y microscopía electrónica de barrido.
3. Diseñar, desarrollar y caracterizar una formulación del fármaco clofazimina en nanopartículas poliméricas y caracterizarla fisicoquímicamente en función de la medición de tamaño de partícula e índice de polidispersidad, porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación, perfil calorimétrico, perfil de liberación *in vitro* y análisis por espectroscopía de infrarrojo.
4. Evaluar la actividad antibacteriana contra *M. tuberculosis* de las formulaciones de nanopartículas poliméricas (con fármaco o extracto) por medio de la técnica de azul de alamar.
5. Evaluar la actividad citotóxica de los productos naturales y sus nanoformulaciones por medio de la determinación de la CL₅₀ utilizando el modelo de *Artemia salina* y el índice de citotoxicidad por el ensayo de hemólisis en eritrocitos humanos.

CAPÍTULO I:

PRODUCTOS NATURALES CONTRA LA TUBERCULOSIS

PRODUCTOS NATURALES CONTRA LA TUBERCULOSIS

1.1 Introducción

Históricamente, la TB ha sido una de las infecciones más antiguas. La TB es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, y se contagia por medio del aire. Afecta principalmente los pulmones; no obstante, otros órganos pueden verse comprometidos durante la enfermedad (Bhatia, Sujata K., 2010).

Mundialmente, la TB continúa siendo una de las principales infecciones, afectando alrededor de 9 millones de personas y causando la muerte de al menos 2 millones al año (World Health Organization, 2017a). Particularmente, México es uno de los países con mayor prevalencia en Latinoamérica, registrando alrededor de 16,913 casos nuevos y 2,125 muertes anuales (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades - CENAPRECE, 2017).

El tratamiento de la TB incluye el uso de múltiples fármacos de primera línea que incluyen a la rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), isoniazida (INA) y etambutol (ETO) durante un período prolongado de tiempo, que va de los 6 meses hasta los 2 años (Horsburgh, Barry, & Lange, 2015). Debido a lo anterior, el régimen terapéutico para el control de la TB se torna de carácter altamente estricto (World Health Organization, 2017b). Además, el uso indiscriminado de antibióticos sin la vigilancia médica adecuada y el abandono del tratamiento por parte del paciente ha generado a su vez, una problemática importante, el desarrollo de cepas de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes (MT-MDR) (American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention, & Diseases Society of America, 2003).

Las cepas de MT-MDR a los fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la TB están ampliamente distribuidas en todo el mundo (World Health Organization, 2016). En pacientes que presentan infecciones a causa de esta clase de cepas se opta por utilizar fármacos antituberculosos de segunda línea, los cuales incrementan de sobremanera el costo del tratamiento global y presentan una serie de efectos adversos más severos (Laurenzi, M., Ginsberg, A., & Spigelman, M., 2007). En conjunto, este tipo de microorganismos dificultan aún más el tratamiento y la erradicación completa de la TB en todo el mundo, por lo que, la problemática se ha convertido en un aspecto prioritario dentro de los esquemas de salud pública para instituciones como la OMS, la cual, recientemente dio a conocer su estrategia mundial “*Un mundo libre de*

tuberculosis” con miras a ser cumplida para el año 2035. La estrategia hace énfasis en la generación de nuevos conocimientos científicos e innovaciones que permitan mejorar los esquemas terapéuticos para el tratamiento de dicha infección (World Health Organization, 2017c).

Por su parte, los productos naturales han jugado un rol importante en el desarrollo de terapias clínicas para diversas infecciones. Muchos de los fármacos comúnmente utilizados son derivados de un producto natural. El descubrimiento del fármaco antimalárico artemisinina y el agente anticancerígeno taxol, establecen la importancia de las plantas en el descubrimiento de nuevos fármacos (Lahlou, 2013). Particularmente, en materia de la TB, dos de los principales fármacos utilizados en el tratamiento, la RIF y la INA, son los compuestos sintéticos derivados de productos naturales, la nicotinamida (amida de la vitamina B₃) y la rifamicina, respectivamente (Maggi, Pasqualucci, Ballotta, & Sensi, 1966). Sólo una pequeña proporción de especies vegetales han sido investigadas formalmente debido a sus propiedades medicinales, por lo que, esta área de estudio representa una fuente prometedora de nuevos agentes terapéuticos contra la TB (Negi, Kumar, Luqman, Saikia, & Khanuja, 2010). De manera puntual, dos de los productos naturales que se han estudiado con mayor interés son los extractos naturales y sus metabolitos secundarios aislados con potencial actividad antituberculosa, los cuales son obtenidos en su mayoría de plantas.

En particular, en este capítulo se aborda una revisión bibliográfica detallada, tanto de extractos naturales, como de compuestos aislados de plantas con potencial actividad antituberculosa.

1.2 Extractos naturales obtenidos de plantas con potencial actividad antituberculosa

Un buen número de extractos naturales obtenidos de plantas, microorganismos y organismos marinos han exhibido importante actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis*. La Tabla I.1 muestra diferentes estudios de extractos vegetales que fueron evaluados en base a su potencial para inhibir diferentes cepas de *M. tuberculosis*. En la Tabla se detalla el nombre científico de la planta, el tipo de extracto (en base al solvente utilizado para su elaboración), la cepa empleada del microorganismo y la actividad antituberculosa *in vitro* (CMI).

Particularmente, los extractos naturales obtenidos de plantas se han vuelto un aspecto importante a estudiar como fuente potencial de tratamientos contra la TB. Dentro de

los diversos estudios realizados hasta el momento, los extractos de *Actiniopteris radiata*, *Allium sativum*, *Aristolochia brevipes*, *Callophyllum brasiliense*, *Cassia fistula*, *Leucas marrubioides*, *Quercus infectoria* y *Syzygium aromaticum* han presentado una prometedora CMI contra cepas de *M. tuberculosis*, obteniendo valores por debajo de los 25 µg/ml, lo que los coloca como fuentes importantes de compuestos con actividad antituberculosa, los cuales, podrían ser empleados dentro de nuevos esquemas terapéuticos para esta importante enfermedad.

Tabla I.1. Extractos naturales obtenidos de plantas con potencial actividad antituberculosa *in vitro*.

Planta	Parte utilizada	Solvente de extracto	Cultivo (cepa)	CMI (µg/ml)	Ref.
<i>Actinopterygis radiata</i> Linn.	Toda la planta	Hexano, Cloroformo y Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5, 3.125 y 25, respectivamente.	Munna <i>et al.</i> , 2014
<i>Allium sativum</i>	Bulbo	Dietil éter	<i>M. tuberculosis</i>	0.5	Jain, 1998
<i>Alnus rubra</i> Bong	Corteza	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Alstonia scholaris</i>	Fruto y Corteza	Butanol	<i>M. tuberculosis</i>	500 y 100, respectivamente.	Antony <i>et al.</i> , 2012
<i>Amphipterygium adstringens</i> (Schldl.) ex Standl.	Corteza	Diclorometano/Metanol (1:1)	<i>M. tuberculosis</i>	50	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005
<i>Andrographis paniculata</i>	Toda la planta	Hexano/Metanol (1:5)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (sensible y MDR)	250	Prabu <i>et al.</i> , 2015
<i>Aristolochia brevipes</i> Benth.	Rizoma	Diclorometano	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5	Navarro-García, Luna-Herrera, Rojas-Bribiesca, Alvarez-Fitz, & Ríos, 2011
<i>Aristolochia taliscana</i> Hook. & Arn.	Raíz	Hexano	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	50	León-Díaz <i>et al.</i> , 2010
<i>Balsoamorhiza sagittata</i> Pursh Nutt	Raíz	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Bidens pilosa</i> L.	Hoja	Etanol	<i>M. tuberculosis</i>	100	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Callophyllum brasiliense</i> Cambess.	Hoja	Diclorometano/Metanol (1:1)	<i>M. tuberculosis</i>	3.02	Gomez-Cansino <i>et al.</i> , 2015
<i>Cassia fistula</i> Linn.	Raíz	Etanol (95%)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5	Channabasappa, Shrinivas, & Venkatrao, 2015
<i>Chaenactis douglasii</i> Hook	NE	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Chrysactinia mexicana</i> A. Gray	Raíz	NE	<i>M. tuberculosis</i> (resistente)	62.5	Molina-Salinas <i>et al.</i> , 2007

<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Cáscara de fruto	Hexano	<i>M. tuberculosis</i> (resistente INA y ETO)	25 y 50, respectivamente.	Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2008
<i>Empetrum nigrum</i> L.	Vástago	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Erigeron strigosus</i> Muhl.	Raíz	Diclorometano	<i>M. tuberculosis</i>	100	Cantrell, Fischer, Urbatsch, McGuire, & Franzblau, 1998
<i>Geum macrophyllum</i> Wild. var. <i>macrophyllum</i>	NE	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Glehnia littoris</i> F. Schmidt ssp	Raíz	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Heracleum maximum</i> Bartr.	Raíz	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Hypericum elodes</i>	Aérea	Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA, RIF, ETO)	25-50	Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypericum foliosum</i>	Aérea	Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA, RIF, ETO)	25-50	Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypericum grandifolium</i>	Aérea	Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA, RIF, ETO)	25-51	Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypericum hircinum</i> subsp. <i>majus</i>	Aérea	Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA, RIF, ETO)	25-52	Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypericum humisufum</i>	Aérea	Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA, RIF, ETO)	25-53	Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<i>Inula helenium</i> L.	Raíz	Diclorometano/Hexano	<i>M. tuberculosis</i>	100	Cantrell <i>et al.</i> , 1998
<i>Juniperus communis</i> L.	NE	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Larrea divaricata</i> Cav.	NE	Diclorometano/Metanol (1:1)	<i>M. tuberculosis</i>	50	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005

<i>Leucas marrubioides</i>	Raíz	Éter de petróleo, Cloroformo y Metanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5, 50 y 100, respectivamente.	Gowrish, Vagdevi, & Rajashekar, 2015
<i>Lomatium dissectum</i> Nutt	Raíz	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Magnolia acuminata</i>	Corteza	Diclorometano	<i>M. tuberculosis</i>	100 (disco)	Cantrell <i>et al.</i> , 1998
<i>Moneses uniflora</i> L.	Aérea	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Nuphar lutea</i> L.	Rizoma	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Olea europaea</i> L.	Hoja	Hexano	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA)	25	Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2008
<i>Oplopanax horridus</i> Smith Miq.	Corteza interior	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	10 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Quercus infectoria</i>	Semilla	Éter de petróleo, Cloroformo y Metanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5, 50 y 100, respectivamente.	Sheeba, Gomathi, & Citarasu, 2015
<i>Panax ginseng</i>	Raíz	Metanol, Etanol, Éter	<i>M. tuberculosis</i>	500, 500 y 100, respectivamente.	Chang, Tasaka, Kuwabara, Watanabe, & Matsuo, 1979
<i>Persea americana</i> Mill.	Hoja	Hexano	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv	125 y 62, respectivamente.	Gomez-Flotes <i>et al.</i> , 2008
<i>Phoradendron coryae</i>	NE	Diclorometano/Metanol (1:1)	<i>M. tuberculosis</i>	50	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005
<i>Phoradendron tomentosum</i>	NE	Diclorometano/Metanol (1:1)	<i>M. tuberculosis</i>	50	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005
<i>Pinus contorta</i>	NE	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Piper nigrum</i> L.	Semilla	Acetona	<i>M. tuberculosis</i> (sensible y MDR)	100	Kaur & Kaur, 2015
<i>Populus tremuloides</i>	NE	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
Propóleo	Resina	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	128	Valcic <i>et al.</i> , 1999
<i>Punica granatum</i>	Fruto	Metanol	<i>M. tuberculosis</i> (MDR y XDR)	64 y 512, respectivamente.	Dey, Ray, & Hazra, 2015

<i>Syzygium aromaticum</i>	Brotes	Metanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0.8	Kaur & Kaur, 2015
<i>Urtica dioica</i>	Hoja	Metanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	250	Singh, Hussain, Verma, & Sharma, 2013

NE= No Especificado.

1.3 Compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antituberculosa

Diversos compuestos naturales antituberculosos han sido aislados a partir de plantas distribuidas por todo el mundo. Dichos compuestos naturales pueden ser empleados no sólo como agentes antituberculosos dentro de un esquema terapéutico, sino también, pueden ser la estructura base para modificaciones químicas y estructurales que permitan incrementar la actividad biológica de interés. En la Tabla I.2 se muestra una revisión bibliográfica exhaustiva, presentando los principales compuestos aislados a partir de plantas. Se detalla el tipo de compuesto evaluado, fuente de obtención (planta), cepa empleada del microorganismo y la actividad antituberculosa *in vitro* mostrada contra *M. tuberculosis*.

Diversos compuestos aislados de plantas han demostrado CMI contra cepas sensibles de *M. tuberculosis* por debajo de los 10 µg/ml. Como ejemplos, podemos mencionar algunos alcaloides como la N-óxido oiridina y la bidebilina E aislados de *Allium stipitatum* y *Polyalthia cerasoides*, respectivamente, que han mostrado actividad contra la cepa H37Rv. Por su parte, el artocarpin y artonin F aislados del género *Artocarpus* presentan importante actividad contra la cepa H37Ra. Las beilschmina B y D, obtenidas de *Beilschmiedia tsanguii* presentaron actividad antituberculosa importante (CMI=2.5 y 7.5 µg/ml, respectivamente) contra aislados clínicos de *M. tuberculosis* (cepa 90-221387). Compuestos flavonoides obtenidos de *Derris indica* presentan una CMI de 6.25 µg/ml contra *M. tuberculosis* H37Rva. La feruitiramina (*Litsea hypophaea*) inhibe a *M. tuberculosis* a una concentración de 1.6 µg/ml. Además, diversos sesquiterpenos aislados de *Camchaya calcarea* (p.e. goyazansólido, centraterino, lichnoforolido B, isocentraterino, entre otros) presentaron actividad antituberculosa igualmente importante.

Por su parte, otros compuestos aislados han demostrado actividad antituberculosa similar a fármacos antituberculosos contra cepas sensibles. Por ejemplo, el etil p-metoxicinamato (*Kaempferia galanga*) mostró una CMI *in vitro* de 0.485 y 0.242 mM contra las cepas H37Ra y H37Rv, respectivamente. La α-mangostina (*Garcinia mangosta*) presentó una CMI=15.24 µM contra tuberculosis. De manera relevante, especies del género *Rumex* contienen compuestos como el rumexmepósido A, la toracrisona y otros glucopiranosidos, los cuales han presentado CMI de 4.1 a 26.6 µM contra *M. tuberculosis* H37Rv. Por su parte, compuestos como el mutagino, el

orbiculino G y el tripogelino G-2 aislados de *Microtropis fokienensis* mostraron CMI en orden de micromoles contra la cepa 90-221387 (aislado clínico). Esteroides como la β -sitostenona (*Radermachera boniana*) presentó una CMI=39.5 μ M contra H37Rv.

Particularmente, los compuestos aislados con importante actividad antituberculosa en cepas MDR son de gran interés. Así, la bisnordihidroxi-ferina (*Strychnos mitscherlichii*) presentó una CMI=6.25 μ g/ml contra *M. tuberculosis* H37Rv MDR. De igual manera, el diterpeno 7 α -acetoxi-6 β -hidroxileanona (*Plectranthus grandidentatus*) mostró una CMI=3.12 μ g/ml contra la misma cepa.

Cabe mencionar, que la principal ventaja de tener compuestos aislados de fuentes naturales bien definidos (química y estructuralmente) con actividad antituberculosa importante es que su síntesis química y producción a gran escala se vuelve potencialmente viable en un período corto de tiempo y, por lo tanto, su formulación y comercialización dentro de esquemas terapéuticos de la TB representa un área de oportunidad relevante para las industrias farmacéuticas.

Tabla I.2. Compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antituberculosa *in vitro*.

Tipo de Compuesto	Nombre de Compuesto	Planta	Cultivo (cepa)	CMI (µg/ml)	Ref.
ALCALOIDES	N-oxido piridina	<i>Allium stipitatum</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1.25	O'Donnell <i>et al.</i> , 2009
	6-metoxidihidrochelirubina	<i>Bocconia arborea</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5	Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2009
	6-metoxihidrochelirubina				Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2009
	3-formilcarbazon	<i>Clausena excavata</i>	<i>M. tuberculosis</i>	100	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	3-methoxycarbonylcarbazon				Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	2-hidroxi-3-formil-7-metoxycarbazon				Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	Clausolina J				Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	7-hidroxiimuconal	<i>Clausena harmandiana</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	2.5	Thongthoom, Songsiang, Phaosiri, & Yenjai, 2010
	Criptolepina HCl	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	<i>M. tuberculosis</i>	100	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	(-)-Nordicentrina	<i>Goniothalamus laoticus</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	12.5	Lekphrom, Kanokmedhakul, & Kanokmedhakul, 2009
	4-metoxi-2-fenilquinolina	<i>Lunasia amara</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	16	Aguinaldo <i>et al.</i> , 2007
	Graveolina				
	Kokusagina				
	Bisnordihidroxi-ferina	<i>Strychnos trinervis</i>	<i>M. tuberculosis</i> 607 IA-82	30-40	Melo, Santos, Chiappeta, de Mello, & Mukherjee, 1987
Bisnordihidroxi-ferina	<i>Strychnos mitscherlichii</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y MDR	12.5 y 6.25, respectivamente	Aponte <i>et al.</i> , 2008	

Beilschmina D					7.5	
Dihidromonospermosido					25-100	Chokchaisiri <i>et al.</i> , 2009
Flavonoides (NN)	<i>Butea monosperma</i>			<i>M. tuberculosis</i> H37Ra		
Dentatina		<i>Clausena excavata</i>		<i>M. tuberculosis</i>	50	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
Nor-dentatina					100	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
Punicalagina		<i>Combretum molle</i>		<i>M. tuberculosis</i>	0.6	Astes <i>et al.</i> , 2001
Demetoxicureumina		<i>Curcuma longa</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	200	Agrawal <i>et al.</i> , 2008
Pinocembrina					12.5	
Dalparvona		<i>Dalbergia parviflora</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	50	Songsiang <i>et al.</i> , 2009
Dalparvineno					50	
Flavonoides (NN)					6.25-25	
Demetoxicanugina					50	
3,7-dimetoxiflavona					50	
Laqueolatina B					50	Koysomboon, van Altna, Kato, & Chantrapromma, 2006
Mackiaina		<i>Derris indica</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	50	
Caranjacromeno					12.5	
Pinatina					12.5	
Conclonginol A					25	
Conclonginol B					50	
Conclonginol H					25	
Lupinifolinol					25	Sutthivaayakit <i>et al.</i> , 2009
Dehidrolupinifolinol				<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	12.5	
Flemiquina					12.5	
Eriosemaona A		<i>Eriosema chinense</i>			12.5	

Lupinifolina					12.5	Rukachaisirikul, Saekee, Tharibun, Watkuolham, & Suksamrarn, 2007
Flavonoides varios	<i>Erythrina stricta</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Ra		12.5-50	
Espoletina	<i>Fatoya pilosa</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		18	Chiang, Cheng, Peng, Huang, & Chen, 2010
Isobavachalcona					18	
Bifenilos (NN)	<i>Garcinia linnii</i>		<i>M. tuberculosis</i> 90-221387		50	Chen, Peng, Huang, & Chen, 2006
Xantonas (NN)					52.3	
Glabridin	<i>Glycyrrhiza glabra</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y H37Ra		29.16	Gupta <i>et al.</i> , 2008
Perforamono B	<i>Harrisonia perforata</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Ra		25	Tuntiwachwuttikul, Phansa, Pootaeng-On, & Taylor, 2006b
Perforamono D					25	
Chaconas (NN)	<i>Helichrysum melanacme</i>		<i>M. tuberculosis</i>		0.05	Lall, Hussein, & Meyer, 2006
Etil p-metoxicinamato	<i>Kaempferia galanga</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Ra		0.485 mM	Lakshmanan <i>et al.</i> , 2011
Malabaricona A	<i>Knema glauca</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		0.242 mM	
Dodecanoilfloroglucinol					25	Rangkaew, Suttisri, Moriyasu, & Kawanishi, 2009
Feruloitramina	<i>Litsea hypophaea</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		50	
Quimona (NN)	<i>Psychotria camponutans</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		1.6	Pan <i>et al.</i> , 2010
Plicatina B	<i>Senecio mathews</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		12.5	Solis <i>et al.</i> , 1995
Cromeno werneria					32	Hong, Minter, Franzblau, & Reinecke, 2008
					50	
Aloe-emodina	<i>Stephania dinklagei</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		6.25	Camacho, Kirby, Warhurst, Croft, & Phillipson, 2000; Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2009
Pinostrobin	<i>Teloxis graveolens</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		12.5	Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2009

XANTONAS, NAFTALENOS, QUINONAS, ANTRACENOS Y ANTRAQUINONAS	Desacetilpiramidaglaina D	<i>Aglaia forbesii</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Joycharat, Greger, Hofer, & Saifah, 2007
	Bauhinoxepina J	<i>Bauhinia purpurea</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	24	Boonpong <i>et al.</i> , 2007
	Eritrofloin C	<i>Beilschmiedia erythrophloia</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	50	Yang, Cheng, Peng, Chen, & Chen, 2009
	Globiferina	<i>Cordia globifera</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.2	Dettrakul, Surenum, Rajviroongit, & Kittakoop, 2009
	Cardiacromo C			1.5	
	Cardiacromo B			12.5	
	Eretiquinona	<i>Ehretia longiflora</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	25	Chien, Peng, Lin, Chen, & Tsai, 2010
	Engelarquinona	<i>Engelhardia roxburghiana</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	20	Lin <i>et al.</i> , 2005; Wu <i>et al.</i> , 2007
	2-metoxijuglona			30	
	3-metoxijuglona			3.125	
	7-metiljuglona	<i>Euclaea natalensis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, WC64/02, WH51/02	0.5	Bapela, Lall, Fourie, Franzblau, & Van Rensburg, 2006
	α -mangostina	<i>Garcinia mangosta</i>	<i>M. tuberculosis</i>	15.24 μ M	Arunrattiyakorn, Suksamrarn, Suwannasai, & Kanzaki, 2011
	(+)-altolactona	<i>Goniothalamus laoticus</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.25	Lekphrom <i>et al.</i> , 2009
	Howiinin A				
	Perforamona B	<i>Harrisonia perforata</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Tuntiwachwuttikul <i>et al.</i> , 2006b
	Perforamona D			25	
	Peucin-7-metileter			50	
Greveicromenol	50				
Litsecolido L	<i>Litsea hypophaea</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	25	Pan <i>et al.</i> , 2010	
α -tocospiro A	<i>Parashorea lucida</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	30	Chen <i>et al.</i> , 2010	

	α -tocospiro B				50	
	α -tocopherilquinona				25	
	Rumexnepósido A				20.7 μ M	Liang <i>et al.</i> , 2010
	Toracrisona				6.1 μ M	
	Nepodin-8-O- β -D-glucopiranósido	<i>Rumex nepalensis</i>			26.6 μ M	
	Toracrisona-8-O- β -D-glucopiranósido	<i>Rumex hastatus</i>			8.9 μ M	
	Crisofanol-8-O- β -D-glucopiranósido				4.1 μ M	
ALCANOS, ÁCIDOS GRASOS ACETILÉNICOS Y CADENA-RAMIFICADOS	Polino	<i>Angelica sinensis</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	25.3	Deng <i>et al.</i> , 2008
	Cerebrosido (NN)	<i>Euphorbia platyphyllos</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	40	Cateni, Zilic, & Zacchigna, 2008
	Ácido exocárpico	<i>Exocarpus latifolius</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	20	Koch <i>et al.</i> , 2009
	Antihelminticina A				5.54	
	Antihelminticina B				16.7	
	Antihelminticina C	<i>Hydrocarpus anthelmintica</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	4.38	Wang <i>et al.</i> , 2010
	Ácido chaulmoogrico				9.82	
	Etil chaulmoogrico				16.8	
	Ácidos 11-hidroxihexadecanoicos (ácido tiriantínico 1, 2, 8, 9)	<i>Ipomoea tyrianthina</i>		<i>M. tuberculosis</i>	25	León-Rivera <i>et al.</i> , 2008
	γ -lactona micróido (-)-(NN)	<i>Micromelum hirsutum</i>		<i>M. tuberculosis</i>	1.5	Ma <i>et al.</i> , 2005
	Oplopandiol polino	<i>Oplopanax horridus</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	61.5	Inui <i>et al.</i> , 2010
	Ácido octadeca-9,11,1-trinóico	<i>Polyalthia cerasoides</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	50.2	
					6.25	Kanokmedhakul <i>et al.</i> , 2007

Debilisona B	<i>Polyalthia debilis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Panthama, Kanokmedhakul, & Kanokmedhakul, 2010		
			12.5			
			25			
Poliacetileno furanoide		<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.25	Panthama <i>et al.</i> , 2010		
AROMÁTICOS SIMPLES, CROMENOS Y BENZOFURANOS	Alliodorin	<i>Cordia globifera</i>	12.5	Dettrakul <i>et al.</i> , 2009		
	Elaeagina					
	Cordiacromeno					
	Alcano aromático (NN)	<i>Piper sarmentosum</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Tuntiwachwuttikul <i>et al.</i> , 2006a	
	Metil 7-metoxianodendroato	<i>Zanthoxylum wutaiense</i>		35		
	7-metoxiwutaiifuranal			35	Huang <i>et al.</i> , 2008	
Wutaiensal			30			
TERPENOS	Suberosol B	<i>Beilschmiedia erythrophloia</i>	28.9	Yang <i>et al.</i> , 2009		
					Goyazansólido	3.1
					Centraterino	3.1
	Lichnoforolido B	<i>Camchaya calcarea</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.2	Vongvanich <i>et al.</i> , 2006	
	Isogoyazansólido			1.5		
	Isocentraterino			3.1		
	5-epiisogoyazensólido			3.1		
	5-epiisocentraterino			3.1		
	Germacrano			50		
	Farnesol	<i>Chamaedora tepejilote</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	8	INI, 1994	

	Longifoleno	<i>Juniperus communis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	92.4	Gordien, Gray, Franzblau, & Seidel, 2009
	Farnesol	<i>Leucas volkensii</i>	<i>M. tuberculosis</i>	8	Rajab, Cantrell, Franzblau, & Fischer, 1998
	Sesquiterpenos dihidroagarofuranoides (NN)			15.8-19.5 µM	
	Mutagino	<i>Microtropis fokienensis</i>	<i>M. tuberculosis</i> 90-221387	51.8 µM	Chen, Chou, Peng, Chen, & Yang, 2007
	Orbiculino G			14.6 µM	
	Tripogelino G-2			26 µM	
	15-acetoxiorbicularin G			39.6	
	Salasol	<i>Microtropis japonica</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	28.2	Chen, Yang, Peng, Chen, & Miaw, 2008
	Celahino			30.6	
	α-humuleno	<i>Polyalthia cerasoides</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.25	Kanokmedhakul <i>et al.</i> , 2007)
	Globiferino	<i>Cordia globifera</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.2	Dettrakul <i>et al.</i> , 2009
	Geraniol	<i>Leucas volkensii</i>	<i>M. tuberculosis</i>	64	Rajab <i>et al.</i> , 1998
	Ácido pimarico				
	Ácido 9α,13α-epidioxiabiet-8(14)-en-18-oico	<i>Ansiocihilus harmandii</i>	<i>M. tuberculosis</i>	50	Lekphrom, Kanokmedhakul, & Kanokmedhakul, 2010
	Ácido 15-hidroxiidehidroabiético				
Azorellanona	<i>Azorella compacta</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. tuberculosis</i> CIBIN/UMF 15:99	12.5-25	Molina-Salinas <i>et al.</i> , 2010; Molina-Salinas, Bórquez, Fernández, <i>et al.</i> , 2010	
Azorellanol					
Mulino	<i>Calliandra californica</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. tuberculosis</i> CIBIN/UMF 15:99	25 y 12.5, respectivamente 50 (ambos)	Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 2006	
Escobarina A					
Escobarina B	<i>Calliandra pilosissima</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	38 µM	Chen, Wu, Peng, Chen, & Chu, 2009	
Diterpeno seco-abietano (NN)					

Monoterpenos

Diterpenos

	Ácido calicárpico	<i>Jungermannia exsertifolia</i> subsp. <i>Cordifolia</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	63.6µM	Scher <i>et al.</i> , 2010
	<i>ent</i> -3β-hidroxitrachilobano			61	
	<i>ent</i> -trachiloban-2-oano			50	
	<i>ent</i> -3β-acetoxi-19-hidroxitrachilobano			59	
	<i>ent</i> -trachiloban-17-al			24	
	Totarol	<i>Juniperus communis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	21.1	Gordien <i>et al.</i> , 2009
	(E)-fitol	<i>Leucas volkensii</i>	<i>M. tuberculosis</i>	2	Rajab <i>et al.</i> , 1998
	Fitanol			2	
	(Z)-fitol			2	
	(E)- y (Z)-fitol			2	
Ácido camósico	<i>Salvia africana-lutea</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	28µM	Hussein, Meyer, Jimeno, & Rodriguez, 2007	
Diterpeno labadano (NN)	<i>Orthosiphon labiatus</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	49.9	Hussein <i>et al.</i> , 2007	
Diterpenos tipo jatrofano (NN)	<i>Pendilanthus tithymaloides</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	12.5-50	Mongkolvisut & Sutthivaiyakit, 2007	
7α-acetoxi-6β-hidroxi-leanona	<i>Plectranthus grandidentatus</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y MDR	25 y 3.12, respectivamente	Rijo <i>et al.</i> , 2010	
(E)-fitol	<i>Pourthiaea lucida</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5	Chen <i>et al.</i> , 2010	
Triterpenos	Ácido ursólico	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y H37Rv GFP	256 y 98, respectivamente	Jaki <i>et al.</i> , 2008
	Ácido ursólico + Ácido oleanólico	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y H37Rv GFP	65 y 30, respectivamente	
	Azaradiona	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.25	Maneerat, Laphookhieo, Koysoomboon, & Chantrapromma, 2008
	Escualeno	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	100	Noro <i>et al.</i> , 2008
	Epoxiazaradiona	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Maneerat <i>et al.</i> , 2008
	Tetrahidroxiescualeno	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	10	Noro <i>et al.</i> , 2008

	Hydroperoxycycloartano	<i>Blepharadon nitidum</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	25	Aponle <i>et al.</i> , 2008
	Aegicerino	<i>Clavija procera</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	3.1	Rojas <i>et al.</i> , 2006
	Ácido betulínico	<i>Diospyros decandra</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Nareeboon <i>et al.</i> , 2006
	Triterpeno dimetiléster taraxerano (NN)	<i>Elasterospermum tapos</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	3.1	Pattamadilok & Suttisri, 2008
	Triterpeno seco-taraxano		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	25	
	24,24-dimetil-5 β -tirucall-9(11),25-dien-3-ono	<i>Pandanus tectorius</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	64	Noro <i>et al.</i> , 2008; Tan <i>et al.</i> , 2008
	Ácido boniánico A	<i>Radermachera boniana</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	34.8 μ M	Truong <i>et al.</i> , 2011
	Ácido boniánico B			9.9 μ M	
	Tetrahidroxiescualeno	<i>Rhus taitensis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	10	Antinori & Bock, 1956; Jimenez-Arellanes, Meckes, Ramirez, Torres, & Luna-Herrera, 2003; Noro <i>et al.</i> , 2008; Tan <i>et al.</i> , 2008
	Triterpenos de tipo éster, lupano, ceanotano	<i>Ziziphus cambodiana</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	12.5-50	Rojas <i>et al.</i> , 2006
ESTEROIDES	β -sitosterol			128	
	Cicloartenol	<i>Morinda citrifolia</i>	<i>M. tuberculosis</i>	32	Saludes, Garson, Franzblau, & Aguinaldo, 2002
	Estigmasterol			32	
	Epidiosisterol			2.5	
	Peróxido de ergosterol	<i>Radermachera boniana</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	3.5 μ M	Truong <i>et al.</i> , 2011
	β -sitostenona			39.5 μ M	

NN= No nombre ND= No determinado

1.4 Conclusiones

Existe una amplia y basta información científica dónde se avala el uso de los productos naturales como fuente potencial de nuevos esquemas terapéuticos en materia de la TB. Las investigaciones científicas a nivel mundial se centran en dos aspectos principales: el uso de extractos naturales y compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antituberculosa. Especies vegetales de todo el mundo aportan un número importante y novedoso de extractos antituberculosos. Estas especies representan la principal fuente de moléculas que, en un futuro, podrían ayudar al control y tratamiento de la TB en cualquiera de sus formas (susceptible y MDR). Por su parte, los metabolitos secundarios aislados de plantas presentan una amplia variedad de estructuras químicas, dentro de las que destacan, alcaloides, compuestos fenólicos, terpenos y esteroides, entre otros. La recopilación bibliográfica presentada, muestra de manera importante, la gran fuente de agentes antituberculosos que representan las especies vegetales hoy en día.

En este contexto, tanto los extractos naturales como los compuestos aislados que se obtienen a partir de éstos abren una importante área de oportunidad para ser aplicados dentro de esquemas terapéuticos formales o como coadyuvantes de los fármacos existentes para incrementar la eficiencia de los tratamientos de TB. Sin embargo, para su aplicación en humanos, éstos activos necesitan estar formulados, lo cual presenta ciertas limitantes y dificultades que se abordarán durante los próximos capítulos. Además, es importante establecer bioensayos confiables para evaluar la toxicología y posibles efectos adversos que los extractos y compuestos aislados puedan presentar en organismos mayores.

REFERENCIAS

- Agrawal DK, Saikia D, Tiwari R, Ojha S, Shanker K, Kumar JK, Khanuja SP. 2008. Demethoxycurcumin and its semisynthetic analogues as antitubercular agents. *Planta Medica*, 74(15), 1828–1831.
- Aguinaldo AM, Dalangin-Mallari VM, Macabeo APG, Byrne LT, Abe F, Yamauchi T, Franzblau SG. 2007. Quinoline alkaloids from *Lunasia amara* inhibit *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(6).
- American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention, & Diseases Society of America. 2003. Treatment of Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167, 603–662.
- Antinori F, Bock C. 1956. Activity of squalene on *Mycobacterium tuberculosis in vitro* and *in vivo*. *Rivista Italiana D'igiene*, 16(3–4), 183–187.
- Antony M, James J, Shekhar Misra C, Mundur Sagadevan LD, Veetil AT, Thankamani V. 2012. Anti mycobacterial activity of the plant extracts of *Alstonia scholaris*. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4(1), 40–42.
- Aponte JC, Vaisberg AJ, Rojas R, Caviedes L, Lewis WH, Lamas G, Hammond GB. 2008. Isolation of cytotoxic metabolites from targeted peruvian amazonian medicinal plants. *Journal of Natural Products*, 71(1), 102–105.
- Arunrattiyakorn P, Suksamrarn S, Suwannasai N, Kanzaki H. 2011. Microbial metabolism of α -mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. *Phytochemistry*, 72(8), 730–734.
- Asres K, Bucar F, Edelsbrunner S, Kartnig T, Höger G, Thiel W. 2001. Investigations on antimycobacterial activity of some Ethiopian medicinal plants. *Phytotherapy Research: PTR*, 15(4), 323–326.
- Bapela NB, Lall N, Fourie PB, Franzblau SG, Van Rensburg CEJ. 2006. Activity of 7-methyljuglone in combination with antituberculous drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytomedicine*, 13(9), 630–635.
- Bhatia Sujata K. 2010. Chapter 8: Tuberculosis. In *Biomaterials for Clinical Applications* (First Edition, pp. 167–181). Springer Science Business Media.

- Boonphong S, Baramée A, Kittakoop P, Puangsombat P. 2007. Antitubercular and antiplasmodial prenylated flavones from the roots of *Artocarpus altilis*. *Chiang Mai Journal of Science*, 34(3), 339–344.
- Boonphong Surat, Puangsombat P, Baramée A, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. 2007. Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory, and cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, 70(5), 795–801.
- Camacho MR, Kirby GC, Warhurst DC, Croft SL, Phillipson JD. 2000. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. *Planta Medica*, 66(5), 478–480.
- Camacho-Corona M del R, Favela-Hernández JM de J, González-Santiago O, Garza-González E, Molina-Salinas GM, Said-Fernández S, Luna-Herrera J. 2009. Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 53(2), 71–75.
- Camacho-Corona M del R, Ramírez-Cabrera MA, Santiago OG, Garza-González E, Palacios I de P, Luna-Herrera J. 2008. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytotherapy Research*, 22(1), 82–85.
- Cantrell CL, Fischer NH, Urbatsch L, McGuire MS, Franzblau SG. 1998. Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central, and North America. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 5(2), 137–145.
- Cateni F, Zilic J, Zacchigna M. 2008. Isolation and structure elucidation of cerebrosides from *Euphoria platyphyllos* L. *Scientia Pharmaceutica*, 76, 451–469.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). Cifras Oficiales de Tuberculosis en México. Consulta: 13 de junio 2017, Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html

- Chang MW, Tasaka H, Kuwabara M, Watanabe T, Matsuo Y. 1979. Effects of panax ginseng extracts on the growth of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 28(2), 115–118.
- Channabasappa HS, Shrinivas JD, Venkatrao KH. 2015. Evaluation of antibacterial and antitubercular activity of *Cassia fistula* Linn root. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 6, 82–84.
- Chen JJ, Chou ET, Peng CF, Chen IS, Yang SZ, Huang HY. 2007. Novel epoxyfuranoid lignans and antitubercular constituents from the leaves of *Beilschmiedia tsangii*. *Planta Medica*, 73(6), 567–571.
- Chen JJ, Chou TH, Peng CF, Chen IS, Yang SZ. 2007. Antitubercular dihydroagarofuranoid sesquiterpenes from the roots of *Microtropis fokiensis*. *Journal of Natural Products*, 70(2), 202–205.
- Chen JJ, Lin WJ, Shieh PC, Chen IS, Peng CF, Sung PJ. 2010. A new long-chain alkene and antituberculosis constituents from the leaves of *Pourthiaea lucida*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(3), 717–721.
- Chen JJ, Peng CF, Huang HY, Chen IS. 2006. Benzopyrans, biphenyls and xanthenes from the root of *Garcinia linii* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Medica*, 72(5), 473–477.
- Chen JJ, Wu HM, Peng CF, Chen IS, Chu SD. 2009. seco-Abietane diterpenoids, a phenylethanoid derivative, and antitubercular constituents from *Callicarpa pilosissima*. *Journal of Natural Products*, 72(2), 223–228.
- Chen JJ, Yang CS, Peng CF, Chen IS, Miaw CL. 2008. Dihydroagarofuranoid Sesquiterpenes, a Lignan Derivative, a Benzenoid, and Antitubercular Constituents from the Stem of *Microtropis japonica*. *Journal of Natural Products*, 71(6), 1016–1021.
- Chiang CC, Cheng MJ, Peng CF, Huang HY, Chen IS. 2010. A novel dimeric coumarin analog and antimycobacterial constituents from *Fatoua pilosa*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(7), 1728–1736.
- Chien Y, Peng C, Lin C, Chen I, Tsai I. 2010. Secondary metabolites from the root of *Ehretia longiflora* and their antitubercular activity. *Planta Medica*, 76(12), P436.
- Chokchaisiri R, Suaisom C, Sriphota S, Chindaduang A, Chuprajob T, Suksamrarn A. 2009. Bioactive flavonoids of the flowers of *Butea monosperma*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 57(4), 428–432.

- Deng S, Wang Y, Inui T, Chen SN, Farnsworth NR, Cho S, Pauli GF. 2008. Anti-TB polyynes from the roots of *Angelica sinensis*. *Phytotherapy Research: PTR*, 22(7), 878–882.
- Dettrakul S, Surerum S, Rajviroongit S, Kittakoop P. 2009. Biomimetic transformation and biological activities of Globiferin, a terpenoid benzoquinone from *Cordia globifera*. *Journal of Natural Products*, 72(5), 861–865.
- Dey D, Ray R, Hazra B. 2015. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmaceutical Biology*, 53(10), 1474–1480.
- Encarnación-Dimayuga R, Agúndez-Espinoza J, García A, Delgado G, Molina-Salinas GM, Said-Fernández S. 2006. Two new cassane-type diterpenes from *Calliandra californica* with antituberculosis and cytotoxic activities. *Planta Medica*, 72, 757–761.
- Gomez-Cansino R, Espitia-Pinon CI, Campos-Lara MG, Guzman-Gutierrez SL, Segura-Salinas E, Echeverria-Valencia G, Reyes-Chilpa R. 2015. Antimycobacterial and HIV-1 reverse transcriptase activity of Julianaceae and Clusiaceae plant species from Mexico. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, e183036.
- Gomez-Flores R, Arzate-Quintana C, Quintanilla-Licea R, Tamez-Guerra P, Monreal-Cuevas E, Rodríguez-Padilla C. 2008. Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) leaf extracts and active fractions against *Mycobacterium tuberculosis*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 3(2), 188–194.
- Gordien AY, Gray AI, Franzblau SG, Seidel V. 2009. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 126(3), 500–505.
- Gowrish A, Vagdevi HM, Rajashekar H. 2015. *In vitro* antioxidant and antitubercular activity of *Leucas marrubioides* Desf. root extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(2), 137–142.
- Gupta VK, Fatima A, Faridi U, Negi AS, Shanker K, Kumar JK, Khanuja SPS. 2008. Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 377–380.

- Hong Q, Minter DE, Franzblau SG, Reinecke MG. 2008. Anti-tuberculosis compounds from two Bolivian medicinal plants, *Senecio mathewsii* and *Usnea florida*. *Natural Product Communications*, 3(9), 1337–1384.
- Horsburgh CRJ, Barry CEI, Lange C. 2015. Treatment of Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 373(22), 2149–2160.
- Huang HY, Ishikawa T, Peng, CF, Tsai IL, Chen IS. 2008. Constituents of the root wood of *Zanthoxylum wutaiense* with antitubercular activity. *Journal of Natural Products*, 71(7), 1146–1151.
- Hussein AA, Meyer JJM, Jimeno ML, Rodríguez B. 2007. Bioactive diterpenes from *Orthosiphon labiatus* and *Salvia africana-lutea*. *Journal of Natural Products*, 70(2), 293–295.
- INI. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional mexicana. Consultado Junio 19, 2017, from <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>
- Jain RC. 1998. Anti tubercular activity of garlic oil. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 41(1), 131.
- Jaki BU, Franzblau SG, Chadwick LR, Lankin DC, Zhang F, Wang Y, Pauli GF. 2008. Purity–activity relationships of natural products: the case of anti-TB active ursolic acid. *Journal of Natural Products*, 71(10), 1742–1748.
- Jimenez-Arellanes A, Meckes M, Ramirez R, Torres J, Luna-Herrera J. 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research*, 17(8), 903–908.
- Joycharat N, Greger H, Hofer O, Saifah E. 2007. Flavaglines and triterpenoids from the leaves of *Aglaiia forbesii*. *Phytochemistry*, 69, 206–211.
- Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Lekphrom R. 2007. Bioactive constituents of the roots of *Polyalthia cerasoides*. *Journal of Natural Products*, 70(9), 1536–1538.
- Kaur R, Kaur H. 2015. Antitubercular activity and phytochemical screening of selected medicinal plants. *Oriental Journal of Chemistry*, 31, 597–600.
- Koch M, Bugni TS, Pond CD, Sondossi M, Dindi M, Piskaut P, Barrows LR. 2009. Antimycobacterial activity of *Exocarpos latifolius* is due to exocarpic acid. *Planta Medica*, 75(12), 1326–1330.
- Koysomboon S, van Altena I, Kato S, Chantrapromma K. 2006. Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry*, 67(10), 1034–1040.

- Lahlou M. 2013. The success of natural products in drug discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 17–31.
- Lakshmanan D, Werngren J, Jose L, Suja KP, Nair MS, Varma RL, Kumar RA. 2011. Ethyl p-methoxycinnamate isolated from a traditional anti-tuberculosis medicinal herb inhibits drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *Fitoterapia*, 82(5), 757–761.
- Lall N, Hussein AA, Meyer JJM. 2006. Antiviral and antituberculous activity of *Helichrysum melanacme* constituents. *Fitoterapia*, 77(3), 230–232.
- Laurenzi M, Ginsberg A, Spigelman M. 2007. Challenges Associated with current and future TB treatment. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 7, 105–119.
- Lekphrom R, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K. 2009. Bioactive styryllactones and alkaloid from flowers of *Goniothalamus laoticus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 47–50.
- Lekphrom R, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K. 2010. Bioactive diterpenes from the aerial parts of *Anisochilus harmandii*. *Planta Medica*, 76(7), 726–728.
- León-Díaz R, Meckes M, Said-Fernández S, Molina-Salinas GM, Vargas-Villarreal J, Torres J, Jiménez-Arellanes A. 2010. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(1), 45–51.
- León-Rivera I, Mirón-López G, Molina-Salinas GM, Herrera-Ruiz M, Estrada-Soto S, del Carmen Gutiérrez M, Said-Fernández S. 2008. Tyrianthinic acids from *Ipomoea tyrianthina* and their antimycobacterial activity, cytotoxicity, and effects on the central nervous system. *Journal of Natural Products*, 71(10), 1686–1691.
- Liang HX, Dai HQ, Fu HA, Dong XP, Adebayo AH, Zhang LX, Cheng YX. 2010. Bioactive compounds from *Rumex* plants. *Phytochemistry Letters*, 3(4), 181–184.
- Lin WY, Peng CF, Tsai IL, Chen JJ, Cheng MJ, Chen IS. 2005. Antitubercular constituents from the roots of *Engelhardia roxburghiana*. *Planta Medica*, 71(2), 171–175.
- Ma C, Case RJ, Wang Y, Zhang HJ, Tan GT, Van Hung N, Pauli GF. 2005. Anti-tuberculosis constituents from the stem bark of *Micromelum hirsutum*. *Planta Medica*, 71(3), 261–267.

- Maggi N, Pasqualucci CR, Ballotta R, Sensi P. 1966. Rifampicin: a new orally active rifamycin. *Chemotherapy*, 11(5), 285–292.
- Maneerat W, Laphookhieo S, Koysomboon S, Chantrapromma K. 2008. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*. *Phytomedicine*, 15(12), 1130–1134.
- McCutcheon AR, Stokes RW, Thorson LM, Ellis SM, Hancock REW, Towers GHN. 1997. Anti-mycobacterial screening of british columbian medicinal plants. *International Journal of Pharmacognosy*, 35(2), 77–83.
- Melo MF, Santos CA, Chiappeta AA, de Mello JF, Mukherjee R. 1987. Chemistry and pharmacology of a tertiary alkaloid from *Strychnos trinervis* root bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 19(3), 319–325.
- Molina-Salinas GM, Pérez-López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Said-Fernández S, de Torres NW. 2007. Evaluation of the flora of northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), 435–441.
- Molina-Salinas GM, Bórquez J, Ardiles A, Said-Fernández S, Loyola LA, San-Martín A, Peña-Rodríguez LM. 2010. Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*, 81(1), 50–54.
- Molina-Salinas GM, Bórquez J, Said-Fernández S, Loyola LA, Yam-Puc A, Becerril-Montes P, Peña-Rodríguez LM. 2010. Antituberculosis activity of alkylated mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*, 81(3), 219–222.
- Mongkolvisut W, Sutthivaiyakit S. 2007. Antimalarial and antituberculous poly-o-acylated jatrophone diterpenoids from *Pedilanthus tithymaloides*. *Journal of Natural Products*, 70(9), 1434–1438.
- Munna S, Basha SC, Reddy PR, Pramod N, Kumar YP, Basha GM. 2014. Antitubercular activity of *Actiniopteris radiata* Linn. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 1443–1445.
- Namdaung U, Aroonrerk N, Suksamrarn S, Danwisetkanjana K, Saenboonrueng J, Arjchomphu W, Suksamrarn A. 2006. Bioactive constituents of the root bark of *Artocarpus rigidus* subsp. *rigidus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(10), 1433–1436.
- Nareeboon P, Kraus W, Beifuss U, Conrad J, Klaiber I, Sutthivaiyakit S. 2006. Novel 24-nor-, 24-nor-2,3-seco-, and 3,24-dinor-2,4-seco-ursane triterpenes from

- Diospyros decandra*: evidences for ring A biosynthetic transformations. *Tetrahedron*, 62(23), 5519–5526.
- Navarro-García VM, Luna-Herrera J, Rojas-Bribiesca MG, Álvarez-Fitz P, Ríos MY. 2011. Antibacterial activity of *Aristolochia brevipes* against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules*, 16(9), 7357–7364.
- Negi AS, Kumar JK, Luqman S, Saikia D, Khanuja SPS. 2010. Antitubercular potential of plants: a brief account of some important molecules. *Medicinal Research Reviews*, 30(4), 603–645.
- Nogueira T, Medeiros MA, Marcelo-Curto MJ, García-Pérez BE, Luna-Herrera J, Costa MC. 2013. Profile of antimicrobial potential of fifteen *Hypericum* species from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 47, 126–131.
- Noro JC, Barrows LR, Gideon OG, Ireland CM, Koch M, Matainaho T, Bugni TS. 2008. Tetrahydroxysqualene from *Rhus taitensis* shows antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Natural Products*, 71(9), 1623–1624.
- O'Donnell G, Poeschl R, Zimhony O, Gunaratnam M, Moreira JBC, Neidle S, Gibbons S 2009. Bioactive pyridine-N-oxide disulfides from *Allium stipitatum*. *Journal of Natural Products*, 72(3), 360–365.
- Pan PC, Cheng MJ, Peng CF, Huang HY, Chen JJ, Chen IS. 2010. Secondary metabolites from the roots of *Litsea hypophaea* and their antitubercular activity. *Journal of Natural Products*, 73(5), 890–896.
- Panthama N, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K. 2010. Polyacetylenes from the roots of *Polyalthia debilis*. *Journal of Natural Products*, 73(8), 1366–1369.
- Pattamadilok D, Suttisri R. 2008. Seco-terpenoids and other constituents from *Elateriospermum tapos*. *Journal of Natural Products*, 71(2), 292–294.
- Prabu A, Hassan S, Prabuseenivasan N, Shainaba AS, Hanna LE, Kumar V. 2015. Andrographolide: a potent antituberculosis compound that targets aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 61, 133–140.
- Rajab MS, Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. 1998. Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. *Planta Medica*, 64(1), 2–4.

- Rangkaew N, Suttisri R, Moriyasu M, Kawanishi K. 2009. A new acyclic diterpene acid and bioactive compounds from *Knema glauca*. Archives of Pharmacal Research, 32(5), 685–692.
- Rijo P, Simões MF, Francisco AP, Rojas R, Gilman RH, Vaisberg AJ, Moiteiro C. 2010. Antimycobacterial metabolites from *Plectranthus: royleanone* derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* strains. Chemistry & Biodiversity, 7(4), 922–932.
- Rivero-Cruz I, Acevedo L, Guerrero JA, Martínez S, Bye R, Pereda-Miranda R, Mata R. 2005. Antimycobacterial agents from selected mexican medicinal plants. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 57(9), 1117–1126.
- Rojas R, Caviedes L, Aponte JC, Vaisberg AJ, Lewis WH, Lamas G, Hammond GB. 2006. Aegicerin, the first oleanane triterpene with wide-ranging antimycobacterial activity, isolated from *Clavija procera*. Journal of Natural Products, 69(5), 845–846.
- Rukachaisirikul T, Saekee A, Tharibun C, Watkuolham S, Suksamrarn A. 2007. Biological activities of the chemical constituents of *Erythrina stricta* and *Erythrina subumbrans*. Archives of Pharmacal Research, 30(11), 1398–1403.
- Saludes JP, Garson MJ, Franzblau SG, Aguinaldo AdM. 2002. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). *Phytotherapy Research: PTR*, 16(7), 683–685.
- Sheeba DG, Gomathi KS, Citarasu D. 2015. Anti-mycobacterial and phytochemical investigation of methanol extracts of few medicinal plants. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 8(3), 480–486.
- Singh R, Hussain S, Verma R, Sharma P. 2013. Anti-mycobacterial screening of five Indian medicinal plants and partial purification of active extracts of *Cassia sophera* and *Urtica dioica*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 6(5), 366–371.
- Solis PN, Lang'at C, Gupta MP, Kirby GC, Warhurst DC, Phillipson JD. 1995. Bioactive compounds from *Psychotria camponutans*. Planta Medica, 61(1), 62–65.
- Songsiang U, Wanich S, Pitchuanom S, Netsopa S, Uanporn K, Yenjai C. 2009. Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. Fitoterapia, 80(7), 427–431.

- Sunthitikawinsakul A, Kongkathip N, Kongkathip B, Phonnakhu S, Daly JW, Spande TF, Rochanaruangrai S. 2003. Coumarins and carbazoles from *Clausena excavata* exhibited antimycobacterial and antifungal activities. *Planta Medica*, 69(2), 155–157.
- Sutthivaiyakit S, Thongnak O, Lhinhatrakool T, Yodchun O, Srimark R, Dowtaisong P, Chuankamnerdkarn M. 2009. Cytotoxic and antimycobacterial prenylated flavonoids from the roots of *Eriosema chinense*. *Journal of Natural Products*, 72(6), 1092–1096.
- Tan MA, Takayama H, Aimi N, Kitajima M, Franzblau SG, Nonato MG. 2008. Antitubercular triterpenes and phytosterols from *Pandanus tectorius* Soland. var. *laevis*. *Journal of Natural Medicines*, 62(2), 232–235.
- Thongthoom T, Songsiang U, Phaosiri C, Yenjai C. 2010. Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. *Archives of Pharmacal Research*, 33(5), 675–680.
- Truong NB, Pham CV, Doan HTM, Nguyen HV, Nguyen CM, Nguyen HT, Chau MV. 2011. Antituberculosis cycloartane triterpenoids from *Radermachera boniana*. *Journal of Natural Products*, 74(5), 1318–1322.
- Tuntiwachwuttikul P, Phansa P, Pootaeng-On Y, Taylor WC. 2006a. Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(2), 149–151.
- Tuntiwachwuttikul P, Phansa P, Pootaeng-On Y, Taylor WC. 2006b. Chromones from the branches of *Harrisonia perforata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(1), 44–47.
- Valcic S, Montenegro G, Mujica AM, Avila G, Franzblau S, Singh MP, Timmermann BN. 1999. Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from Central Chile. *Journal of Biosciences*, 54(5–6), 406–416.
- Vongvanich N, Kittakoop P, Charoenchai P, Intamas S, Sriklung K, Thebtaranonth Y. 2006. Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. *Planta Medica*, 72(15), 1427–1430.
- Wang JF, Dai HQ, Wei YL, Zhu HJ, Yan YM, Wang YH, Cheng YX. 2010. Antituberculosis agents and an inhibitor of the para-aminobenzoic acid biosynthetic pathway from *Hydnocarpus anthelminthica* seeds. *Chemistry & Biodiversity*, 7(8), 2046–2053.

- Wirasathien L, Boonarkart C, Pengsuparp T, Suttisri R. 2006. Biological Activities of Alkaloids from *Pseudivaria setosa*. *Pharmaceutical Biology*, 44(4), 274–278.
- World Health Organization. (2016). *Global Tuberculosis Report 2016*. World Health Organization. Consultado en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>
- World Health Organization. (2017a). Informe mundial sobre la tuberculosis. Consultado 15 Mayo, 2017, en http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/
- World Health Organization. (2017b). What is multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and how do we control it? Consultado Junio 14, 2017, en <http://www.who.int/features/qa/79/en/>
- World Health Organization. (2017c). Estrategia de la OMS para poner fin a la tuberculosis de aquí a 2035. Consultado Mayo 15, 2017, from <http://www.who.int/tb/strategy/es/>
- Wu CC, Peng CF, Tsai IL, Abd El-Razek MH, Huang HS, Chen IS. 2007. Secondary metabolites from the roots of *Engelhardia roxburghiana* and their antitubercular activities. *Phytochemistry*, 68(9), 1338–1343.
- Yang PS, Cheng MJ, Peng CF, Chen JJ, Chen IS. 2009. Endiandric acid analogues from the roots of *Beilschmiedia erythrophloia*. *Journal of Natural Products*, 72(1), 53–58.

CAPÍTULO II:

NANOTECNOLOGÍA APLICADA A SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRODUCTOS NATURALES

NANOTECNOLOGÍA APLICADA A SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRODUCTOS NATURALES

II.1 Introducción

El uso de los sistemas de liberación particulados en el área farmacéutica y, más específicamente, en la administración de principios activos se ha incrementado notablemente durante los últimos años. Principalmente, se ha utilizado para reducir la toxicidad y los efectos secundarios de los fármacos, así como para otorgarles protección. Además, el uso de dichos sistemas permite el biodireccionamiento a células, órganos o tejidos blanco afectados por diversos padecimientos. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, estos sistemas permiten la formulación de compuestos biológicamente activos de diversa naturaleza, dentro de los que destacan los productos naturales, tales como los extractos de diferentes polaridades, los aceites esenciales y los compuestos activos aislados.

La encapsulación de principios activos, además de reducir la reactividad de los compuestos con el ambiente (i.e. agua, luz, oxígeno) y disminuir su evaporación o su transferencia hacia el medio ambiente, también permite enmascarar sabores y promover la distribución uniforme de los activos en los productos finales cuando se utilizan en poca cantidad.

Particularmente, sistemas como las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas sólidas lipídicas y las ciclodextrinas, entre otros, han sido aprovechados para la formulación de productos naturales. Diversas formulaciones han demostrado su potencial aplicación para mantener y, en ocasiones, aumentar la actividad biológica probada de productos naturales. Formulaciones con actividades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena, conservadora de alimentos y cosmética han sido desarrolladas y probadas con éxito tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

A lo largo del presente capítulo se abordará de manera puntual cada uno de los sistemas particulados que se han utilizado para la incorporación y formulación de productos naturales, destacando sus propiedades, así como sus ventajas y desventajas.

II.2 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (NP) son partículas sólidas coloidales con un rango de tamaño que va de 1 a 600 nm. Estos coloides están constituidos por materiales macromoleculares sintéticos o naturales y pueden formar nanocápsulas o nanoesferas, en las cuales el principio activo (fármaco o productos naturales) se encuentra disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o adherido (Figura II.1).

Las características fisicoquímicas de las NP hacen de estas uno de los sistemas más novedosos para la liberación de diversos compuestos activos, entre ellos los productos naturales. Entre las ventajas asociadas a sus características fisicoquímicas tenemos que:

- Debido a su tamaño nanométrico, comparable con los componentes en células humanas, las NP pueden ser utilizadas para facilitar la interacción con diversos sistemas biológicos (i.e. células cancerígenas, virus, bacterias, células sanguíneas y parásitos).
- Considerando su amplia área superficial, el número de moléculas de activo biológico presentes en la superficie de las NP se incrementa conforme disminuye el tamaño del sistema.
- Tomando en cuenta su tamaño submicrónico, es fácil mantener a las nanopartículas en suspensión líquida, ya que el efecto de la fuerza gravitacional sobre las nanopartículas es muy pequeño. Esto permite tener sistemas mucho más estables, impidiendo su precipitación en la formulación en la que se encuentra.
- Por su pared polimérica, las nanopartículas otorgan protección a los principios activos tanto de factores ambientales (i.e. luz, humedad, temperatura) como del entorno biológico en donde se aplican (i.e. enzimas, pH).
- La morfología superficial puede jugar un rol importante en la adhesión del sistema acarreador con el sistema biológico blanco (i.e. célula, tejido), debido a que se incrementan las atracciones de Van der Waals entre ellas. Más allá de esto, la superficie de las nanopartículas puede ser modificada para aumentar o disminuir, según se desee, su interacción con el sistema biológico blanco y, así, eficientizar la actividad del principio activo.

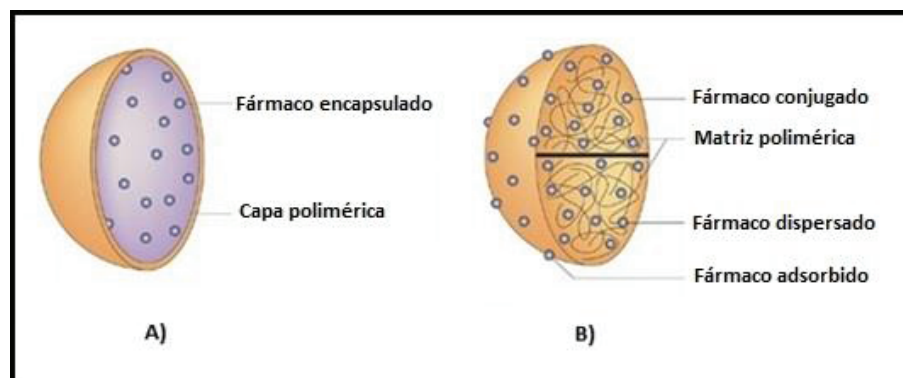


Figura II.1. Estructura de los dos tipos de nanopartículas poliméricas: A) Nanocápsula y B) Nanoesfera.

Existen diversos trabajos en los que se han desarrollado formulaciones de NP cargadas de productos naturales, incluyendo aceites esenciales, extractos crudos de plantas y compuestos aislados. Por ejemplo, con la finalidad de incrementar la actividad antimicrobiana que presenta el aceite esencial de canela contra *Phytophthora drechsleri* (fitopatógeno del pepino), Mohammadi y col. desarrollaron nanopartículas de quitosán cargadas con este aceite. La formulación presentó un tamaño de partícula en un rango de 100 a 190 nm, con porcentajes de encapsulación y de eficiencia de encapsulación de 2-17% y 3-4%, respectivamente. En los estudios de actividad antimicrobiana contra *P. drechsleri*, las NP cargadas con el aceite a una concentración de 1.5 g/L disminuyeron significativamente la incidencia del microorganismo por un período de siete días en pepinos inoculados con el patógeno. Además, el aceite encapsulado extendió la vida de anaquel del pepino hasta por 21 días (Mohammadi, Hashemi & Hosseini, 2015). Otras formulaciones similares con actividad antiparasitaria y antimicrobiana se han desarrollado para su aplicación en la industria de alimentos. Aceites esenciales de eucalipto, *Eucalyptus staigeriana* y *E. citriodora*, han sido encapsulados en NP a base de goma de anacardo y evaluados en su actividad antimicrobiana contra *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*. En comparación con el aceite libre de *E. staigeriana*, las nanopartículas mostraron una mayor actividad antimicrobiana debido al efecto en conjunto entre el aceite y la goma de anacardo. Por su parte, la formulación del aceite de *E. citriodora* en NP de quitosán, con una concentración de 8 mg/mL de aceite, mostró inhibir la eclosión de las larvas del nematodo *Haemonchus contortus* en un 93%. En ambos estudios, los resultados demostraron que las formulaciones pueden ser utilizadas como aditivos en alimentos

para el control de *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* y *H. contortus* (Herculano *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2014).

Las NP también representan una excelente opción para la encapsulación y liberación de compuestos aislados a partir de fuentes naturales. Terpenos aislados de *Ginkgo biloba* han sido encapsulados en NP de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y de polietilenglicol (PEG) para el desarrollo de una formulación intravenosa. Los terpenos mostraron una eficiencia de encapsulación de 79% y se observó una liberación sostenida y sincronizada de los mismos, debido principalmente al largo tiempo de circulación de las nanopartículas (inducido por el PEG) y por la lenta degradación del PLGA. Dichos resultados mostraron que las NP pueden funcionar como sistemas para la liberación sostenida y sincronizada de múltiples compuestos naturales (Han *et al.*, 2012). Otros ejemplos de formulaciones incluyen nanopartículas elaboradas a base de PLGA y compuestos aislados como triterpenoides, grandisina, coumarina y apigenina. Los ensayos *in vitro* mostraron que la nanoencapsulación de los compuestos incrementa la actividad citotóxica de los mismos, lo que sustenta su aplicación como posible terapia anticancerígena (Bhattacharyya *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2013; Stecanella *et al.*, 2013). En otro estudio, Guerrero Barbosa y col. encapsularon la coenzima Q10, una quinona que posee capacidad antioxidante y ha demostrado inhibir la peroxidación de ácidos grasos, con un polímero de tipo metilacrilato. Aunque no se realizaron ensayos *in vitro*, las formulaciones mostraron eficiencias de encapsulación entre 50 y 90%. Los autores propusieron que debido a sus características (i.e tamaño, encapsulación) estas formulaciones pueden ser utilizadas como una forma de dosificación oral del compuesto activo (Guerrero Barbosa *et al.*, 2014).

Particularmente, en años recientes, la aplicación de las NP en el área dermatológica ha adquirido una gran relevancia debido a que pueden liberar activos para que tengan un efecto local o sistémico. En este contexto, Álvarez Román y col., estandarizaron la obtención de formulaciones con carvacrol (antioxidante) en nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona). Posteriormente caracterizaron a las formulaciones dermocinéticamente en base a estudios *in vitro* de permeación transdérmica. El porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación fueron de 51 y 91%, respectivamente. Los estudios dermocinéticos mostraron que las nanopartículas penetran las capas más profundas del estrato córneo sin atravesar completamente la piel, lo que impide su llegada al torrente

sanguíneo disminuyendo de manera importante los posibles efectos tóxicos y alergénicos de los compuestos encapsulados. La formulación óptima podría utilizarse como tratamiento preventivo contra el cáncer debido a su actividad antioxidante (Cavazos Rodríguez, 2011; Álvarez Román *et al.*, 2011).

En otro estudio, con el objetivo de investigar la solubilidad del extracto de *Garcinia mangostana* en dos diferentes vehículos (agua y crema), usualmente utilizados en cosmetología, se estudió la penetración de las NP y el extracto libre en piel de cerdo. El estudio mostró que, tanto las NP cargadas, como el extracto libre incorporados en la crema penetraron más profundo que si eran aplicados en una base acuosa. En conclusión, estas formulaciones favorecen la aplicación del extracto de *G. mangostana* en productos cosmetológicos (Tachaprutinun *et al.*, 2014).

Si bien los extractos crudos obtenidos a partir de plantas representan una fuente importante de tratamientos potenciales para distintas enfermedades, está claro que su complejidad y composición diversa, dificulta su aplicación directa en organismos. Aspectos de solubilidad de sus componentes y factores como la sinergia entre los componentes activos han incitado a la búsqueda de sistemas de liberación que permitan el uso de dichas fuentes naturales. Durante la última década, las NP han sido utilizadas para la aplicación de extractos con actividad anticancerígena. Por ejemplo, el extracto de raíz de *Polygala senega* y el extracto de *G. mangostana* han sido encapsulados en NP, obteniendo resultados prometedores en modelos *in vitro*. La formulación elaborada con PLGA y el extracto de *P. senega* mostró un tamaño de partícula alrededor de 147 nm, el cual potenció la incorporación celular de los componentes del extracto y mejoró su biodisponibilidad en la línea celular A549 de cáncer de pulmón (Paul *et al.*, 2011). Por su parte, la nanoencapsulación del extracto de *G. mangostana* con etilcelulosa mostró una mayor acumulación e internalización celular en comparación con el extracto libre. Además, cuando se llevaron a cabo estudios *in vitro*, las NP mostraron una actividad anticancerígena efectiva en células HeLa (Pan-In *et al.*, 2014a).

Por otro lado, tomando en cuenta sus propiedades antiulcerogénicas, los extractos de *G. mangostana* y *Passiflora serratodigitata* han sido incorporados en sistemas nanoparticulados. En estudios *in vitro* se probó su actividad contra *Helicobacter pylori*, mostrando además una buena capacidad para combatir la proliferación de la

bacteria gástrica y evitar el desarrollo de úlceras y cáncer de estómago (Marc Strasser, 2014; Pan-In *et al.*, 2014b).

Por su parte, extractos de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) han sido nanoencapsulados para el enriquecimiento de sopas instantáneas y así incrementar las propiedades antioxidantes de dicho alimento (Deladino, Navarro & Martino, 2013). Más allá de los ensayos biológicos tanto *in vitro* como *in vivo*, debido al gran potencial que representan las NP como sistemas acarreadores de extractos crudos, las últimas tendencias en investigación que se han realizado con las NP incluyen estudios de formulación con diseños factoriales que tienen como objetivo definir las condiciones óptimas para la elaboración de NP a gran escala (Ribeiro *et al.*, 2015).

En cuanto al estudio de extractos con otras actividades, como por ejemplo pesticidas, Figueroa y col., elaboraron NP a base de Eudragit L100-55 y extractos de *Annona muricata* (guanábana) y probaron su actividad en poblaciones de larvas de *Aedes aegypti*, vector transmisor del dengue. Los resultados de los ensayos *in vivo* mostraron que las NP cargadas presentaron hasta un 70% de mortalidad sobre las larvas del vector a una concentración de 60 ppm y una estabilidad de hasta 12 meses. Dicha formulación mostró un gran potencial para ser aplicada como bioinsecticida (Figueroa Espinoza, 2014).

II.3 Nanopartículas Sólidas Lípidicas

Las nanopartículas sólidas lípidicas (SLN) están compuestas de lípidos sólidos y emulsificantes dispersos en un medio acuoso (Figura II.2). Pueden ser producidas por homogenización a alta presión y se caracterizan por tener un tamaño de partícula menor a los 500 nm. Estos sistemas también pueden obtenerse por técnicas con solventes orgánicos homogenizados a alta presión/evaporación de solvente o dilución de microemulsiones. Las SLN combinan las ventajas de los acarreadores coloidales, dejando de lado las desventajas de otros sistemas como los liposomas y las NP. Entre de las ventajas del uso de las SLN como acarreadores de principios activos encontramos:

- Posibilidad de controlar la liberación del principio activo y su biodireccionamiento.

- Incremento de la solubilidad de activos.
- Gran capacidad de carga del activo.
- Facilidad de incorporar activos lipofílicos o hidrofílicos.
- No presentan biotoxicidad.
- No se necesitan, en muchos casos, de solventes orgánicos para su preparación.
- Pocos problemas al momento de producir las a gran escala o someterlas a esterilización.

Las SLN han sido utilizadas para la incorporación de compuestos lipofílicos aislados de plantas con el objetivo de tratar enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Por ejemplo, se estudió la coencapsulación de resveratrol y curcumina en SLN. La formulación mostró un incremento en la fotoestabilidad de los compuestos. Además, las SLN mostraron un perfil de liberación controlada de ambos polifenoles (Coradini *et al.*, 2014). En otro estudio, con el objetivo de incrementar su solubilidad en agua y evitar su volatilización, el eugenol fue incorporado en SLN por un proceso de homogenización, seguido de una etapa de secado por aspersión o por liofilización. La formulación de SLN compuesta de Campitrol®, Poloxamer 188 y maltodextrina DE10 presentó una buena retención del eugenol. Además, pudo constatar que la etapa de secado es determinante en la retención de compuestos como el eugenol, ya que la liofilización favoreció su interacción en comparación con el secado por aspersión. Los autores propusieron que este tipo de formulaciones de SLN en forma de polvos pueden facilitar la dosificación de eugenol en productos nutracéuticos durante su preparación (Cortés-Rojas, Souza & Oliveira, 2014).

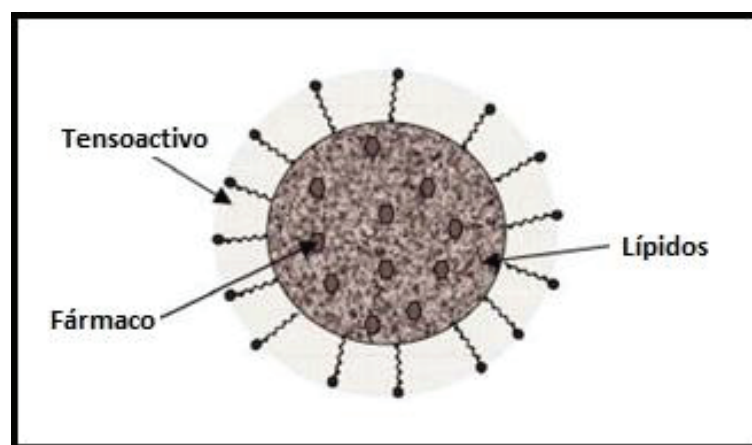


Figura II.2. Estructura de una nanopartícula sólida lipídica.

II.4 β -Ciclodextrinas

El tipo más común de ciclodextrina es el compuesto conocido como β -ciclodextrina (β -CD), el cual consiste en 7 unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1,4) que forman una estructura con una cavidad central. A pesar de que la cavidad es básicamente lipofílica y su superficie exterior es hidrofílica, las moléculas acuosas pueden incorporarse a la cavidad de las ciclodextrinas hidratadas (Figura II.3). La cavidad lipofílica de las moléculas de β -CD provee de un microentorno apropiado para ciertas moléculas que pueden internarse y formar complejos de inclusión.

La principal fuerza impulsora para la formación de complejos β -CD-activos (encapsulación) es el desplazamiento de las moléculas de agua por parte de las moléculas hidrofóbicas dentro de la cavidad, debido a la afinidad del entorno. Al aumentar la cantidad de moléculas hidrofóbicas en la cavidad, la asociación apolar-apolar alcanza un nivel óptimo en el que la tensión del anillo de la CD resulta en un estado de energía menor y, por lo tanto, es más estable. Esta propiedad de la β -CD es, precisamente, la que ha sido ampliamente utilizada en las industrias de alimentos, farmacéutica y cosmética, para la encapsulación de compuestos como antioxidantes, vitaminas, aceites esenciales y colorantes. En general, se ha buscado incrementar la solubilidad, mejorar su estabilidad y optimizar la liberación de distintos compuestos.

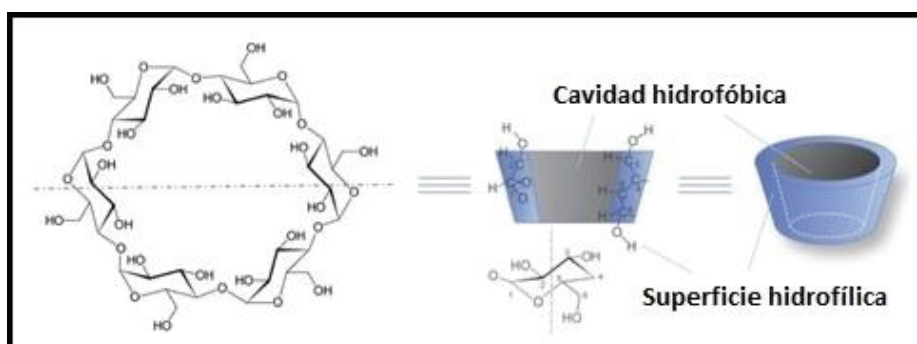


Figura II.3. Estructura de la β -ciclodextrina.

En años recientes, la industria de alimentos ha mostrado gran interés en el desarrollo de formulaciones a base de β -CD y compuestos aislados de extractos naturales. Al ser incorporados en sistemas como las β -CD, compuestos como el d-limoneno, timol y trans-anetol incrementaron diversas propiedades de los alimentos tales como, la

calidad de la mezcla de los alimentos, la actividad antimicrobiana, el sabor, la solubilidad y la estabilidad (Fang, Comino & Bhandari, 2013; Kfoury *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2014).

Aceites esenciales también han sido incorporados en β -CD. Por ejemplo, los aceites esenciales de albahaca y estragón, los cuales son ricos en estragol, se encapsularon en diversos tipos de CD (α , β y metilada al azar). Los resultados mostraron que este tipo de sistemas proporcionan una liberación controlada del estragol, así como un incremento en la actividad de captación del radical DPPH y la fotoestabilidad del compuesto incorporado en las CD. Estas formulaciones pueden ser utilizadas en aromaterapia, cosmética y alimentos (Kfoury *et al.*, 2015). Por otra parte, aceites esenciales de canela, ricos en cinamaldehído y timol, han sido incorporados en estos sistemas y se ha comprobado que pueden mejorar la estabilidad de ambos compuestos en condiciones de almacenamiento menores a 84% de humedad relativa y una temperatura de 25 °C (Ponce Cevallos, Buera & Elizalde, 2010).

II.5 Otros Sistemas Particulados de Liberación Controlada

- Nanoemulsiones

Estos sistemas son dispersiones líquidas termodinámicamente estables compuestas de aceite, agua y surfactante, con un tamaño de glóbulo entre 20 y 200 nm. Las nanoemulsiones son preparadas para incrementar la solubilidad de activos farmacéuticos en sistemas acuosos y para proporcionar una liberación controlada del activo en su sitio de aplicación. En este contexto, compuestos como la azadiractina (extraída de *Azadirachta indica*, neem) o aceites esenciales obtenidos de *Cuminum cyminum* han sido incorporados en nanoemulsiones, proporcionando la liberación controlada de los compuestos activos e incrementando la actividad biológica de los mismos (i.e. antioxidante y hepatoprotectora) (Jerobin *et al.*, 2012; Mostafa *et al.*, 2015).

- Micro/nanocomplejos

Con el objetivo de disminuir la susceptibilidad de los productos naturales e incrementar su estabilidad durante el proceso de almacenamiento, la encapsulación en micro/nanocomplejos ha sido aplicada recientemente en la industria de alimentos y

nutracéuticos. Dependiendo de la naturaleza del polímero que se utilice, estos sistemas pueden ofrecer mayor adherencia a la superficie de la mucosa intestinal, además de protección y liberación controlada de sustancias naturales activas. Por ejemplo, al ser evaluados *in vitro*, complejos elaborados a base de quitosán y α -tocoferol mostraron una liberación controlada y mayor protección de este compuesto activo en fluido intestinal simulado (Luo *et al.*, 2011). En otro estudio, complejos de alginato o quitosán con aceite esencial de eucalipto presentaron eficiencia de encapsulación entre 90 y 92%, además de una liberación sostenida del aceite (Chang & Dobashi, 2003; Ribeiro *et al.*, 2013).

- *Nanogeles*

Estos sistemas son redes tridimensionales entrecruzadas de cadenas de polímeros unidos por enlaces covalentes o procesos de autoensamblaje. Los nanogeles son considerados sistemas con mucho potencial debido a su alta capacidad de carga del activo, alta estabilidad y sus propiedades de liberación. Nanogeles elaborados a partir de quitosán y aceite esencial de *Mentha piperita*, rico en ácido cinámico, han sido desarrollados para el control de *Aspergillus flavus*, mostrando que la incorporación del producto natural en el sistema mantiene e incrementa la actividad antifúngica del mismo (Beyki *et al.*, 2014).

- *Niosomas*

Los niosomas son autoensamblajes vesiculares de surfactantes no iónicos, los cuales son parecidos a los liposomas en su arquitectura y pueden ser utilizados como una alternativa efectiva a los sistemas liposomales debido a su bajo costo, gran estabilidad, facilidad de almacenaje y factibilidad de producción a escala industrial. Un ejemplo de este tipo de sistemas de liberación se desarrolló usando ciertos antioxidantes, como el ácido gálico (AG), curcumina (CU), ácido ascórbico (AA), quercetina (QC) y Tween 60. Las formulaciones mostraron que la coencapsulación de AG/CU y AA/QC influyen en las características químicas y eficiencias de encapsulación de los activos con respecto a las formulaciones simples de cada uno de los antioxidantes. Además, aparentemente, los antioxidantes encapsulados presentaron un incremento en su capacidad para reducir radicales libres, lo cual podría deberse a un efecto sinérgico (Tavano *et al.*, 2014).

II.6 Conclusiones

En los últimos años se han desarrollado diversas formulaciones a base de sistemas nanoparticulados (nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas lipídicas, β -ciclodextrinas, entre otros) con productos naturales, tales como, aceites esenciales, extractos de distintas polaridades y compuestos aislados. Dichas formulaciones presentan características fisicoquímicas especiales, las cuales permiten la aplicación de los productos naturales de una manera más eficiente y segura en comparación con las formas convencionales de administración farmacéutica. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* obtenidos en numerosas investigaciones sustentan el gran potencial que tienen los sistemas nanoparticulados, para ser utilizados en la formulación de activos de origen natural. Estas formulaciones podrían ser utilizadas en diversas aplicaciones industriales incluyendo la alimentaria, la farmacéutica, la agroquímica y la cosmética.

REFERENCIAS

- Álvarez-Román R, Cavazos-Rodríguez MR, Chávez-Montes A, Castro-Ríos R, Waksman de Torres N, Salazar-Cavazos ML, Galindo-Rodríguez SA. 2011. Formulación y caracterización de nanocápsulas con antioxidante natural para su aplicación cutánea. *Química Hoy/Chemistry Science*, 1(4), 29–35.
- Beyki M, Zhavesh S, Khalili ST, Rahmani-Cherati T, Abollahi A, Bayat M, Mohsenifar A. 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, 54, 310–319.
- Bhattacharyya SS, Paul S, De A, Das D, Samadder A, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR. 2011. Poly (lactide-*co*-glycolide) acid nanoencapsulation of a synthetic coumarin: cytotoxicity and bio-distribution in mice, in cancer cell line and interaction with calf thymus DNA as target. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253(3), 270–281.
- Cavazos-Rodríguez MR. 2011. Encapsulación de moléculas antioxidantes en nanopartículas poliméricas para su aplicación dermatológica. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. México.
- Chang CP, Dobashi T. 2003. Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32(3), 257–262.
- Coradini K, Lima FO, Oliveira CM, Chaves PS, Athayde ML, Carvalho LM, Beck RCR. 2014. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their *in vitro* antioxidant effects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(1), 178–185.
- Cortés-Rojas DF, Souza CRF, Oliveira WP. 2014. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. *Journal of Food Engineering*, 127, 34–42.
- Das J, Das S, Paul A, Samadder A, Khuda-Bukhsh AR. 2014. Strong anticancer potential of nano-triterpenoid from *Phytolacca decandra* against A549 adenocarcinoma via a Ca²⁺-dependent mitochondrial apoptotic pathway. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 7(3), 140–150.

- Das S, Das J, Samadder A, Paul A, Khuda-Bukhsh AR. 2013. Efficacy of PLGA-loaded apigenin nanoparticles in Benzo[α]pyrene and ultraviolet-B induced skin cancer of mice: mitochondria mediated apoptotic signalling cascades. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 62, 670–680.
- Deladino L, Navarro AS, Martino MN. 2013. Carrier systems for yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 163–169.
- Fang Z, Comino PR, Bhandari B. 2013. Effect of encapsulation of D-limonene on the moisture adsorption property of β -cyclodextrin. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 164–169.
- Figueroa-Espinoza A. 2014. Incorporación de extractos de semillas de *Annona muricata* L (annonaceae) en nanopartículas poliméricas para su uso en el control de *Aedes aegypti* L (Diptera: Culicidae). Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. México.
- Guerrero-Barbosa A, Álvarez-Román R, Perales-Flores JD, Barajas-Aguilar NC, Ramírez-González E, Galindo-Rodríguez SA. 2014. Nanopartículas poliméricas no biodegradables cargadas con CoQ10 para su potencial aplicación oral. *Química Hoy/Chemistry Science*, 4(3), 1–5.
- Han L, Fu Y, Cole AJ, Liu J, Wang J. 2012. Co-encapsulation and sustained-release of four components in ginkgo terpenes from injectable PELGE nanoparticles. *Fitoterapia*, 83(4), 721–731.
- Herculano ED, de Paula HCB, de Figueiredo EAT, Dias FGB, Pereira V de A. 2015. Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 484–491.
- Jerobin J, Sureshkumar RS, Anjali CH, Mukherjee A, Chandrasekaran N. 2012. Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1750–1756.
- Kfoury M, Auezova L, Greige-Gerges H, Ruellan S, Fourmentin S. 2014. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation:

- Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. *Food Chemistry*, 164, 454–461.
- Kfoury M, Auezova L, Ruellan S, Greige-Gerges H, Fourmentin S. 2015. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 118, 156–164.
- Luo Y, Zhang B, Whent M, Yu L, Wang Q. 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its *in vitro* controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 145–152.
- Marc Strasser PN. 2014. Antiulcerogenic potential activity of free and nanoencapsulated *Passiflora serratodigitata* L. extracts. *BioMed Research International*, 2014, 7 pag.
- Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini SM. 2015. Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 203–213.
- Mostafa DM, Kassem AA, Asfour MH, Al Okbi SY, Mohamed DA, Hamed TES. 2015. Transdermal cumin essential oil nanoemulsions with potent antioxidant and hepatoprotective activities: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, 212, 6–15.
- Pan-In P, Wanichwecharungruang S, Hanes J, Kim AJ. 2014a. Cellular trafficking and anticancer activity of *Garcinia mangostana* extract-encapsulated polymeric nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3677–3686.
- Pan-In P, Tachapruetinun A, Chaichanawongsaroj N, Banlunara W, Suksamrarn S, Wanichwecharungruang S. 2014b. Combating *Helicobacter pylori* infections with mucoadhesive nanoparticles loaded with *Garcinia mangostana* extract. *Nanomedicine*, 9(3), 457–468.
- Paul S, Bhattacharyya SS, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR. 2011. Anticancer potentials of root extract of *Polygala senega* and its PLGA nanoparticles-

- encapsulated form. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, e517204.
- Ponce Cevallos PA, Buera MP, Elizalde BE. 2010. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. Journal of Food Engineering, 99(1), 70–75.
- Ribeiro AF, Ferreira CTG, dos Santos JF, Cabral LM, de Sousa VP. 2015. Design of experiments for the development of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa*. Journal of Nanoparticle Research, 17(2), 1–16.
- Ribeiro JC, Ribeiro WLC, Camurça-Vasconcelos ALF, Macedo ITF, Santos JML, Paula HCB, Bevilaqua CML. 2014. Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. Veterinary Parasitology, 204(3-4), 243–248.
- Ribeiro WLC, Macedo ITF, dos Santos JML, de Oliveira EF, Camurça-Vasconcelos ALF, de Paula HCB., Bevilaqua CML. 2013. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. Experimental Parasitology, 135(1), 24–29.
- Satheesh Madhav NV, Shivani K. 2011. Review on microplate drug delivery system. International Journal of Pharm Tech Research, 3(3), 1242–1254.
- Stecanella LA, Taveira SF, Marreto RN, Valadares MC, de Vieira MS, Kato MJ, Lima EM. 2013. Development and characterization of PLGA nanocapsules of grandisin isolated from *Virola surinamensis*: *in vitro* release and cytotoxicity studies. Revista Brasileira de Farmacognosia, 23(1), 153–159.
- Tachaprutinun A, Meinke MC, Richter H, Pan-in P, Wanichwecharungruang S, Knorr F, Patzelt A. 2014. Comparison of the skin penetration of *Garcinia mangostana* extract in particulate and non-particulate form. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 86(2), 307–313.
- Tao F, Hill LE, Peng Y, Gomes CL. 2014. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. LWT - Food Science and Technology, 59(1), 247–255.

Tavano L, Muzzalupo R, Picci N, de Cindio B. 2014. Co-encapsulation of antioxidants into niosomal carriers: Gastrointestinal release studies for nutraceutical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 82–88.

CAPÍTULO III:

DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CON CLOFAZIMINA Y ENSAYOS *IN VITRO* CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CON CLOFAZIMINA Y ENSAYOS *IN VITRO* CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

(To be submitted to Journal BioMed Research International)

III.1 Introducción

La tuberculosis es una enfermedad con una incidencia de 9 millones de casos nuevos y cerca de 1.5 millones de muertes al año (World Health Organization, 2016). Aunado a esto, el desarrollo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* farmacorresistentes (las cuales no responden a los tratamientos convencionales) han incrementado la problemática que concierne a esta enfermedad (World Health Organization, 2006). Durante la última década, se han buscado estrategias que ayuden a la erradicación de la enfermedad, dentro de las que destacan el uso de nanoacarreadores de fármacos antituberculosos con la finalidad de incrementar los efectos terapéuticos de los mismos (Xie *et al.*, 2014).

Dentro de los nanoacarreadores mejor estudiados y con un futuro prometedor encontramos a las nanopartículas poliméricas (NP). Este tipo de acarreadores farmacéuticos generalmente constituidos de polímeros biodegradables naturales o sintéticos, forman estructuras con naturaleza química diversa, dónde el fármaco puede estar encapsulado, adherido o absorbido (Jain Kewal K., 2012). Su tamaño nanométrico (100-300 nm) les confiere características únicas tales, como: i) amplia superficie de contacto, ii) posibilidad de biodireccionamiento a órganos/tejidos específicos e iii) internalización por parte de células, bacterias o parásitos (Nasiruddin, Neyaz, & Das, 2017).

Existen estudios de formulaciones a base de NP elaboradas con polímeros biodegradables como ácido poliláctico (PLA) o ácido poliláctico-*co*-glicólico (PLGA), donde se encapsulan fármacos antituberculosos de primera línea, tales como rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), etambutol (ETO) o isoniazida (INA) (Ahmad, Pandey, Sharma, & Khuller, 2006; Kumar *et al.*, 2011; Pandey, Rajesh & Kuller, G.K., 2004; Sharma, Pandey, Sharma, & Khuller, 2004). Estas formulaciones han demostrado incorporar los distintos fármacos con una eficiencia de encapsulación

entre 60 y 90%, así como una actividad antituberculosa eficiente al aplicarse por distintas vías (intravenosa, respiratoria), tanto *in vitro*, como *in vivo*. Cabe mencionar que en estudios de toxicidad, las formulaciones muestran perfiles adecuados y de baja toxicidad cuando se aplican en organismos vivos (Pandey, Zahoor, Sharma, & Khuller, 2003; Sharma, Sharma, & Khuller, 2004). Con lo anterior, es evidente que las formulaciones con NP cuentan con potencial para ser utilizadas en el tratamiento convencional de la tuberculosis, sin embargo, no hay suficientes estudios relacionados con la eficiencia antimicobacteriana de antituberculosos de segunda línea incorporados a NP. En este contexto, el uso de fármacos de segunda línea (p.e. clofazimina, CFM) en nanoformulaciones que modulen su toxicidad o efectos adversos en el organismo representan una excelente opción (Pandey & Ahmad, 2011).

La CFM, es un fármaco de segunda línea que se utiliza para el tratamiento de la lepra y ha demostrado gran eficiencia cuando se ha utilizado en tratamientos de tuberculosis (Arbiser & Moschella, 1995). Sin embargo, su carácter altamente lipofílico ($\text{Log}_P = 7.4$), provoca efectos secundarios severos, tales como su deposición en tejido adiposo, piel, conjuntiva o epitelio intestinal (cristalización) cuando se administra por períodos largos en humanos, lo que en primera instancia complica su aplicación en el tratamiento de enfermedades con esquemas terapéuticos prolongados, como la tuberculosis (Peters, Hamme, & Gordon, 1982). No obstante, se han hecho diferentes intentos de formulaciones diseñadas para la aplicación de la CFM con el objetivo de disminuir sus efectos adversos y así ser aplicada en el tratamiento de la tuberculosis, incluyendo liposomas, nanosuspensiones, nanoagregados o ciclodextrinas (Gomez-Flores, Tucker, Kansal, Tamez-Guerra, & Mehta, 1997; Hernandez-Valdepeña *et al.*, 2009; Mehta, 1996; Peters K. *et al.*, 2000; Salem, Steffan, & Düzgünes, 2003; Schwinté, Ramphul, Darcy, & O'Sullivan, 2003). Estas formulaciones han demostrado una eficiente actividad antimicobacteriana, pero estabilidad limitada en períodos cortos de tiempo cuando se almacena la formulación y en ocasiones, liberación limitada del activo incorporado. Además, al ser formulaciones basadas en partículas de un tamaño alrededor de los 300-500 nm o más, aumenta el riesgo de provocar trombos al ser aplicados en organismos mayores (Kaur, Bhandari, & Yakhmi, 2014). Estos efectos adversos, pueden ser disminuidos e incluso nulos con el uso de NP biodegradables cargadas con el fármaco. La incorporación de un fármaco con características fisicoquímicas tan particulares, como lo es la CFM, en un sistema

nanoparticulado permitiría no sólo disminuir los efectos secundarios que se presentan por la baja solubilidad acuosa del fármaco (deposición y cristalización), sino también, la posibilidad de aplicar por vías alternas a la oral (p.e. pulmonar, intravenosa).

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue diseñar, desarrollar y elaborar una formulación de NP biodegradables cargadas con CFM (NP-CFM) para ser utilizadas en el tratamiento de la tuberculosis.

III.2 Materiales

Se utilizó PLA (Purasorb Purac Biochem, Gorinchem, Holanda) como polímero formador de las NP, CFM (SIGMA-Aldrich, USA) como fármaco estándar, Alcohol Polivinílico (PVA), Poloxamer (Pluronic F127) Acetonitrilo (ACN) grado HPLC marca JT Baker, Metanol (MET) grado HPLC (Tedia), Ácido Fórmico (AF) grado HPLC (Merck Millipore). Los demás reactivos y solventes fueron grado analítico.

III.3 Metodología

Elaboración de las nanopartículas poliméricas. Las NP se prepararon por la técnica de nanoprecipitación descrita por Fessi *et al.* (1989). Brevemente, se utilizó una fase orgánica compuesta de una mezcla de solventes (miscibles con agua) con PLA y CFM, la cual fue inyectada en una fase acuosa (FA, 20 ml) que contenía PVA o Poloxamer bajo agitación magnética constante. La difusión de la FO en el seno de la FA favoreció la agregación del polímero formador, atrapando así a la CFM en su interior y dejando a las NP en suspensión. La suspensión obtenida se sometió a evaporación a presión reducida (Rotaevaporador Laborota 4003 control, Heidolph, Alemania) para la eliminación de los solventes. Una vez obtenidas las NP libres de solventes y con el fin de concentrarlas, se sometieron a centrifugación (Allegra™ 64R Centrifuge, Beckman Coulter, USA) a 25,000 rpm durante 2.5 h. Finalmente, la pastilla obtenida se sometió a un proceso de liofilización (Liofilizadora Freezone 2.5, LABCONCO, USA).

Caracterización física de las nanopartículas poliméricas. A las formulaciones de NP se les determinó su tamaño promedio e índice de polidispersidad (PDI) por espectroscopia de correlación fotónica, así como el potencial zeta (ζ) por microelectroforesis con láser Doppler en un Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA).

Perfil calorimétrico de las nanopartículas poliméricas. El análisis térmico de las NP se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los análisis se realizaron con un calorímetro (DSC Q200, TA Instrument, USA), utilizando un estándar de indio (previamente analizado, bajo las mismas condiciones de la muestra) como referencia. Para el análisis de los materiales (polímero, tensoactivo y fármaco), las NP blanco y las NP-CFM se pesaron de 4-5 mg de cada una de las muestras y se colocaron en un crisol de aluminio. La prueba se realizó en un rango de temperatura de 25 a 250°C con una tasa de calentamiento de 10°C. Cada muestra se analizó por duplicado.

Desarrollo y validación del método analítico por CLAR para la cuantificación de la CFM. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos a alta resolución con un detector de UV con arreglo de diodos (PolychromVarian 9065) y una columna fase reversa C18 (ZORBAX Eclipse XDB, Agilent). Se preparó una curva de calibración de CFM, a partir de una solución patrón, a seis niveles de concentraciones (de 5 a 30 µg/mL.) y la detección se realizó a 282 nm. Posteriormente se evaluó la precisión, el coeficiente de correlación (r^2), el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC), siguiendo el protocolo marcado por EURACHEM (B. Magnusson & U. Ornemark, 2014).

Cuantificación de la clofazimina incorporada en las nanopartículas poliméricas. Un lote de NP-CFM se disolvió en un volumen conocido en una mezcla de solventes. Posteriormente, las soluciones se analizaron por el método de CLAR previamente desarrollado. Finalmente, se determinó el porcentaje de encapsulación (% E) y de eficiencia de encapsulación (% EE) en base a las siguientes fórmulas:

$$\% E = \frac{(\text{mg})\text{CFM cuantificada en NP liofilizadas}}{(\text{mg})\text{NP liofilizadas}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% EE = \frac{(\text{mg})\text{CFM en lote completo de NP liofilizadas}}{(\text{mg})\text{CFM en FO}} \times 100 \quad (2)$$

Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR). El estudio de FT-IR de las formulaciones obtenidas se realizó con la finalidad de establecer algún tipo de interacción entre los componentes de las NP. Distintas muestras fueron colocadas en el porta muestras. Los espectros del PLA, tensoactivo (PVA), NP blanco

y NP-CFM optimizados fueron obtenidos en un rango de 400-4000 cm^{-1} y con 1 cm^{-1} de resolución (Espectrómetro FT-IR FRONTIER, Perkin-Elmer, USA).

Pruebas de liberación in vitro de las nanopartículas poliméricas cargadas.

Inicialmente, se pesó una cantidad conocida de NP cargadas y se resuspendió en el medio de liberación. El seguimiento de la liberación se llevó a cabo durante 28 h, tomando muestras a tiempos previamente establecidos. Las muestras se analizaron con el método por CLAR previamente desarrollado.

Determinación de la actividad antituberculosa de las nanopartículas poliméricas por la técnica de AMBA.

Con el fin de conocer la actividad antituberculosa de las NP cargadas con CFM, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica de Azul de Alamar en Microplaca (AMBA). Previamente, se cultivó la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* HRv37 (ATCC 27294) en caldo de cultivo Middlebrook 7H9 a 37 °C durante dos semanas. Después de purificar, los lotes se esterilizaron y, además, se preparó una solución estándar de CFM en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Inicialmente, en una placa de 96 pocillos, se colocaron 200 μl de agua destilada estéril en los pocillos de la periferia y 100 μl de caldo de cultivo Middlebrook 7H9 en los pocillos de prueba. Se agregaron 100 μl de las suspensiones de NP estériles y la solución estándar de CFM en los pocillos de concentración más alta. Posteriormente, se realizaron diluciones consecutivas 1:2 a lo largo de la placa y se agregaron 100 μl del cultivo previamente preparado. Simultáneamente se prepararon tres controles de la población bacteriana (100, 10 y 1%). Las placas se incubaron a 37 °C por 5 días, se les agregó 20 μl de colorante de azul de alamar y 12 μl de Tween 80 al 10 % (v/v) en los pocillos de prueba. Las placas se reincubaron a 37°C durante 24 h. Después de esta incubación se buscó el cambio de color en el colorante de azul a rosa. Finalmente, se determinó la CMI para cada una de las formulaciones.

III.4 Resultados y Discusión

Elaboración de nanopartículas poliméricas. Con la finalidad de obtener una formulación versátil para distintas vías de administración, se estableció el tamaño de las NP (≤ 200 nm) como parámetro principal a seguir; un tamaño de partícula por

debajo de los 200 nm garantiza que al ser aplicadas por vía intravenosa, estas no formen trombos y se asegura una mayor biodistribución y biodisponibilidad, aumentando sus efectos terapéuticos (Bhatia, 2016). Uno de los factores que más influye en el tamaño de partícula es el solvente presente en la FO. La Tabla III.1, muestra las observaciones y resultados obtenidos para cada una de las modificaciones realizadas durante la elaboración de las NP. Como se aprecia, si bien se obtuvo un tamaño de partícula adecuado (138 a 196 nm) con los solventes probados por separado, la presencia de agregados de polímero fue persistente en la mayoría de los casos. Únicamente, la FO compuesta por acetona presentó un tamaño superior (640 nm). Este comportamiento se atribuye a las diferencias de solubilidad del polímero en los distintos solventes, así como la interacción del solvente con el agua al momento de llevar a cabo la inyección de la FO en la FA, y por ende en el proceso de difusión y posterior formación de las NP (Galindo-Rodriguez, Allémann, Fessi, & Doelker, 2004). Para evitar la formación de agregados y pérdidas de polímero, así como aumentar el rendimiento de nanoencapsulación, se probó el uso de mezclas de solventes. De todas las mezclas probadas (Tabla III.1), sólo con la mezcla de etanol-acetona se logró obtener un tamaño de partícula adecuado (163 nm), con índice de polidispersidad aceptable (0.145) y sin presencia de agregados en el lote final.

Otros autores, han recurrido a la mezcla de solventes para eficientizar la nanoprecipitación, ya que al tener la mezcla de dos solventes con diferente grado de miscibilidad y solubilidad del polímero el proceso de difusión del conjunto en el seno acuoso se lleva de manera “regulada”, lo que permite una correcta formación de las NP y evita la formación de agregados (Alshamsan, 2014).

Una vez que se estableció la mezcla de solventes adecuada para la obtención de las NP, se probaron dos tensoactivos. Como se puede observar en la Tabla III.1, si bien no hubo influencia de la concentración de tensoactivo (PVA o Poloxamer) sobre el tamaño de nanopartícula (160 a 167 nm empleando los dos tensoactivos, respectivamente), son las formulaciones elaboradas con PVA las que presentaron menor PDI, lo cual sugiere que con este tensoactivo, de manera general, el tamaño es más uniforme entre la población de partículas (PDI= 0.040). En estudios anteriores, se estableció que el PVA es un surfactante polimérico que al depositarse en la superficie de la red polimérica en la NP disminuye la tensión interfacial, favoreciendo la

formación de partículas de tamaño similar y con mayor estabilidad durante el proceso de nanoprecipitación (Sharma, Madan, & Lin, 2016).

Tabla III.1. Modificaciones a la técnica de nanoprecipitación para la obtención de las NP biodegradables de PLA cargadas con clofazimina.

Cambios en la formulación		Tamaño (nm)	PDI [▪]	Observaciones	
Solvente	Metanol	196	0.159	Δ	
	Etanol	179	0.130	Δ ●	
	Isorpropanol	138	0.144	Δ ●	
	Acetona	640	0.127	Δ	
Mezcla de Solventes	Metanol-Etanol	ND	ND	Δ ●	
	Metanol-Isopropanol	ND	ND	Δ ●	
	Etanol-Isopropanol	ND	ND	Δ ●	
	Etanol-Acetona	163	0.145	Sin presencia de agregados, ni capa de cristales en superficie de lote final	
	Acetona-Isopropanol	ND	ND	*	
Concentración (%) y Tipo de Tensoactivo	Poloxamer	0.5	167	0.133	
		1	163	0.145	
	Alcohol polivinílico	0.5	165	0.070	
		1	160	0.040	
Concentración de fármaco (μg/ml)	83	161	0.070	Sin presencia de agregados, ni capa de cristales en superficie de lote final	
	167	175	0.188	Δ ●	
	233	189	0.175	Δ ●	

Δ Presencia de agregados.

● Capa de aceite en superficie de lote final.

* Formación de agregados desde inyección de FO en FA (No determinado).

▪ Rango de valor aceptable = 0.000 a 0.200

En cuanto a la influencia de la concentración de CFM presente en la FO, fue posible observar que conforme se aumentó la cantidad de fármaco, hubo una tendencia a la formación de agregados de polímero y aparición de cristales de fármaco en la superficie del lote total. Estos indicios mostraron, cierta interacción no favorable por parte de los elementos de la formulación (polímero y fármaco) cuando se sobrepasa el punto de equilibrio entre ambos durante la difusión y posterior formación de las NP.

La CFM es un fármaco altamente hidrofóbico, con limitada solubilidad en soluciones básicas y en solventes orgánicos se encuentra sin carga (O'Connor, O'Sullivan, & O'Kennedy, 1995). En conjunto, estos factores limitaron la solubilidad de la CFM en la FO, compuesta por etanol-agua. Los resultados mostraron que cuando se emplearon concentraciones más altas de CFM (p.e. 167 y 233 $\mu\text{g/ml}$), probablemente, una fracción del fármaco difundió con el solvente hacia la fase acuosa en la que precipitó formando cristales en la superficie de la dispersión, con lo que se estableció que la FO con una carga de fármaco igual a 83 $\mu\text{g/ml}$ era la adecuada para llevar a cabo la elaboración de las NP-CFM. Por su parte, considerando el proceso de formación de las NP, la presencia del PLA en una concentración de 3.33 mg/ml fue idónea, ya que permitió el atrapamiento de la CFM dentro de la red polimérica de manera simultánea a la agregación del mismo durante la difusión de la FO en la FA, obteniendo NP-CFM con características de tamaño deseado, PDI bajo y evitando la formación de agregados.

Una vez que se establecieron las condiciones que permitieron la obtención de una formulación adecuada, se procedió a la caracterización física de las NP biodegradables blanco (sin fármaco) y las cargadas con CFM. De manera general, los parámetros de tamaño y PDI establecidos durante el proceso de formulación se mantuvieron en las repeticiones de lotes blanco (sin fármaco) y en los lotes con fármaco (Tabla III.2). Para las NP blanco se determinó un tamaño de 166 ± 17 nm y un PDI aceptable con valor de 0.145 ± 0.17 . Por su parte, las NP-CFM mostraron un tamaño de 170 ± 20 con PDI de 0.136 ± 0.26 . Así mismo, no se observó una diferencia significativa en el tamaño de partícula entre los lotes sin o con fármaco, señalando que la incorporación del fármaco no altera de forma importante este parámetro. Además, las NP-CFM mostraron una carga superficial de -18.80 mV (Tabla III.2). Este valor de potencial Z se correlaciona de manera estrecha con la estabilidad de las NP en suspensión; al presentar un valor negativo, como en esta formulación, se asegura que las propiedades coloidales de la misma permanecerán al ser depositadas en un sistema acuoso (Honary, Sohely & Zahir, Foruhe, 2013).

Tabla III.2. Caracterización física de las NPS biodegradables blanco y cargadas con clofazimina.

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Ψ_z (mV)
NP-BCO	166 ± 17	0.145 ± 0.17	ND
NP-CFM	170 ± 20	0.136 ± 0.26	-18.80 ± 6.60
NP-CFM Liofilizadas	147 ± 9	0.176 ± 0.14	ND

$n = 6; \bar{x} \pm \sigma$

De manera particular, otro de los aspectos importantes a establecer durante el diseño de nanoformulaciones con potencial aplicación clínica es que la formulación tenga capacidad para ser liofilizada, se pueda almacenar por períodos de tiempo prolongado mostrando estabilidad fisicoquímica y que pueda ser resuspendida en solución sin presencia de agregados (Fonte, Reis, & Sarmiento, 2016). Considerando lo anterior, un lote de NP-CFM liofilizado (sin sustancias lioprotectoras) se mantuvo en almacenamiento a temperatura ambiente durante dos años y posteriormente, se determinó el tamaño de partícula y PDI de las NP-CFM resuspendidas en agua destilada. Los resultados demostraron (Tabla III.2) que fue posible recuperar el tamaño de partícula al resuspender las NP-CFM en agua destilada después de un proceso de liofilización y almacenaje largo (dos años), registrando valores de 147 nm y 0.176 para el tamaño y PDI, respectivamente. Este resultado es altamente favorable, ya que no sólo se tiene una nanoformulación con características fisicoquímicas adecuadas al momento de su preparación, sino que, después de pasar por un proceso de liofilización (sin lioprotectores) y almacenaje a largo plazo (por dos años), la nanoformulación recupera estas características físicas sin presencia de agregados durante su resuspensión en un sistema acuoso.

Desarrollo y validación del método analítico por CLAR para la cuantificación de la clofazimina. Las NP están constituidas por matrices poliméricas y agentes tensoactivos que dificultan la cuantificación directa del activo incorporado, haciendo indispensable el uso de técnicas cromatográficas validadas. Específicamente, se

desarrolló y validó un método por CLAR para la cuantificación de CFM a partir de las nanoformulaciones. La Tabla III.3 muestra los parámetros de validación obtenidos para el método de cuantificación. Se estableció que el intervalo de concentraciones de 5 a 30 $\mu\text{g/mL}$ es lineal, con un coeficiente de correlación lineal superior a 0.99. Con respecto a la precisión, el método está dentro de los parámetros de aceptación establecidos y coincide con otros resultados previamente reportados, donde también se cuantifica CFM (Queiroz, Pereira, Gotardo, Cordeiro, & Melchior, 2003). En relación a los límites de detección y de cuantificación establecidos en este método, coinciden con otros resultados reportados para métodos analíticos para cuantificar CFM por CLAR a partir de muestras biológicas (Peters et al., 1982; Srikanth, Joshi, Bikkasani, Porwal, & Gayen, 2014). Con dichos resultados se logró obtener un método de cuantificación adecuado y confiable para la cuantificación de CFM a partir de las nanoformulaciones elaboradas durante este trabajo.

Tabla III.3. Parámetros de validación establecidos para la cuantificación de CFM por CLAR.

Parámetro	Valor
Precisión (% DER)	7.89
Coefficiente de Correlación (r^2)	0.99
Límite de Detección (ng/mL)	3.2
Límite de Cuantificación (ng/mL)	9.7

Determinación del % E y % EE de la clofazimina incorporada en las nanopartículas poliméricas. Una de las partes más importante dentro del desarrollo de una formulación farmacéutica es la cuantificación del activo presente. Particularmente, para la nanoformulación que se desarrolló en este trabajo, este parámetro permitió diseñar los protocolos adecuados para la evaluación microbiológica de la misma. Así,

para las NP cargadas con CFM obtenidas por la técnica de nanoprecipitación se calculó el % E y el % EE por método de cuantificación descrito con anterioridad (Tabla III.3). El % EE que se obtuvo para la formulación fue de 62.50 (Tabla III.4). Dicho valor es similar al reportado para otras formulaciones de NP biodegradables elaboradas con otros agentes antituberculosos, tales como, RIF, PZA, INH, para los cuales se reportan % EE de 58.99, 68.02 y 66.31%, respectivamente, o incluso es un valor mayor cuando se compara con el reportado para NP elaboradas con ETO (35.2%) (Ahmad *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011; Pandey, Rajesh & Kuller, 2004; Sharma, Pandey, *et al.*, 2004; Tripathi, Akansha, Gupta, Ranjana, & Saraf, 2010). Por su parte el % E para las NP biodegradables cargadas con CFM fue de 2.05%. Este valor si bien es bajo, es consistente con las características fisicoquímicas del fármaco. La CFM es un fármaco altamente hidrofóbico, lo cual dificulta su incorporación en una formulación. Con anterioridad, se ha intentado incorporar a este fármaco en distintos sistemas de liberación, por ejemplo liposomas, ciclodextrinas, nanoagregados, micelas o nanosuspensiones, pero dichas formulaciones presentan desventajas como baja incorporación del fármaco (micelas) (Fahelbom, Kahiri, Timoney, & Corrigan, 1993), formación de agregados durante proceso de elaboración (nanosuspensión) (Peters, *et al.*, 2000), baja absorción del fármaco encapsulado después de aplicarlo oralmente (implantes) (Kailasam, Subramanian, Wise, & Gangadharam, 1994) poca estabilidad de la formulación (liposomas) (Mehta, 1996), pobre liberación del fármaco a partir del sistema (nanoagregados) (Hernandez-Valdepeña *et al.*, 2009) e inclusive una actividad antituberculosa pobre o limitada (nanoagregados y ciclodextrinas) (Hernandez-Valdepeña *et al.*, 2009; Salem *et al.*, 2003). En contraste, la nanoformulación desarrollada en este trabajo ofrece otra forma de incorporación y administración de un fármaco altamente hidrofóbico, como lo es la clofazimina, en un sistema que presenta alta homogeneidad de tamaño y estabilidad coloidal. Adicionalmente, después de un proceso de liofilización, las NP-CFM mostraron una alta capacidad de reesuspensión en agua al recuperar el tamaño de partícula con valor de 147 nm y PDI de 0.176 (Tabla III.2), lo cual podría reflejarse en mayor estabilidad de almacenaje y facilidad de aplicación por diversas vías de la nanoformulación.

Tabla III.4. Cuantificación de CFM incorporada en las NP biodegradables.

Parámetro	Valor
% Encapsulación	2.05 ± 0.20
% Eficiencia de Encapsulación	62.50 ± 2.16

$n = 6; \bar{x} \pm \sigma$

Perfil calorimétrico de las nanopartículas poliméricas. El análisis térmico de las NP elaboradas permite establecer la conformación del sistema nanoparticulado y en un futuro predecir el comportamiento de las NP durante las pruebas de liberación *in vitro* y parámetros relacionados con la estabilidad de los componentes. La Figura III.1 muestra el análisis por DSC tanto para los materiales utilizados como las NP blanco y cargadas con CFM. En los termogramas obtenidos para las NP blanco y cargadas con CFM fue posible observar dos picos endotérmicos a los 43.61 y 150.33°C, correspondientes a la temperatura de transición vítrea y de fusión del PLA, respectivamente; además se observa un pico de características exotérmicas a los 116.52°C correspondiente a la cristalización del polímero (Figura III.1-D). Dichas señales aparecen en el perfil calorimétrico individual del PLA (Figura III.1-B). Éstos comportamientos coinciden con los reportados en otros trabajos (Gregorova, Adriana, 2013; TA Instruments, USA, 2007). Particularmente, la CFM presenta un comportamiento endotérmico a los 224.58 °C, correspondiente a la temperatura de fusión del fármaco (Figura III.1-A) (Wisam, Mansor, Emad, & Nor Azowa, 2010). La ausencia de esta señal en el perfil de la nanoformulación de CFM puede atribuirse al hecho de que el fármaco se encuentra en estado amorfo dentro de las NP (Figura III.1-D) (Mandal, Bostanian, Graves, Chapman, & Womack, 2002). En conjunto, el análisis calorimétrico de las NP biodegradables cargadas con clofazimina sugiere que la mayor cantidad de CFM se encuentra inmersa en la red compleja del PLA, con un acomodo al azar dentro de la NP.

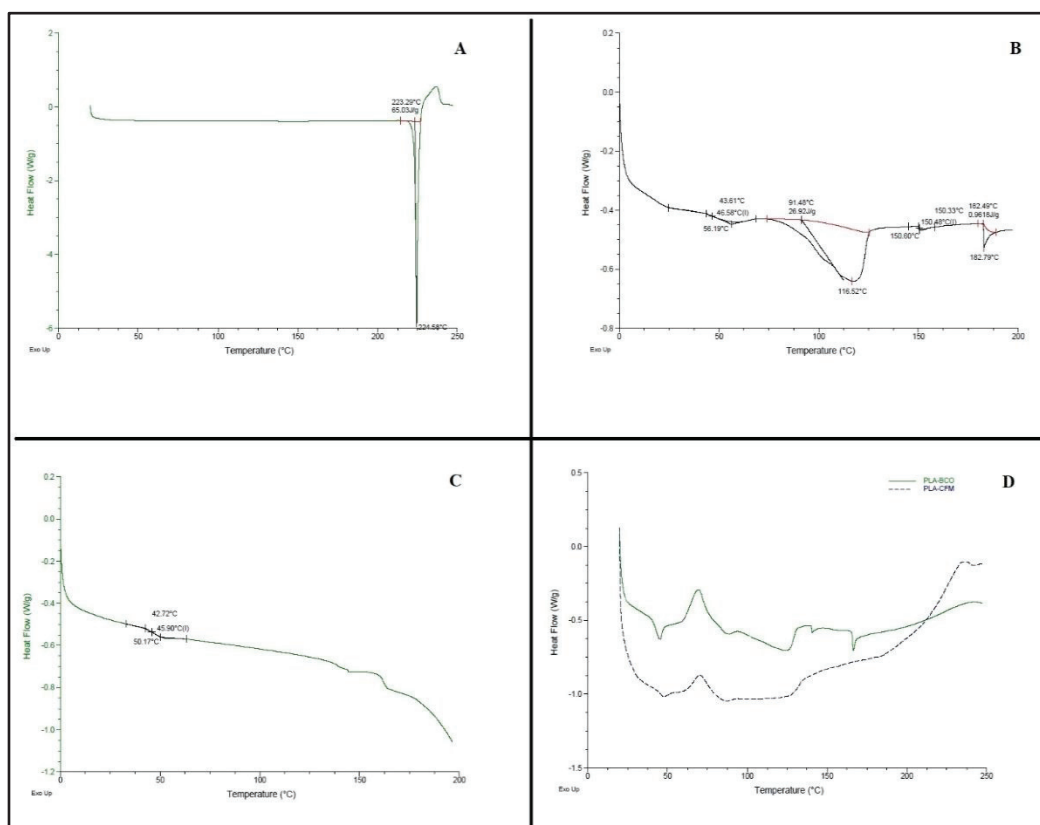


Figura III.1. Perfiles calorimétricos para los materiales y nanoformulaciones por DSC. A) Clofazimina, B) PLA, C) PVA y D) NP-blanco y NP-CFM.

Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR). Para determinar si existen nuevas interacciones entre los componentes de las NP, se analizaron diversas muestras por espectroscopía FT-IR. En la Figura III.2, se muestran los espectros de IR obtenidos para el tensoactivo (PVA), el polímero PLA, la clofazimina, las NP blanco y las NP cargadas.

Inicialmente, se analizaron los espectros para cada uno de los componentes de las NP (PVA, PLA y CFM). Como se puede observar, para el espectro IR del PVA (Figura III.2-A) sobresale una banda alrededor de los $3,400\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo *OH* del segmento alcohólico en la cadena polimérica. Además, la banda presente a los $2,900\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la presencia de grupos *CH*. Por su parte, la banda alrededor de los $1,750\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a la presencia de grupos *C = O* y *C - O*, correspondientes al grupo acetato restante del PVA

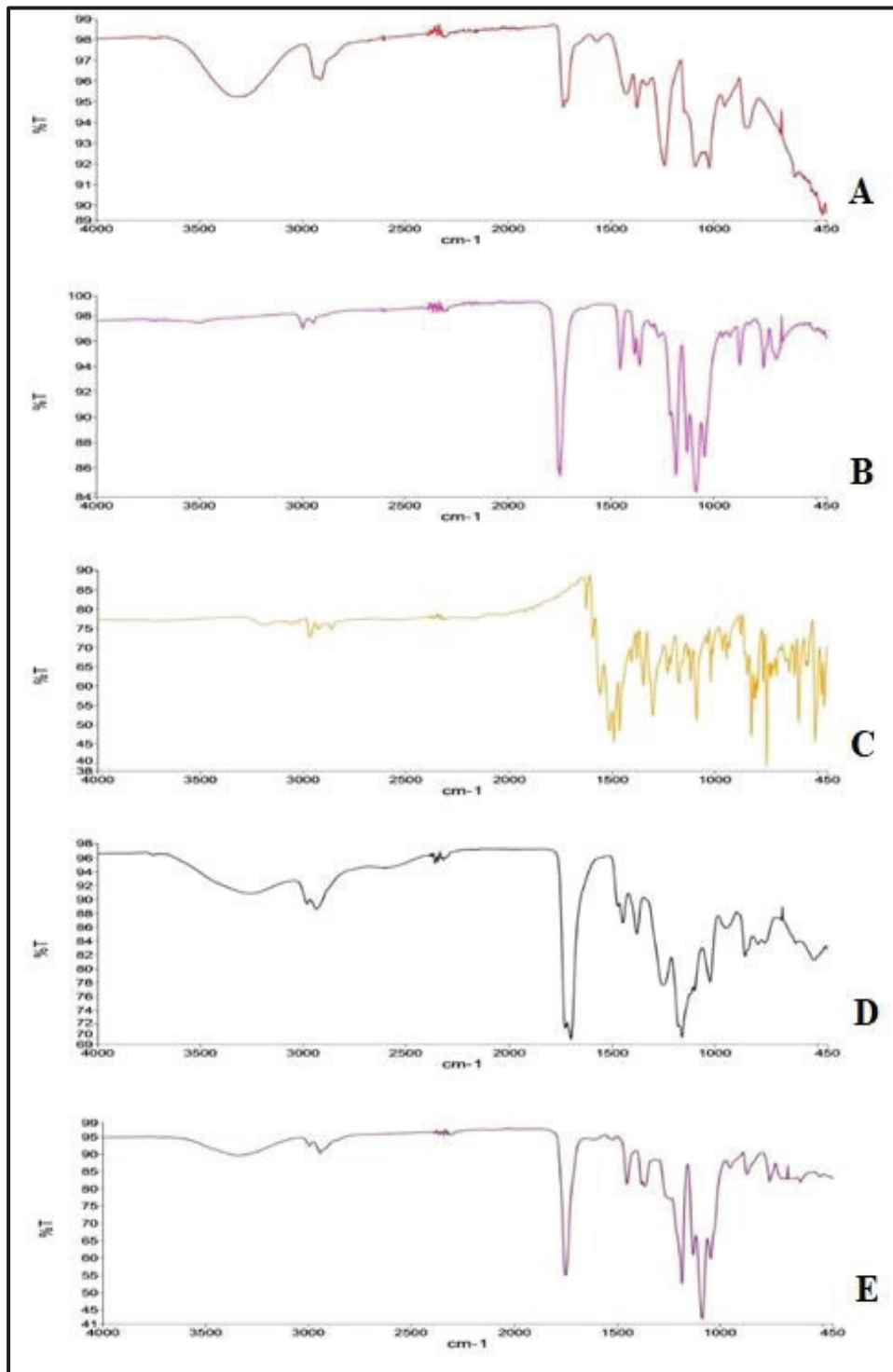


Figura III.2. Espectros de IR con transformada de Fourier: A) PVA, B) PLA, C) CFM, D) NP blanco y E) NP-CFM.

(Krimm, Liang, & Sutherland, 1956). Para el caso del espectro del polímero PLA (Figura III.2-B), se observó la presencia de dos bandas importantes, a los $2,900\text{ cm}^{-1}$ relacionada a la presencia de grupos CH_2 y otra alrededor de los $1,750\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a las vibraciones de los carbonos $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}-\text{O}$, lo cual puede

señalar la presencia del grupo éster en la estructura de la cadena polimérica (Hoidy, Wisam H., Ahmad, Mansor B., Jaffar Al-Mulla, Emad A., & Ibrahim, Nor Azowa Bt., 2010). En cuanto al espectro IR de la clofazimina (Figura III.2-C), se pudieron observar bandas de poca intensidad entre los 2,900 y 3,200 cm^{-1} , las cuales pueden atribuirse a la presencia de grupos CH dentro de un anillo aromático. La banda intensa a los 1,500 cm^{-1} se atribuye a la presencia de grupos $C = C$ en resonancia (anillo aromático). Finalmente, para las bandas obtenidas dentro de la huella del compuesto, se puede observar la presencia de grupos correspondientes a aminas terciarias (de 1,000 a 1,200 cm^{-1}) (O'Driscoll & Corrigan, 1992).

Posteriormente, se analizaron preparaciones de las NP blanco (Figura III.2-D) y NP-CFM (Figura III.2-E). De manera general, las NP blanco y cargadas no presentan diferencia en el espectro IR, salvo por la intensidad de las bandas, la cual es mayor en el espectro de las NP blanco. Además, no hay aparición de nuevas bandas correspondientes a la formación de nuevos compuestos, lo cual indica que sólo hay interacción química entre los compuestos formadores de las NP. En ambos espectros sobresalen las bandas a los 3,400, 2,900 y 1,750 cm^{-1} , que corresponden a la presencia del grupo OH (PVA), grupos CH y CH_2 (PVA, PLA, CFM), así como grupo $C = O$ y $C - O$ (PVA, PLA), respectivamente. Particularmente, en el espectro de las NP cargadas con CFM, se puede observar dentro de la región huella bandas agudas en la región de 1,000 a 1,250 cm^{-1} , las cuales se pueden atribuir a la presencia de aminas terciarias (presentes en el espectro del fármaco solo).

Ensayo de liberación in vitro de las nanopartículas poliméricas blanco y cargadas con clofazimina. Establecer el perfil de liberación de fármacos a partir de sistemas como las NP representa uno de los aspectos más importantes a estudiar, ya que otorgan indicios sobre el posible comportamiento farmacocinético *in vivo* por parte de la nanoformulación. La Figura III.3 presenta el perfil de liberación de las NP biodegradables cargadas con CFM. En el período analizado (0-28 h), se observó una liberación inicial que alcanzó hasta un 50 % de fármaco liberado en un período de 5 h, posiblemente atribuible a un efecto burst, generalmente correlacionado con la liberación inmediata de las moléculas de CFM que se encuentran adsorbidas al sistema nanoparticulado. Al no encontrarse unidas covalentemente al polímero, estas moléculas de CFM, se encuentran disponibles para ser solubilizadas fácilmente en el medio de disolución (Huang & Brazel, 2001). Posteriormente, se observó una segunda

etapa con liberación más paulatina y estable que abarcó de las 5 a 28h, donde se alcanzó una liberación final del 73 % de fármaco a partir de las NP.

Este comportamiento de liberación sostenida puede atribuirse a los mecanismos de degradación del polímero que se dan a lugar en períodos más prolongados. Posteriormente, se observó una segunda etapa con liberación más paulatina y estable que abarcó de las 5 a 28 h, donde se alcanzó una liberación final del 73 % de fármaco a partir de las NP. Este comportamiento de liberación sostenida, puede atribuirse a los mecanismos de degradación del polímero que se dan a lugar en períodos más prolongados. El PLA es un polímero con un mecanismo de liberación basada en el proceso de su degradación. Inicialmente, al entrar en contacto con una solución acuosa, las NP de PLA comenzarán un proceso de absorción del medio de liberación a través de canales, en los cuales se dará lugar a la formación de poros, por los cuales las moléculas de CFM pueden difundir al medio acuoso. Al mismo tiempo, las moléculas de agua comienzan a hidrolizar la molécula de polímero, rompiendo los enlaces éster y acidificando el medio, formando cadenas de PLA con menor peso molecular. Finalmente, la constante formación de poros, la hidrólisis y acidificación del medio durante un tiempo prolongado, da lugar a la erosión (desprendimientos de bloques completos de polímero) del sistema nanoparticulado, la cual termina por liberar las moléculas de CFM que se encuentran en capas más internas, cercanas al centro de la NP (Fredenberg, Wahlgren, Reslow, & Axelsson, 2011). En resumen, estos mecanismos fisicoquímicos rigen la estabilización y prolongación de la liberación de fármacos en los sistemas nanoparticulados biodegradables, como se puede observar en este caso a partir de las 5 horas de liberación (Figura. III.3).

Así, el perfil de liberación mostrado por esta formulación es un resultado prometedor. El hecho de poder observar una liberación paulatina de la CFM a partir de las NP permite establecer pautas, no sólo para mejorar la nanoformulación, sino también, para establecer técnicas de seguimiento y estudio a éste novedoso tipo de formulaciones.

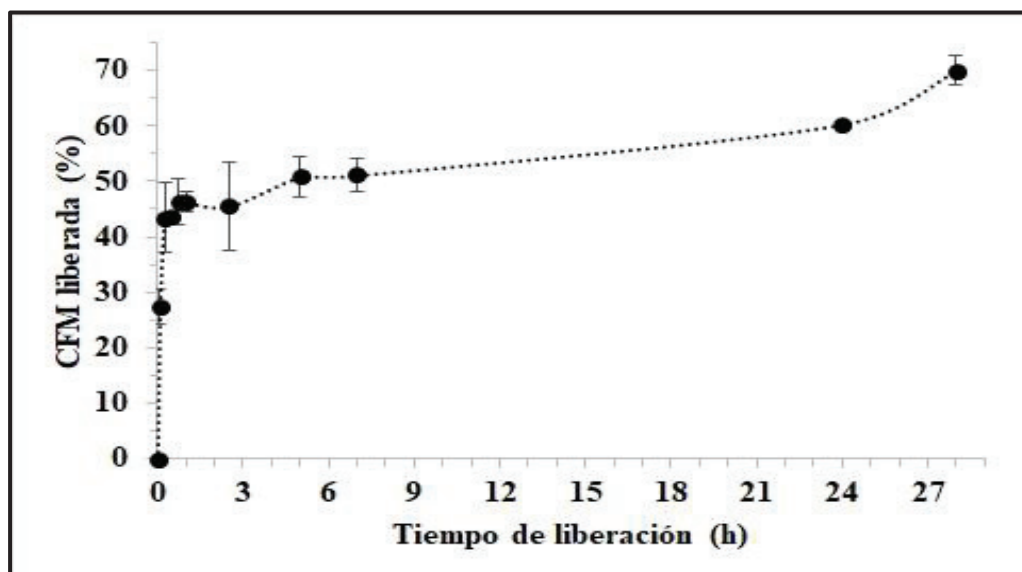


Figura III.3. Perfil de liberación *in vitro* para las NP biodegradables cargadas con CFM (n=2, $\bar{x} \pm DS$).

Determinación de la actividad antituberculosa de las NP. Con el fin de determinar la actividad antituberculosa de la clofazimina después del proceso de encapsulación y determinar la CMI para la formulación de NP cargadas se utilizó la técnica de AMBA en microplaca (Tabla III.5).

Es bien conocida la actividad antituberculosa *in vitro* e *in vivo* de la CFM ante cultivos no solo de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, sino también contra cultivos de *M. avium*, *M. bovis* y *M. avium-intracelular* (Novartis Pharmaceuticals Corporation, 2006; Reddy, Nadadhur, Daneluzzi, O’Sullivan, & Gangadharam, 1996). Sin embargo, los efectos secundarios (coloración amarillenta en tejido adiposo, conjuntiva y piel) y su poca absorción intestinal han dado pie a la búsqueda de nuevas formulaciones que permitan su aplicación eficiente.

Así, en el ensayo *in vitro* realizado en este trabajo (Tabla III.5), se estableció una CMI para el fármaco libre alrededor de los 137 ng/mL. Dicho valor concuerda con el registrado para este fármaco cuando se ensayó *in vitro* contra *M. tuberculosis H37Rv* (100 ng/mL) (Global Alliance for TB Drug Development, 2008). Además, se probaron preparaciones de NP biodegradables blanco (sin fármaco) con el fin de descartar la actividad de los componentes de las NP. Dichas formulaciones dieron resultado negativo ante la prueba, estableciendo que de existir actividad antituberculosa en la formulación de NP biodegradables cargadas (con fármaco), esta es atribuible totalmente a la CFM incorporada en las mismas.

Tabla III.5. Determinación de CMI *in vitro* para el fármaco libre y las formulaciones de NP (blanco y cargadas) contra *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.

Formulación	CMI (ng/mL)
CFM-Libre	136 ± 50.43
NPS-BLANCO	No presentó actividad
NPS-CFM	123.84 ± 82.32

$n = 9; \bar{x} \pm \sigma$

Para este caso, las NP biodegradables cargadas con CFM mostraron una CMI alrededor de los 124 ng/mL. Este valor no sólo es muy cercano con el establecido en la literatura para el fármaco libre (100 ng/mL), sino también ligeramente menor al establecido durante este trabajo (137 ng/mL). Es importante destacar el hecho de que si bien, la nanoformulación no muestra un aumento significativo sobre la actividad antituberculosa propia de la CFM (en comparación con el fármaco libre), dicha actividad previamente establecida, se mantiene a pesar del largo proceso de encapsulación. Procesos fisicoquímicos complejos y variados son necesarios para la elaboración, purificación y posterior aplicación de las NP, por lo que, el conservar la actividad antituberculosa de la CFM es de suma importancia y agrega un valor a la formulación desarrollada en este trabajo. Además, como es de esperarse, el perfil de liberación sostenido *in vitro* que presentaron las NP-CFM pudo haber influido directamente en la actividad antituberculosa de la formulación, evitando la cristalización del fármaco y permitiendo el contacto constante en función del tiempo entre éste y la bacteria, generando una mayor toxicidad para el microorganismo y, por lo tanto, una ligera disminución en la CMI registrada con la CFM libre.

La principal ventaja de una formulación basada en NP cargadas con CFM es que representa un sistema coloidal adecuado para no sólo aumentar la solubilidad del fármaco, que como ya se mencionó, es de naturaleza altamente lipofílica, sino también para permitir su aplicación a partir de una formulación liofilizada, por una vía diferente a la digestiva, por ejemplo, intravenosa o pulmonar, pues los efectos secundarios de la

CFM aplicada por vía oral van desde irritación intestinal, diarrea y cólicos, hasta la cristalización del propio fármaco en el epitelio intestinal, los cuales son motivo para el desuso de la CFM en el tratamiento de la TB.

III.5 Conclusiones

Se obtuvo una formulación biodegradable de NP cargadas con CFM con un tamaño de partícula (200 nm) adecuado para su potencial aplicación por vía IV o pulmonar, así como un % EE adecuado (62.50%) a pesar de ser un fármaco altamente hidrofóbico. La caracterización física de las NP-CFM indicó un potencial de superficie de -18.80 mV, lo cual asegura la estabilidad de las NP en un sistema acuoso. El análisis por FT-IR confirma las interacciones químicas entre los componentes de la formulación, pero no muestra la formación de nuevos compuestos. El estudio de liberación *in vitro* de la nanoformulación mostró un proceso paulatino y sostenido que alcanzó la liberación del 73% de la CFM encapsulada hasta por 28 h. Éste perfil posiblemente favoreció el ligero incremento de la actividad antituberculosa de la CFM nanoencapsulada (CMI=124 ng/ml) en comparación con el fármaco libre (CMI=134 ng/ml) al mejorar el contacto y liberación intracelular *in vitro* del activo en presencia de *M. tuberculosis H37Rv*, comprobando, además, que el proceso de nanoencapsulación no afecta la actividad antituberculosa del fármaco. De manera significativa, las NP-CFM liofilizadas recuperan su tamaño original (147 nm) después de almacenarse durante dos años a temperatura ambiente, lo que demostró la gran estabilidad de la nanoformulación liofilizada en función del tiempo. En conjunto, las características fisicoquímicas, el perfil de liberación sostenido, así como la actividad antituberculosa y la gran estabilidad (NP liofilizadas) mostradas por las NP-CFM sugieren que esta formulación tiene un alto potencial para ser utilizada dentro de un esquema terapéutico para la tuberculosis.

REFERENCIAS

- Ahmad Z, Pandey R, Sharma S, Khuller GK. 2006. Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(5), 409–416.
- Alshamsan A. 2014. Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22(3), 219–222.
- Arbiser JL, Moschella SL. 1995. Clofazimine: a review of its medical uses and mechanisms of action. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 32(2 Pt 1), 241–247.
- Bhatia S. 2016. Chapter 2. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In *Natural Polymer Drug Delivery Systems* (pp. 33–93). Springer International Publishing.
- Fahelbom KMS, Timoney RF, Corrigan OI. 1993. Micellar Solubilization of Clofazimine Analogues in Aqueous Solutions of Ionic and Nonionic Surfactants. *Pharmaceutical Research*, 10(4), 631–634.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1–R4.
- Fonte P, Reis S, Sarmiento B. 2016. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 225, 75–86.
- Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1–2), 34–52.
- Galindo-Rodriguez SA, Allémann E, Fessi H, Doelker E. 2004. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428–1439.
- Global Alliance for TB Drug Development. (2008). Clofazimine. *Tuberculosis*, 88(2), 96–99.

- Gomez-Flores R, Tucker SD, Kansal R, Tamez-Guerra R, Mehta RT. 1997. Enhancement of antibacterial activity of clofazimine against *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex infection induced by IFN-gamma is mediated by TNF-alpha. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39(2), 189–197.
- Gregorova A. 2013. Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry. In *Application of Differential Scanning Calorimetry to the Characterization of Biopolymers, Applications of Calorimetry in a Wide Context* (pp. 3–20). INTECH. Consultado en <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/42247.pdf>
- Hernandez-Valdepeña I, Domurado M, Coudane J, Braud C, Baussard JF, Vert M, Domurado D. 2009. Nanoaggregates of a random amphiphilic polyanion to carry water-insoluble clofazimine in neutral aqueous media. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(2–3), 345–351.
- Hoidy WH, Ahmad MB, Jaffar Al-Mulla EA, Ibrahim NABt. 2010. Preparation and characterization of polylactic acid/polycaprolactone clay nanocomposites. *Journal of Applied Sciences*, 10(2), 97–106.
- Honary S, Zahir F. 2013. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 265–273.
- Huang X, Brazel CS. 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2–3), 121–136.
- Jain Kewal K. 2012. Nanopharmaceuticals. In *The Handbook of Nanomedicine* (Second, pp. 171–223). Springer. Consultado en <http://www.springer.com/in/book/9781603273183>
- Kailasam S, Wise DL, Gangadharam ORJ. 1994. Bioavailability and chemotherapeutic activity of clofazimine against *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice following a single implant of biodegradable polymer. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33, 273–279.
- Kaur IP, Bhandari R, Yakhmi JV. 2014. Lipids as Biological Materials for Nanoparticulate Delivery. In B. Bhushan, D. Luo, S. R. Schrickler, W. Sigmund, & S. Zauscher (Eds.), *Handbook of Nanomaterials Properties* (pp. 409–455). Springer Berlin Heidelberg.

- Krimm S, Liang CY, Sutherland GBBM. 1956. Infrared spectra of high polymers. V. Polyvinyl alcohol. *Journal of Polymer Science*, 22(101), 227–247.
- Kumar G, Sharma S, Shafiq N, Pandhi P, Khuller GK, Malhotra S. 2011. Pharmacokinetics and tissue distribution studies of orally administered nanoparticles encapsulated ethionamide used as potential drug delivery system in management of multi-drug resistant tuberculosis. *Drug Delivery*, 18(1), 65–73.
- Magnusson B, Ornemark U. 2014. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2nd ed.). Consultado en <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>
- Mandal TK, Bostanian LA, Graves RA, Chapman SR, Womack I. 2002. Development of biodegradable microcapsules as carrier for oral controlled delivery of amifostine. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(3), 339–344.
- Mehta RT. 1996. Liposome encapsulation of clofazimine reduces toxicity *in vitro* and *in vivo* and improves therapeutic efficacy in the beige mouse model of disseminated *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8), 1893–1902.
- Nasiruddin M, Neyaz MK, Das S. 2017. Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment. *Tuberculosis Research and Treatment*, 2017, e4920209.
- Novartis Pharmaceuticals Corporation. (2006, May). Lamprene - FDA prescribing information, side effects and uses [Divulgación]. Consultado Junio 7, 2017, en <https://www.drugs.com/pro/lamprene.html>
- O'Connor R, O'Sullivan JF, O'Kennedy R. 1995. The pharmacology, metabolism, and chemistry of clofazimine. *Drug Metabolism Reviews*, 27(4), 591–614.
- O'Driscoll CM, Corrigan OI. 1992. Clofazimine. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, 21, 75–108.
- Pandey R, Ahmad Z. 2011. Nanomedicine and experimental tuberculosis: facts, flaws, and future. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(3), 259–272.
- Pandey R, Zahoor A, Sharma S, Khuller GK. 2003. Nanoparticles encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis*, 83(6), 373–378.

- Pandey R, Kuller GK. 2004. Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(1), 266–268.
- Peters JH, Hamme KJ, Gordon GR. 1982. Determination of clofazimine in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 229(2), 503–508.
- Peters K, Leitzke S, Diederichs K, Borner K, Hahn H, Muller RH, Ehlers S. 2000. Preparation of clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine *Mycobacterium avium* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(1), 77–83.
- Queiroz RHC, Pereira RC, Gotardo MA, Cordeiro DS, Melchior E. 2003. Determination of clofazimine in leprosy patients by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Toxicology*, 27(6), 377–380.
- Reddy VM, Nadadhur G, Daneluzzi D, O’Sullivan JF, Gangadharam PR. 1996. Antituberculosis activities of clofazimine and its new analogs B4154 and B4157. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(3), 633–636.
- Salem II, Steffan G, Düzgünes N. 2003. Efficacy of clofazimine-modified cyclodextrin against *Mycobacterium avium* complex in human macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, 260(1), 105–114.
- Schwinté P, Ramphul M, Darcy R, O’Sullivan JF. 2003. Amphiphilic cyclodextrin complexation of clofazimine. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 47(3–4), 109–112.
- Sharma A, Pandey R, Sharma S, Khuller GK. 2004. Chemotherapeutic efficacy of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle encapsulated antitubercular drugs at sub-therapeutic dose against experimental tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 599–604.
- Sharma A, Sharma S, Khuller GK. 2004. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 761–766.
- Sharma N, Madan P, Lin S. 2016. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 404–416.

- Srikanth CH, Joshi P, Bikkasani AK, Porwal K, Gayen JR. 2014. Bone distribution study of anti leprotic drug clofazimine in rat bone marrow cells by a sensitive reverse phase liquid chromatography method. *Journal of Chromatography B*, 960, 82–86.
- TA Instruments, USA. (2007). TA384 Thermal Analysis Investigation of a Polylactic Acid Biodegradable Plastic. Disponible en: <http://www.tainstruments.com/pdf/literature/TA384%20Thermal%20Analysis%20Investigation%20of%20a%20Polylactic%20Acid%20Biodegradable%20Plastic.pdf>
- Tripathi A, Gupta R, Saraf SA. 2010. PLGA Nanoparticles of anti tubercular drug: Drug loading and release studies of a water. *International Journal of PharmaTech Research*, 2(3), 2116–2123.
- World Health Organization. (2006). Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control. *Weekly Epidemiological Record*, 81(45), 430–432.
- World Health Organization. (2016). *Global Tuberculosis Report 2016*. World Health Organization. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>
- Xie S, Tao Y, Pan Y, Qu W, Cheng G, Huang L, Yuan Z. 2014. Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents. *Journal of Controlled Release*, 187, 101–117.

CAPÍTULO IV:

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFORMULACIONES CON EXTRACTOS DE *Schinus molle* PARA SU APLICACIÓN CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFORMULACIONES CON EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *Schinus molle* PARA SU APLICACIÓN CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

(To be submitted to Journal Pharmaceutical Research)

IV.1 Introducción

La TB es una enfermedad pulmonar causada por *Mycobacterium tuberculosis*, que produce alrededor de 2.5 millones de muertes y 9 millones de casos nuevos al año (World Health Organization, 2016). La OMS ha declarado la presencia de cepas de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes, debido, entre otras cosas, al mal uso y administración de los fármacos antituberculosos convencionales, así como a la larga duración del tratamiento lo que genera desapego por parte de los pacientes (World Health Organization, 2017). En este contexto, la OMS ha establecido estrategias de carácter mundial para el tratamiento y erradicación de la TB, dentro de las que destacan: i) mejora en el esquema de tratamiento, ii) desarrollo de nuevos fármacos, iii) aislamiento e identificación de compuestos químicos a partir de fuentes naturales con potencial antituberculoso, iv) uso de productos etnobotánicos como coadyuvantes en los tratamientos de pacientes y v) diseño y empleo de nuevos sistemas de liberación de activos, entre otras (World Health Organization, 2006).

En años recientes, los extractos naturales obtenidos a partir de plantas han sido sujeto de investigación para el desarrollo de fitofármacos que ayuden al tratamiento de enfermedades de origen bacteriano, tal como la TB (Okunade, Elvin-Lewis, & Lewis, 2004). La diversidad de compuestos que contienen estos extractos y las actividades antimicobacterianas que exhiben en estudios *in vitro* avalan su uso potencial para el tratamiento de la enfermedad (Newton, Lau, & Wright, 2000).

Dentro de los usos medicinales de *Schinus molle* destaca el uso de tizanas como remedio analgésico antibacterial, antifúngico, antiviral, antiespasmódico, astringente, diurético, expectorante, hipotensivo, purgativo, estomáquico, tónico uterino, entre otros (Cabieses, 2013). Se recomienda su uso en padecimientos digestivos (cólicos, bilis, dolor de estómago y estreñimiento). Los tés de hoja se han utilizado para lavados

en enfermedades venéreas (gonorrea). Las vaporizaciones con hoja de pirul han sido utilizadas para tratar resfriados y afecciones bronquiales (asma y bronquitis) (Von Linné, 1753). Además, se ha comprobado que los aceites esenciales obtenidos de *S. molle* tienen significativa actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos, tales como: *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremuris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporigenes*, *Acinetobacter calcoacetica*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Brochothrix thermosphacata*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium culmorum* y *Alternaria alterdata* (Ibrahim & Al-Naser, 2014; De Mendonça *et al.*, 2012; Luque-Alcaraz *et al.*, 2016). Así también, existe una gran cantidad de estudios que demuestran la gran capacidad bioinsecticida de los aceites esenciales de *S. molle* (López *et al.*, 2014).

Particularmente, extractos hexánicos obtenidos del fruto de *S. molle* han demostrado actividad antituberculosa *in vitro* (contra cepas de *M. tuberculosis H37Rv*) con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 125 µg/ml (Molina-Salinas *et al.*, 2007). Esto muestra el potencial que tienen los extractos de la planta para ser utilizados en el tratamiento de la TB.

Si bien los extractos naturales representan una excelente opción para el tratamiento de la tuberculosis, una de sus grandes limitantes para su aplicación en organismos mayores es su recuperación, ya que, al obtenerse por medio de extracciones con solventes orgánicos, los remanentes pueden desencadenar problemas toxicológicos importantes y/o impedir su aplicación en humanos (Bonifácio *et al.*, 2014). La estabilidad y grado de sensibilidad que presentan los diversos compuestos orgánicos en otros entornos (p.e. intra y extracelular, diferentes pH, presencia de enzimas, entre otros) son otro factor a considerar para su aplicación. Además, muchos de los aspectos farmacocinéticos y efectos citotóxicos de los extractos naturales aún se desconocen por completo lo que impide su uso directo (Al-Jaber & Khater, 2014). Para impedir lo anterior, recientemente, se ha estudiado la aplicación de los extractos naturales en sistemas de liberación nanoparticulados, los cuales podrían disminuir los efectos tóxicos de los fitofármacos y otorgar un mejor biodireccionamiento de los compuestos. Así, las nanopartículas poliméricas (NP), proporcionan una novedosa manera de formular y aplicar los extractos naturales (Armendáriz-Barragán *et al.*, 2016; Zorzi, Carvalho, Von Poser, & Teixeira, 2015).

Las NP son sistemas coloidales, con tamaños de 1 a 500 nm, elaborados a partir de polímeros preformados naturales o sintéticos, en los cuales los principios activos pueden estar encapsulados, inmersos, adheridos o adsorbidos en la matriz polimérica. Entre otras cosas, estos acarreadores otorgan protección a los compuestos activos, biodireccinamiento a tejidos o células blanco, liberación prolongada de los activos, disminución en el número de dosis aplicadas y, por lo tanto, aumento de eficiencia en el tratamiento de las enfermedades (Mishra, Patel, & Tiwari, 2010).

Considerando todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar nanoformulaciones a base de polímeros sintéticos y el extracto metanólico obtenido a partir de la hoja del árbol *S. molle* (pirul). Tres polímeros fueron seleccionados para el desarrollo de dos formulaciones biodegradables para aplicación intravenosa con ácido poliláctico (PLA) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y una formulación para aplicación oral con Eudragit L100-55 (EL100-55). Una vez obtenidas, las formulaciones fueron caracterizadas fisicoquímicamente y se estudió la actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis* para evaluar su uso potencial como agente coadyuvante en el tratamiento de la TB.

IV.2 Materiales:

Metanol (MET, Grado CLAR, Tedia®), acetonitrilo (ACN, Grado CLAR, JT Baker®) ácido poliláctico (Sigma-Aldrich®), ácido poli(láctico-co-glicólico) (Sigma-Aldrich®), Eudragit L 100-55 (HELM de México), ácido fórmico (AF, Grado CLAR, Merck Millipore®), acetona (Grado reactivo, CTR Scientific), alcohol polivinílico (PVA), agua destilada y agua milli-Q.

IV.3 Metodología

Recolección del material vegetal: La hoja de *S. molle* se recolectó en la localidad de Arteaga, Coahuila, México durante octubre del 2013. Una vez separada del tallo, la hoja se dejó secar a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

Obtención y caracterización fisicoquímica del extracto metanólico de hoja de S. molle: Para la obtención de extracto metanólico de la hoja (HMM) de *S. molle* se utilizó la técnica de maceración. El extracto seco se conservó en un frasco ámbar bajo refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Para pre-identificar los metabolitos presentes en el extracto HMM, se realizaron las siguientes pruebas fitoquímicas cualitativas: KMNO_4 (presencia de insaturaciones), dinitrofenilhidracilo (presencia de grupos carbonilo), bicarbonato de sodio (presencia de grupos carboxilo), cloruro férrico (grupos OH-fenólicos), Libermann-Burchard (presencia de esteroides/triterpenoides), NaOH al 1% (presencia de cumarinas), Dragendorff (presencia de alcaloides), Baljet (presencia de sesquiterpenlactonas), quinonas, Shinoda (presencia de flavonoides) y antronas (presencia de carbohidratos). El resultado final se expresó como presencia o ausencia del compuesto.

Como parte de la caracterización del extracto HMM se realizaron pruebas de solubilidad de éste en diversos solventes (metanol, etanol, isopropanol, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo y DMSO). Las pruebas fueron de utilidad para la posterior encapsulación del extracto. Los resultados fueron expresados de manera cualitativa en base al grado de solubilidad con cruces.

Nanoencapsulación del extracto metanólico de *S. molle*: Para encapsular el extracto HMM de *S. molle* en NP se utilizó la técnica de nanoprecipitación descrita por Fessi (Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury & Benita, 1989). Brevemente, se elaboró una fase orgánica con acetona, HMM y polímero, según el caso (PLA, PLGA ó EL 100-55). La fase orgánica fue inyectada en 20 ml de PVA al 1% (p/p) (fase acuosa), lo que desencadena un proceso de difusión del solvente y, por consiguiente, la agregación del polímero, induciendo la formación de las NP con el extracto incorporado. La suspensión obtenida fue sometida a evaporación con presión reducida (Rotavapor Modelo RE301, Marca Yamato) para la eliminación del solvente. Para la elaboración de las NP blanco (sin extracto) se siguió la metodología señalada, sin agregar el HMM en la fase orgánica.

Para determinar el tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) se realizó un análisis de la muestra por dispersión dinámica de luz (Nano Zetasizer Z90, Malvern). Brevemente, para la medida de tamaño y PDI, una muestra de 50 μl de NP fue diluída en 2.5 ml de agua destilada y se colocó en la celda de lectura (por triplicado). Para la medida del potencial zeta de las NP, 50 μl de NP fueron diluídos en 2.5 ml de NaCl (0.1 mM, pH fijo) y se colocaron en la celda de lectura (por triplicado).

Purificación y conservación de las NP blanco y cargadas: Una vez evaporadas, las NP fueron sometidas a centrifugación (Allegra™ 64R Centrifuge, Beckman Coulter).

La pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada y se congeló. Posteriormente, para su conservación, las NP se liofilizaron (Liofilizadora LABCONCO Freezone 2.5).

Obtención del perfil cromatográfico por CLAR del HMM y cuantificación en las nanopartículas poliméricas: Como estrategia para dar seguimiento al HMM incorporado en las NP, inicialmente, se desarrolló un método cromatográfico para la obtención del perfil del HMM por CLAR. Brevemente, se preparó una solución de HMM a concentración conocida, la cual fue inyectada en un CLAR con detector UV de arreglo de diodos (Bomba Varian 9012, Autosampler ProStar Varian 410 y Detector Polychrom Varian 9065) y una columna Zorbax (Eclipse Plus, C18, Marca Agilent). Una vez obtenido el perfil cromatográfico del extracto se seleccionaron los tiempos de retención (TR) correspondientes a los picos con mayor área bajo la curva (ABC, mAu/sg) a una $\lambda=220$ nm.

En base ABC de los picos con TR de 28, 38 y 39 min, se preparó una curva de calibración del extracto HMM para cada uno de los picos, en un rango de 3-25 mg/ml (Figura IV.1). La ecuación de la recta y el coeficiente de correlación para cada uno de los picos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla IV.1. Análisis de regresión lineal para las curvas de calibración de HMM elaboradas por CLAR para los picos con TR de 28, 38 y 39 min.

TR de Pico (min)	Ecuación de la Recta	Coefficiente de Correlación (r^2)
28	$y= 169.21x + 326.74$	0.96
38	$y= 196.25x + 272.90$	0.94
39	$y= 489.30x + 571.83$	0.97

Una vez que se establecieron las curvas de calibración se determinaron los parámetros de encapsulación del extracto HMM incorporado en las NP. Para lo anterior, una cantidad conocida de NP cargadas se disolvieron en una mezcla de solventes. Cada muestra se se inyectó en el cromatógrafo con el método antes descrito.

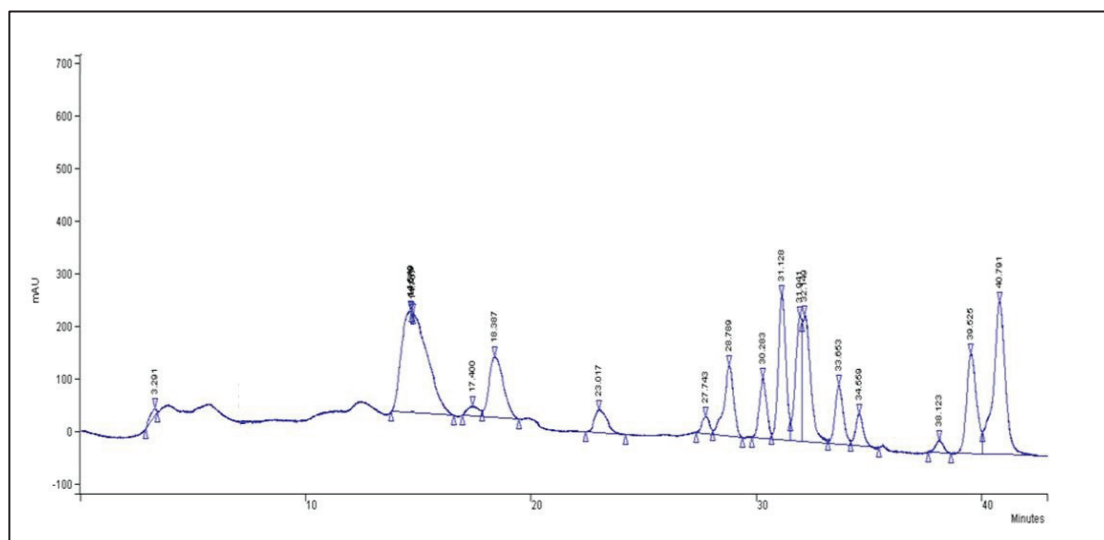


Figura IV.1. Perfil cromatográfico obtenido por CLAR para el extracto crudo HMM de *Schinus molle*.

Una vez obtenido el perfil de las NP cargadas, se determinó el ABC para el pico con TR de 39 min y se estableció el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE), con la fórmula matemática siguiente:

$$\% EE = \frac{(\text{mg}) \text{ Extracto HMM en lote completo de NP}}{(\text{mg}) \text{ Extracto HMM en FO}} \times 100$$

Análisis morfológico de las NP blanco y cargadas con extracto HMM: El análisis morfológico de las NP blanco y cargadas se realizó por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). A partir de lotes purificados, se realizaron diluciones de las NPS. Posteriormente, se colocó una gota de la suspensión sobre un portaobjetos metálico.

Análisis por Espectroscopía de IR con transformada de Fourier (IR-FT) del extracto HMM y las NP cargadas: El FT-IR de las formulaciones obtenidas se analizó con la finalidad de establecer algún tipo de interacción entre los componentes de las NP. Distintas muestras liofilizadas fueron colocadas en el porta muestras. Los espectros optimizados de los tres polímeros empleados, tensoactivo (PVA), NP blanco y NP cargadas con extracto HMM fueron obtenidos en un rango de 400-4000 cm^{-1} y con 1 cm^{-1} de resolución en un FT-IR-Espectro (FT-IR Spectrofotometer FRONTIER, Perkin-Elmer).

Actividad antituberculosa del extracto HMM libre y nanoencapsulado: Para conocer la actividad antituberculosa del extracto libre y nanoencapsulado se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica de Azul de Alamar en Microplaca (AMBA). Inicialmente, una alícuota de *M. tuberculosis H37Rv* (ATCC 27294) se dispuso en caldo de cultivo Middlebrook 7H9 (Beckton-Dickinson) durante dos semanas. Para determinar la CMI del extracto libre, se preparó una solución de HMM en DMSO (800 µg/ml). Además, se elaboraron las NP blanco y NP con HMM, las cuales se esterilizaron por filtración (Steriflip, 0.22 µm, Membrana PVDF, Millipore®).

El día del ensayo, a partir del cultivo previo de *M. tuberculosis* se prepararon 20 ml de suspensión bacteriana ajustados a 0.5 en la escala de Mc Farland en el caldo de crecimiento. A la par, en una placa de 96 pocillos se colocaron 200 µl de agua estéril en los pocillos de la periferia y 100 µl de caldo Middlebrook 7H9 en los pocillos de prueba. Después, se agregaron 100 µl de la solución de HMM libre o de la suspensión de las NP previamente esterilizada en el primer pocillo de prueba. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas a lo ancho de la placa. Finalmente, se agregaron 100 µl de la suspensión bacteriana preparada. Las placas se incubaron a 37 °C por 5 días y posteriormente, se les agregó 20 µl de colorante de azul de alamar y 12 µl de Tween 80 al 10 % (v/v) en los pocillos de prueba. Las placas se reincubaron a 37 °C durante 24 h. Después de esta incubación se buscó el cambio de color en el colorante de azul a rosa. Finalmente, se determinó la CMI para cada una de las formulaciones.

Determinación de la citotoxicidad in vitro del extracto HMM libre y nanoencapsulado: Para determinar la toxicidad se correlacionó la hemólisis inducida por el extracto HMM, las NP blanco o las NP cargadas sobre una muestra de eritrocitos humanos (RBC, por sus siglas en inglés). Brevemente, a partir de una solución de HMM, de una suspensión de NP blanco o de NP cargadas, se prepararon los sistemas (por triplicado) de prueba a seis concentraciones diferentes (10-150 ppm) en presencia de RBC. Así mismo, se preparó un blanco de hemólisis positiva (con agua destilada) y de hemólisis negativa (con PBS). Una vez elaborados los sistemas de prueba, se dejaron en incubación con agitación constante (Modelo Vortemp 56, Marca Labnet). Después de la incubación, los sistemas se sometieron a centrifugación (Force Micro 1624, Marca Select BioProducts) y a partir del sobrenadante se determinó la absorbancia de cada muestra por espectrofotometría UV-VIS (Lector de microplacas

Modelo Epoch, Marca Biotek). Mediante la siguiente fórmula se determinó el porcentaje de hemólisis eritrocitaria en cada muestra, lo cual se consideró directamente proporcional a la citotoxicidad del extracto o las NP:

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

Dónde:

ABS_{mtra}: Absorbancia de la muestra problema.

ABS₀: Absorbancia del PBS.

ABS_c: Absorbancia del control positivo (agua destilada).

Determinación de citotoxicidad del extracto y NP cargadas por ensayo con Artemia salina. Como prueba adicional para establecer el perfil preliminar toxicológico tanto del extracto HMM como las NP cargadas se utilizó el bioensayo con *Artemia salina*. Brevemente, se prepararon soluciones del extracto libre y suspensiones de las NP cargadas en una concentración de 10 a 1,000 ppm en agua salina. A la par, una cantidad de quistes de *A. salina* fueron puestos a eclosionar, bajo condiciones de aereación, a 25 ± 4 °C en una cámara de vidrio. Transcurrido el tiempo de incubación (24-48 h), los nauplios eclosionados fueron recolectados y se colocaron en una caja de poliestireno de 24 pozos (20 nauplios por pocillo de prueba). A partir de las preparaciones elaboradas con el HMM y las NP se tomó una alícuota y se colocó en el pocillo de prueba correspondiente, para posteriormente, dejarse bajo incubación durante 24 h (25 ± 4 °C). Finalmente, después de la incubación, se realizó un conteo de los nauplios vivos y muertos para determinar la LC₅₀ por medio de un análisis estadístico PROBIT tanto para el extracto libre como encapsulado.

Pruebas de liberación in vitro del HMM incorporado en las nanopartículas poliméricas. Para obtener el perfil de liberación *in vitro* de las NP cargadas con HMM; inicialmente, se pesó una cantidad de NP cargadas y se resuspendió en el medio de liberación (Tween para las NP de PLA y PLGA o agua destilada pH ácido para las NP de EL 100-55). El lote resuspendido se dividió en 10 muestras independientes, las cuales se incubaron a 37 °C y se mantuvieron bajo agitación ligera constante. El estudio de liberación se llevó a cabo durante 28 h, tomando muestras a tiempos previamente establecidos. Las muestras se centrifugaron y a partir del sobrenadante se

llevó a cabo la cuantificación del fármaco liberado con el método por CLAR previamente desarrollado.

IV.4 Resultados y Discusión

Obtención del extracto y caracterización fitoquímica: El extracto metanólico de hoja de *S. molle* se obtuvo por medio de la técnica de maceración. Dicha técnica permite obtener un buen rendimiento de extracto y, además, disminuye el riesgo de que los compuestos contenidos en el extracto sean afectados en sus propiedades fisicoquímicas (degradación) o su actividad biológica (inhibición de propiedades biológicas), ya que no se requiere aplicar calor. Además, es una técnica sencilla y de bajo costo, que permite utilizar diversos solventes y así, obtener una gama amplia de extractos naturales a partir de plantas (Nn. Azwanida, 2015). El porcentaje de rendimiento obtenido para el extracto HMM fue de 12.7%.

Como parte de la caracterización fisicoquímica del extracto se elaboraron pruebas de preidentificación de las familias de compuestos químicos presentes en el extracto HMM. La Tabla IV.2 contiene los resultados para las pruebas fitoquímicas realizadas, las cuales, mostraron ser positivas para la presencia de compuestos con insaturaciones, grupos fenólicos y flavonoides. Dentro de los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas se encuentran los polifenoles. Químicamente, son compuestos que presentan uno o varios grupos fenólicos en su estructura (Martins, Barros & Ferreira, 2016). Dentro del amplio espectro de actividades biológicas atribuibles a los polifenoles se encuentran la antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana y antiviral (Li *et al.*, 2014). Particularmente, dentro de este grupo se encuentran los flavonoides, compuestos que han mostrado actividad antimicrobiana, entre otras (Odeh *et al.*, 2014). Considerando el resultado positivo de estas pruebas en el extracto HMM, se supuso que la actividad antibacteriana, particularmente, antituberculosa, podría estar presente en el extracto.

Tabla IV.2. Evaluación cualitativa y de preidentificación fitoquímica por pruebas colorimétricas del extracto HMM.

Prueba Fitoquímica	Resultado
KMnO ₄ (Insaturaciones)	Positivo
Dinitrofenilhidracilo (Grupo Carbonilo)	Negativo
Bicarbonato de Sodio (Grupo Carboxilo)	Negativo
Cloruro Férrico (Grupo OH Fenólico)	Positivo
Liebermann-Burchard (Esteroles/Terpenos)	Negativo
NaOH al 10% (Cumarinas)	Negativo
Dragendorff (Alcaloides)	Negativo
Baljet (Sesquiterpenlactonas)	Negativo
Quinonas	Negativo
Saponinas	Negativo
Shinoda (Flavonoides)	Positivo
Antronas (Carbohidratos)	Negativo

En cuanto a los ensayos de preformulación del extracto HMM, la Tabla IV.3 muestra los resultados para las pruebas de solubilidad. El extracto fue soluble en metanol, etanol y acetona. Las pruebas de solubilidad permiten establecer y desarrollar otros procesos con los activos de interés (p.e. encapsulación, pruebas de actividad biológica, pruebas toxicológicas, entre otras).

Tabla IV.3. Pruebas de solubilidad del extracto HMM en solventes parcialmente miscibles en agua.

Solvente	Resultado
Metanol	+++
Etanol	++
Isopropil	++
Acetona	+++

(-) Insoluble, (+) Poco soluble, (++) Soluble, (+++) Muy soluble
1 ml de solvente

Nanoencapsulación del extracto metanólico de Schinus molle: Para la elaboración de las NP se utilizó la técnica de nanoprecipitación. Dentro de los estudios de preformulación es importante conocer la influencia de los diversos factores implicados en la elaboración de las NP. Previamente, se había establecido como tamaño ideal NP con un tamaño alrededor de los 200 nm. Se ha documentado que éste tamaño de partícula presenta una mayor interacción con substratos biológicos, tales como bacterias, tejidos (p.e. piel, gastroentérico, pulmonar, entre otros) y células sanguíneas (Shang, Nienhaus & Nienhaus, 2014). Además, éste tamaño permite la fagocitación de las partículas por parte de los macrófagos, los cuales funcionan como reservorios del bacilo tuberculoso durante el desarrollo de la tuberculosis pulmonar. Por lo que, es probable que esta característica de las NP pueda influir en un aumento de la efectividad de la nanoformulación desarrollada contra *M. tuberculosis* (Mailänder & Landfester, 2009). Así, con el objetivo de determinar la cantidad de polímero necesaria para el desarrollo de la formulación con tamaño ideal, se realizó un estudio de la relación de la cantidad de polímero (10-70 mg) presente en la fase orgánica sobre el tamaño de partícula. La Figura IV.2 muestra los resultados del estudio. De manera general, se observó una relación directamente proporcional entre la cantidad de polímero utilizada y el tamaño de partícula, siendo las formulaciones elaboradas con PLA y EL100-55 las que presentaron mayor y menor tamaño, respectivamente.

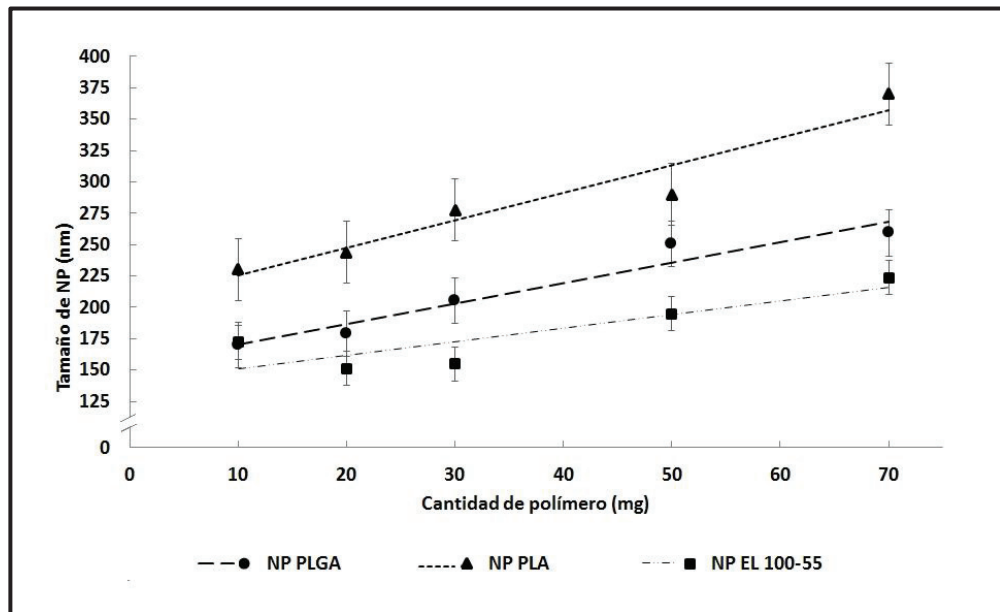


Figura IV.2. Influencia de la cantidad de polímero presente en la fase orgánica sobre el tamaño de nanopartícula ($n=3$, $\bar{x} \pm DS$).

Particularmente, NP con un tamaño de entre 230 y 370 nm se presentaron cuando se utilizó PLA como polímero formador. En el caso de las NP de PLGA el rango de tamaño obtenido fue de entre 170 a 260 nm y, finalmente, para las NP elaboradas con EL 100-55 se obtuvo un tamaño de 175 a 225 nm en un rango de 10 a 70 mg de polímero, respectivamente. Todas las formulaciones mostraron un PDI inferior a 0.2 lo que garantizó la homogeneidad poblacional de las partículas en las preparaciones. Los resultados coinciden con tendencias obtenidas en otras formulaciones elaboradas con los mismos polímeros (Clemens *et al.*, 2012; Lim, Tiemann, Hunstad, Elsabahy, & Wooley, 2016). Al aumentar la cantidad de polímero en la fase orgánica, una mayor cantidad de cadenas están disponibles para su posterior agregación durante el proceso de difusión del solvente, que se da lugar en la inyección de la fase orgánica en la fase acuosa, resultando en NP de mayor tamaño (Nasiruddin, Neyaz, & Das, 2017). Además, sin importar el polímero que se utilice, una mayor cantidad de polímero disuelto por unidad de solvente, genera el aumento en la viscosidad de la fase orgánica, lo que influye directamente sobre la inyección de esta en la fase acuosa, generando una difusión de solvente con mayor o menor velocidad si la concentración de polímero es baja o alta, respectivamente, resultando en un mayor tamaño de partícula cuando la fase es más viscosa (con mayor cantidad de polímero presente) (Figura IV.2).

Otro parámetro que puede influir sobre el tamaño de la NP formada es la composición química del polímero, ya que está directamente relacionado con las interacciones químicas que éste pueda o no establecer ya sea entre sus cadenas (afectando el plegamiento del polímero) o el grado de solubilidad que presente el polímero en solución (formación de agregados durante nanoprecipitación). Especialmente, los grupos terminales presentes en los polímeros utilizados en este trabajo son éster, ácido (COOH) y metacrilato para el PLA, PLGA y EL100-55, respectivamente. Para el caso de los polímeros biodegradables, la solubilidad limitada que pudo presentar la cadena polimérica de PLA (presencia del grupo terminal éster) en comparación con la de la cadena con grupo ácido terminal del PLGA debido a la interacción con la acetona (solvente de la fase orgánica) y el agua de la fase acuosa pudo influir en el aumento de tamaño que se obtuvo cuando se utilizó PLA como polímero formador de las NP. Para el caso del polímero metacrilato EL10055 las diferentes interacciones químicas que presenta tanto con la fase orgánica como la acuosa, aunado a las interacciones solvente-agua propias de la acetona pudieron haber influido en el rango de tamaño obtenido para las NP, las cuales fueron más pequeñas que las obtenidas con los polímeros biodegradables (Schubert, Delaney, & Schubert, 2011; Song *et al.*, 2006). En un estudio elaborado por Galindo-Rodríguez y col. se demostró que la acetona, al tener un valor bajo del parámetro de solubilidad solvente-agua, permitía la obtención de NP en un rango de tamaño entre los 100-200 nm, sin formación de agregados, lo cual era un rango muy estrecho en comparación a los obtenidos con otros solventes (p.e. etanol, dimetilsulfoxido o alcohol isopropílico). Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en éste trabajo y puede explicar el fenómeno que generó la obtención de NP de menor tamaño con el EL10055 en comparación con las formulaciones de PLA y PLGA (Galindo-Rodríguez, Allémann, Fessi, & Doelker, 2004). Así, se seleccionaron como adecuadas las formulaciones con 10, 20 y 50 mg de PLA, PLGA y EL10055 en la fase orgánica, respectivamente, para preparar las NP. Finalmente, una vez que fue posible la obtención de NP con un tamaño alrededor de los 200 nm y sin presencia de agregados poliméricos en el lote final, se continuó con la incorporación del extracto HMM en las formulaciones.

En otra caracterización de las NP, la Tabla IV.4 muestra los valores de potencial zeta (ζ) obtenidos para cada formulación, los cuales fueron negativos, indicando que las NP en suspensión presentan cierta estabilidad, conservando las propiedades físicas

propias de un sistema coloidal e impidiendo la formación de agregados de partículas en función del tiempo.

Tabla IV.4. Caracterización fisicoquímica de las nanoformulaciones con extracto HMM.

Formulación	Tamaño de NP (nm) *	Índice de Polidispersidad (PDI) *	Potencial Zeta (ζ) (mV) *	Eficiencia de Encapsulación (%) **
PLA-HMM	230.13 \pm 20.3	0.106 \pm 0.025	-16.35 \pm 1.77	32.99 \pm 15.88
PLGA-HMM	179.20 \pm 5.40	0.199 \pm 0.023	-14.70 \pm 0.14	34.40 \pm 18.08
EL10055-HMM	195.00 \pm 15.80	0.173 \pm 0.023	-21.20 \pm 0.023	44.32 \pm 20.80

* (n=3, $\bar{x} \pm DS$)

** (n=5, $\bar{x} \pm DS$)

Obtención del perfil cromatográfico por CLAR del HMM y cuantificación en NP:

Cómo parte de la caracterización química del extracto HMM se estableció un método cromatográfico para la obtención del perfil de compuestos presentes en el extracto HMM para posteriormente, cuantificar el extracto HMM incorporado en las formulaciones. Convencionalmente, el seguimiento de los perfiles cromatográficos desarrollados por CLAR, puede realizarse en base a la identificación de compuestos huella presentes en el extracto (Augusti Boligon & Linde Athayde, 2014), sin embargo, en muchas ocasiones debido a la complejidad química de los extractos y la necesidad de utilizar técnicas de identificación química más complejas y costosas (p.e. espectroscopía de masas) es difícil establecer éste tipo de estrategias. Así, en este trabajo se estableció una metodología nueva y diferente. En la Figura IV.1 se muestra el perfil del extracto HMM obtenido por CLAR, donde, de manera general, se pudieron observar 16 señales que se atribuyeron a 16 compuestos presentes en el extracto crudo. Posteriormente, en base al ABC que presentaban las diversas señales, se seleccionaron tres picos, con TR de 28, 38 y 39 min, los cuales se consideraron como los compuestos mayoritarios (por presentar la mayor ABC). Después, se realizó una curva de calibración en un rango de concentración de 3-20 mg/ml de extracto y se realizó un análisis de regresión lineal de los datos obtenidos para establecer la ecuación de la recta ($y=mx+b$) y el coeficiente de correlación (R^2). De las tres ecuaciones de la recta obtenidas, la correspondiente al pico con TR de 39 min fue la que presentó una mayor

correlación entre los datos analizados (Tabla VI.1), con un $R^2=0.97$. A pesar de ser un coeficiente de correlación con valor por debajo de 0.99, el valor es aceptable, pues, como se mencionó con anterioridad, los extractos naturales son matrices muy complejas, dónde la cantidad y composición de los compuestos químicos pueden presentar alta variabilidad, aún entre muestras tomadas a partir del mismo extracto. Este valor indicó que la curva de calibración obtenida con la señal del pico con TR de 39 min era adecuada para poder establecer los porcentajes de encapsulación para cada una de las formulaciones y finalmente, la dosificación de las NP en la determinación de la CMI sobre *M. tuberculosis*.

Una vez que se estableció el método de cuantificación de las NP por CLAR, se establecieron los porcentajes de encapsulación para las formulaciones de interés. La Tabla IV.4 muestra los valores de % EE obtenidos para la formulación de PLA-HMM, PLGA-HMM y EL10055-HMM. De manera general, la formulación elaborada con EL10055 mostró un mayor % EE (44.32%) en comparación con las formulaciones elaboradas a partir de los polímeros biodegradables. Por su parte, las formulaciones de PLA-HMM y PLGA-HMM mostraron porcentajes similares entre ellas (32.99 ± 15.88 y $34.40 \pm 18.08\%$, respectivamente). Éstos % EE no son tan altos como los registrados para otras formulaciones elaboradas a partir de extractos naturales (Jia, Barwal, Thakur, & Yadav, 2015; Pereira *et al.*, 2015; Renuka, 2013). Sin embargo, es de esperarse que la incorporación de un producto natural tan complejo como un extracto crudo sea un proceso más difícil y represente un reto mayor en comparación con un activo único (p.e. fármaco o compuesto aislado), por lo que, de primer inicio, estos porcentajes de encapsulación se consideraron adecuados para continuar con la evaluación y caracterización de las NP.

La diferencia en la incorporación del extracto HMM entre las diversas formulaciones puede atribuirse a dos aspectos importantes: i) los relacionados con las características químicas de los elementos implicados en la formulación y ii) los relacionados con las características físicas de la formulación como tal. Considerando el primer aspecto, la incorporación de activos en las NP depende, principalmente, de las interacciones o afinidad entre los grupos funcionales de los polímeros y los grupos funcionales propios de los compuestos químicos presentes en los activos encapsulados (p.e. extractos, aceites esenciales, fármacos). Así, probablemente, en la formulación elaborada con el polímero EL10055, la presencia de los grupos metacrilato terminales pudieron

presentar una mayor afinidad por las moléculas presentes en el extracto HMM, reflejando ser la formulación con una mayor incorporación de activo. Para el caso de las NP elaboradas con PLA tanto la presencia de los grupos éster terminales, como la hidrofobicidad propia del monómero D,L-láctico pueden explicar la incorporación selectiva de distintos tipos de moléculas (Tokiwa & Calabia, 2006). Un fenómeno similar puede presentarse en las formulaciones elaboradas con PLGA, el cual es un copolímero formado por unidades de ácido láctico y ácido glicólico. Las interacciones químicas que éste polímero puede establecer con otros compuestos está directamente vinculada a la relación en que los monómeros están presentes dentro de la macromolécula (en éste caso 50:50), siendo la unidad de ácido glicólico la que determina la hidrofiliidad global del polímero (Makadia & Siegel, 2011). Además, la presencia de grupos ácidos terminales también se relaciona con éste aspecto. Considerando lo anterior, es posible que tanto los grupos terminales presentes, así como el grado de hidrofobicidad/hidrofiliidad del PLA y PLGA, influyeran directamente sobre la cantidad (porcentaje de encapsulación) y el tipo de moléculas (hidrofílicas o hidrofóbicas) del extracto que fueron incorporadas, reflejando porcentajes de encapsulación menores que el obtenido con el polímero EL10055, pero no obstante siendo similares entre ellas (Tabla IV.4).

En cuanto al segundo aspecto, las propiedades físicas de la formulación, la diferencia de la incorporación del extracto en las NP pudo deberse a que la cantidad inicial de polímero utilizada en cada formulación fue diferente, siendo de 10, 20 y 50 mg para el PLA, PLGA y EL10055, respectivamente (Figura IV.3). Generalmente, una mayor cantidad de polímero en la fase orgánica propicia dos fenómenos que pueden incrementar la incorporación del activo. Por una parte, al incrementar la cantidad de polímero aumenta el número de cadenas poliméricas disponibles para interactuar químicamente con una mayor cantidad de moléculas del principio activo a incorporar, reflejándose en una mayor incorporación del mismo en el sistema. Adicionalmente, el incremento de polímero genera NP más grandes, las cuales, eventualmente, tienen un espacio físico más grande dónde un mayor número de moléculas de activo pueden acomodarse, generando a su vez, una mayor incorporación del activo.

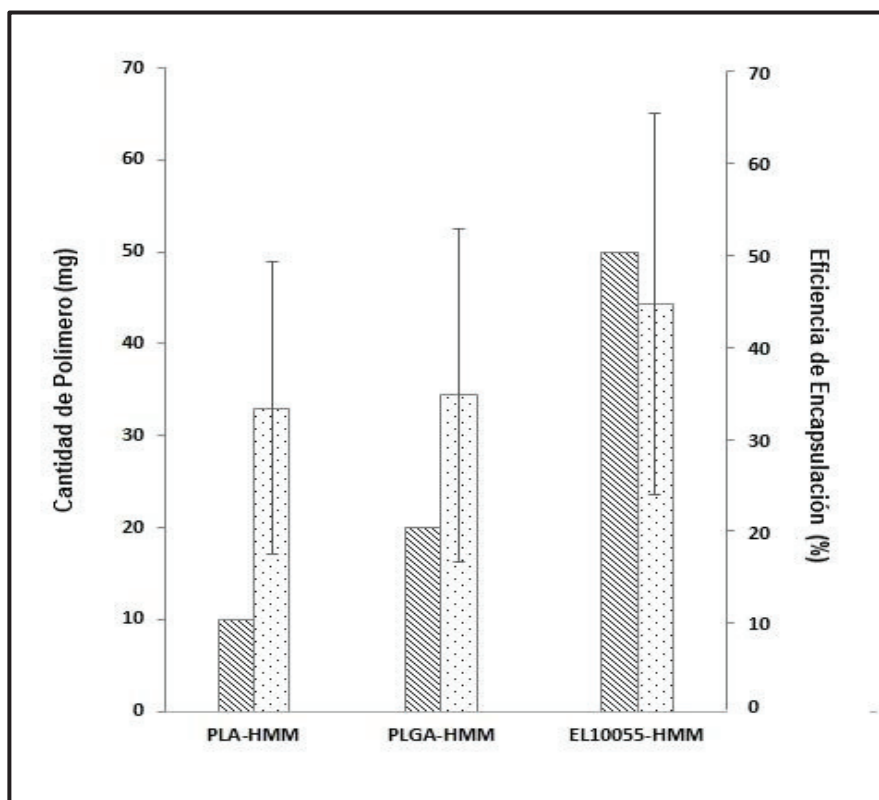


Figura IV.3. Comparación entre formulaciones en base a la cantidad de polímero utilizada en la fase orgánica y la eficiencia de encapsulación del extracto HMM (n=5, $\bar{x} \pm DS$).

Análisis morfológico de las nanopartículas poliméricas blanco y con extracto HMM: El análisis morfológico de la formulación de PLGA (para esquematizar la morfología de las partículas biodegradables) y EL 100-55 fueron observadas por MET. La Figura IV.4 muestra la microscopía para las NP blanco (A) y de PLGA-HMM (B) dónde se observan partículas de forma esférica; el tamaño y distribución poblacional de partícula coincide con el registrado para esta formulación con anterioridad por DLS (Nano zetasizer Z90). En el caso de la formulación elaborada con EL 100-55 (Figura IV.4-C y IV.4-D) se muestran partículas con características físicas similares (forma esférica, superficie lisa, tamaño e índice similar al registrado anteriormente).

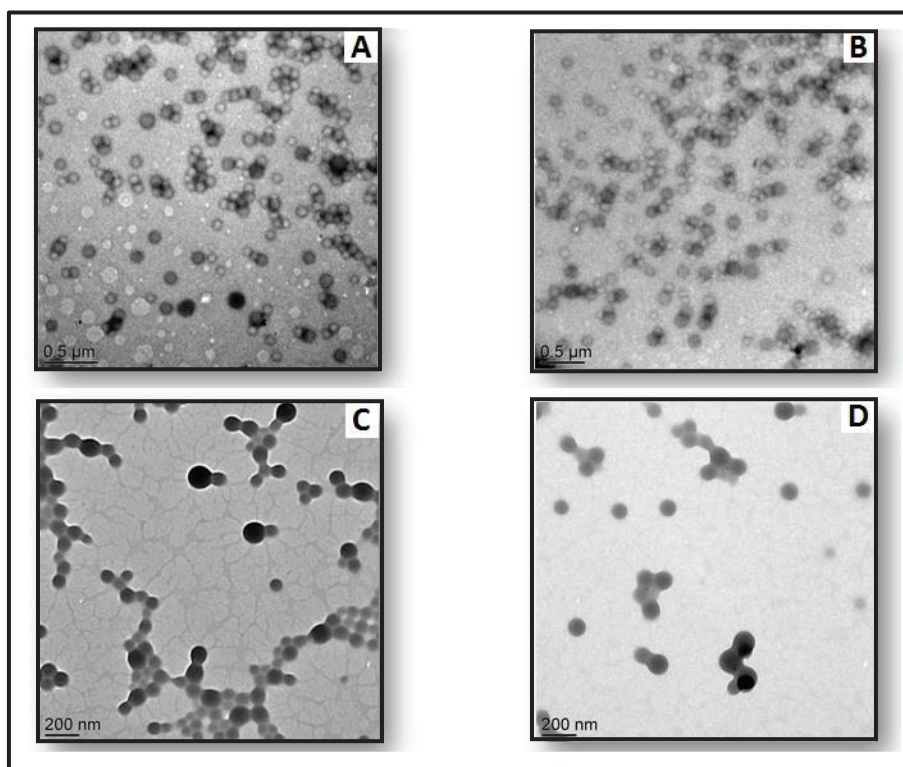


Figura IV.4. Microscopía Electrónica de Barrido de las nanoformulaciones.
 A) NP PLGA blanco, B) NP PLGA cargadas, C) NP EL10055 blanco y D)
 NP EL10055 cargadas.

Análisis térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido de las nanoformulaciones: El extracto natural HMM presenta tres picos endotérmicos (Figuras. IV.5-C y IV.6-C) a 103, 118 y 140 °C, siendo éste último de mayor anchura y entalpía (224.3 J/g), lo cual se puede atribuir a la amplia mezcla de compuestos presentes en el extracto crudo, tal y como reportan perfiles calorimétricos para otros extractos naturales (Anbinder, Deladino, Navarro, Amalvy, & Martino, 2011). Respecto a las NP elaboradas con PLGA, tanto el polímero como las NP blanco y cargadas muestran un pico endotérmico característico a 38 °C (Figuras. IV.5-D y IV.5-E), el cual indica la transición vítrea para el polímero presente (Swarnali Islam, 2011). Por su parte, las NP cargadas con el extracto HMM muestran una endoterma de poca intensidad alrededor de los 175 °C, esto puede deberse a que los compuestos se encuentran en forma amorfa dentro de las NPS (Mandal, Bostanian, Graves, Chapman, & Womack, 2002).

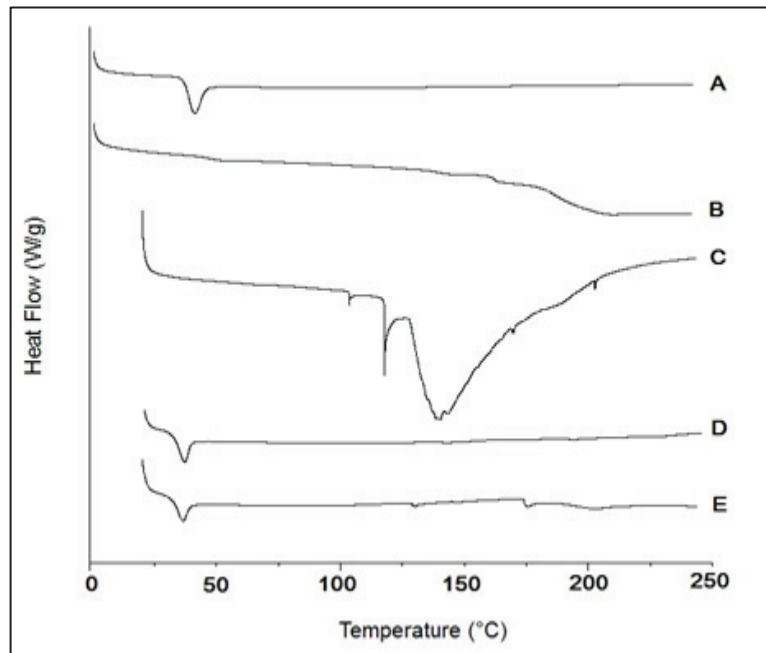


Figura IV.5. Calorimetría Diferencial de Barrido para las nanoformulaciones elaboradas con PLGA. A) PLGA, B) PVA, C) Extracto HMM, D) NP PLGA blanco y E) NP PLGA cargadas con HMM.

Por su parte, las NP de EL 100-55 blanco y cargadas con HMM muestran un pico endotérmico característico (Figuras IV.6-C y IV.6-D) alrededor de los 150 °C, el cual aparece también en el perfil del polímero (Figura IV.6-B), éste puede ser atribuido a la transición vítrea del polímero (Parikh, Gupta, Meena, & Serajuddin, 2014). Cuando el extracto está presente en las NP (Figura IV.6-E) un pico endotérmico agudo aparece a los 219 °C. Esta señal desplazada puede atribuirse a la presencia del extracto HMM encapsulado (o grupo de compuestos). Tanto el desplazamiento como la intensidad de éste endoterma pueden atribuirse a que el extracto o compuestos presentes se encuentran en estado cristalino dentro del sistema nanoparticulado.

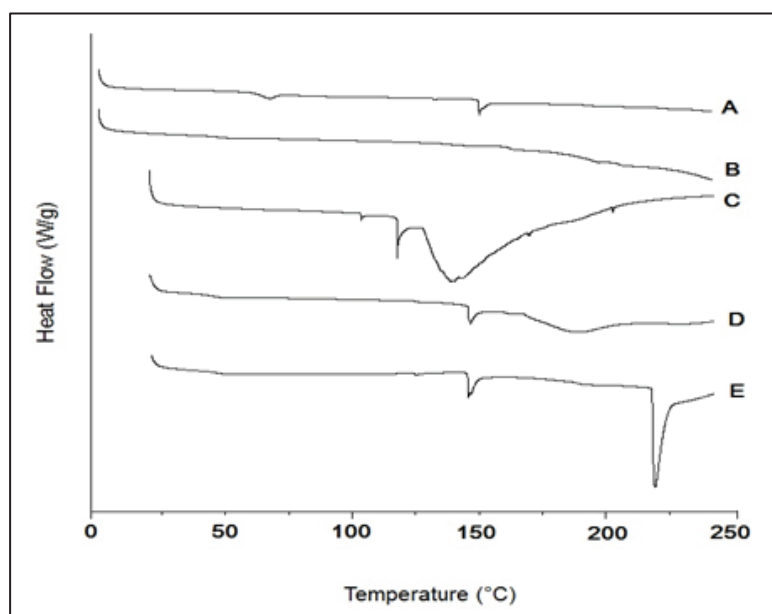


Figura IV.6. Calorimetría Diferencial de Barrido para las nanoformulaciones con EL10055. A) EL10055, B) PVA, C) Extracto HMM, D) NP EL10055 blanco, E) NP EL10055 cargadas con HMM.

Análisis por Espectroscopía de IR con transformada de Fourier (IR-FT) del extracto HMM y las nanopartículas poliméricas con HMM: Con el objetivo de determinar si existían nuevas interacciones químicas entre los componentes de las NP (polímero, tensoactivo y extracto HMM) que pudieran afectar la bioactividad de las nanoformulaciones se realizó un análisis por FT-IR de los componentes y las tres nanoformulaciones (blanco y cargadas). La Figura IV.7 muestra los espectros IR obtenidos en un rango de 400 a 4,000 cm^{-1} para el PVA, los polímeros y las nanoformulaciones. En el caso del tensoactivo PVA (Figura IV.7-A) fue posible determinar la presencia de la banda ancha para un estiramiento OH (3,000 a 3,500 cm^{-1}), la cual es característica para éste compuesto (Krimm, Liang, & Sutherland, 1956). Por su parte, los polímeros biodegradables PLA y PLGA (Figuras IV.7-B y IV.7-C), al tener estructuras químicas similares, presentaron bandas correspondientes a estiramientos $\text{CH}_3/\text{CH}_2/\text{CH}$ y grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) a los 2,900-3,000 y 1,600-1,750 cm^{-1} , respectivamente, característicos para la preidentificación de éstos materiales (Stevanović, Radulović, Jordović, & Uskoković, 2008; Orozco, Brostow, Chonkaew, & López, 2009). Así mismo, en el EL 100-55 (Figura IV.7-D) se observaron bandas entre los 3,000 a 3,600, 2,900, 1,600 a 1,750 y 1,200 a 1,350 cm^{-1} correspondientes a

la presencia de estiramientos de tipo OH, metil-metilenos, grupo carbonilo y grupo éster, respectivamente, presentes en el polímero (Hao *et al.*, 2013).

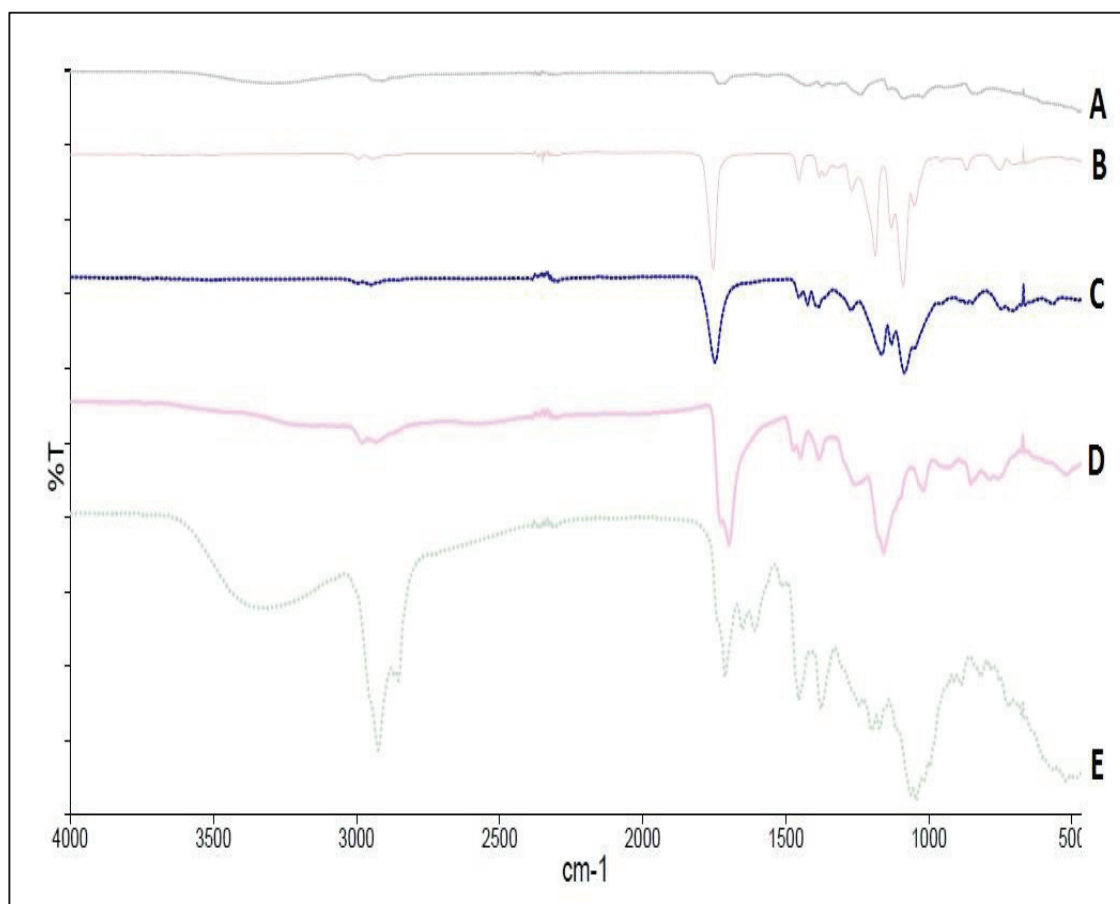


Figura IV.7. Análisis por Espectroscopía FT-IR de los materiales utilizados en las nanoformulaciones. A) PVA, B) PLA, C) PLGA, D) EL10055, E) Extracto HMM.

Particularmente, como era de esperarse el extracto HMM presentó un espectro IR muy complejo, debido a la mezcla de compuestos de distinta naturaleza química que se encuentran presentes en un producto natural como éste (Figura IV.7-E).

En el caso de las nanoformulaciones (Figura IV.8), fue posible observar bandas características para los grupos funcionales particulares tanto del polímero formador de la NP como el tensoactivo, según era el caso (formulaciones blanco y cargadas). De manera general, las NP cargadas no muestran una banda característica que indique la presencia del extracto en las nanoformulaciones. Lo anterior puede deberse a que la incorporación del extracto HMM en las NP puede llevarse a cabo de manera selectiva, es decir, que sólo algunos de los compuestos presentes en el extracto pueden estar en

las NP, lo que puede provocar un enmascaramiento de bandas características (señales) por parte del polímero hacia dichos compuestos, debido a la gran diferencia de relación en masa entre el polímero y el (los) compuesto(s) nanoencapsulado(s) en las formulaciones. Por otra parte, analizando el patrón general de los espectros IR obtenidos para las nanoformulaciones se puede establecer que no existe la formación de nuevos enlaces o interacciones químicas entre los componentes de las NP (polímero y tensoactivo) y el extracto HMM.

Actividad antituberculosa del extracto HMM libre y nanoencapsulado: Con el objetivo de evaluar la actividad antituberculosa tanto del extracto HMM libre, como el incorporado en cada una de las formulaciones, se utilizó la técnica de AMBA en microplaca. Desde el inicio de éste estudio, se establecieron los 125 µg/ml como el límite máximo de CMI para considerar potencialmente activo al extracto natural. La Tabla IV.5 muestra las CMI establecidas para el extracto HMM y las formulaciones de PLA-HMM, PLGA-HMM y EL10055-HMM. Por su parte, el extracto natural HMM obtenido a partir de *S. molle* presentó una CMI de 100 µg/ml, la cual se encuentra dentro del límite que se había establecido previamente, por lo que el extracto fue considerado como potencialmente activo contra *M. tuberculosis*. Dentro de los usos etnobotánicos que se han registrado para *S. molle* se encuentra el empleo de infusiones para el tratamiento de enfermedades respiratorias, tales como bronquitis, tos, resfriado y tuberculosis (Cabieses, 2013). Considerando lo anterior, en el 2007, Molina-Salinas y col. realizaron un estudio de diversas plantas del noreste de México, dónde se estableció para extractos héxánicos del fruto de *S. molle* una CMI de 125 y 62.5 µg/ml contra *M. tuberculosis* cepa ATCC 27294 (sensible) y *M. tuberculosis* cepa multidrogorresistente (aislado clínico), respectivamente (Molina-Salinas *et al.*, 2007).

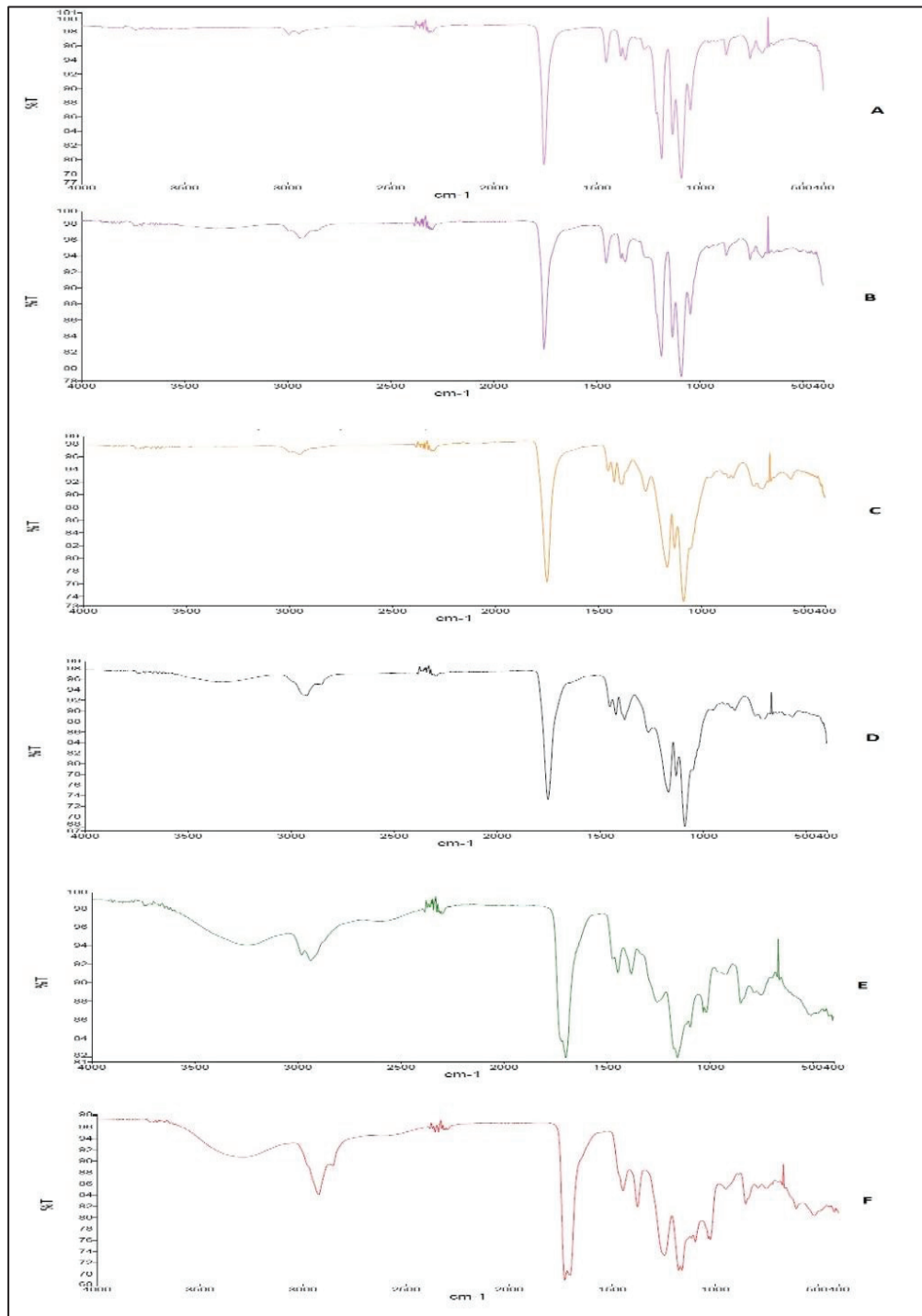


Figura IV.8. Análisis por Espectroscopía FT-IR de las nanoformulaciones. A) NP PLA blanco, B) NP PLA-HMM, C) NP PLGA blanco, D) NP PLGA-HMM, E) NP EL10055 blanco, F) NP EL10055-HMM.

Estos resultados concuerdan con la CMI obtenida para el extracto HMM (100 µg/ml). Particularmente, los extractos de plantas obtenidos con un solvente de alta polaridad como el metanol tienden a permitir la extracción y concentración de compuestos químicos con polaridad similar, es decir, solubles en agua o solventes polares, tales

como los polifenoles (flavonoides, flavonas, quinonas, antiocianinas, entre otros) (Kähkönen *et al.*, 1999). Como se mencionó, durante la preidentificación fitoquímica del extracto HMM se constató la presencia de compuestos polifenólicos (Tabla IV.2), los cuales se destacan por presentar actividad antimicrobiana, por lo que, la actividad antimicobacteriana (contra *M. tuberculosis H7Rv*) que presentó el extracto HMM durante los ensayos *in vitro* puede ser atribuída a la presencia de los polifenoles, sin embargo, para confirmar esta hipótesis es necesario el aislamiento e identificación de los compuestos presentes en este extracto. Así, los resultados obtenidos con el extracto HMM libre mostraron el potencial terapéutico que tienen los extractos naturales obtenidos a partir de *S. molle* como tratamiento de la tuberculosis.

Tabla IV.5. Actividad antituberculosa del extracto HMM y las nanoformulaciones por técnica de AMBA en microplaca contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Formulación	Muestra	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
Extracto HMM	Libre	100
PLA	NP blanco	Negativo
	NP-HMM	23.19 ± 5.24
PLGA	NP blanco	Negativo
	NP-HMM	30.67 ± 6.65
EL 100-55	NP blanco	Negativo
	NP-HMM	44.50 ± 15.38

($n=5$, $\bar{x} \pm DS$)

Posteriormente, una vez que se estableció la CMI del extracto HMM libre se probaron las tres formulaciones elaboradas con los polímeros biodegradables (PLA-HMM y PLGA-HMM) y el metacrilato (EL10055-HMM). Como puede observarse en la Tabla IV.5, se realizó una prueba con NP blanco (sin extracto HMM) de cada uno de los polímeros para confirmar la inactividad de los componentes del sistema de liberación y así, poder correlacionar la actividad antituberculosa de las formulaciones, exclusivamente, con la actividad del extracto HMM incorporado. Las pruebas mostraron que ninguna de las tres formulaciones tenía actividad antituberculosa. Por su parte, las tres nanoformulaciones con extracto HMM mostraron mejorar la actividad

antituberculosa en comparación con el extracto HMM libre. Particularmente, la CMI obtenida para las formulaciones de PLA, PLGA y EL10055 fue de 23.19 ± 5.24 , 30.67 ± 6.65 y 44.50 ± 15.38 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, siendo la formulación con PLA la que presentó mejor actividad, disminuyendo casi 5 veces la CMI registrada para el extracto HMM libre ($100 \mu\text{g/ml}$). De manera general, este incremento en la actividad antituberculosa del extracto HMM nanoencapsulado puede atribuirse a las principales características fisicoquímicas que poseen las NP, mismas que le confieren ventajas sobre otros sistemas de liberación particulados (p.e. liposomas o micropartículas) (Armendáriz-Barragán, Álvarez-Román, & Galindo-Rodríguez, 2016). Por un lado, el tamaño de partícula preestablecido (200 nm) para las formulaciones pudo favorecer la internalización de las NP por parte de la bacteria y así, permitir una mayor acumulación intracelular del extracto HMM, mismo fenómeno que posiblemente estuvo limitado cuando se probó el extracto HMM libre. Además, las diferentes composiciones poliméricas de las nanopartículas elaboradas favorecieron la biointeracción entre el extracto HMM y la micobacteria. Finalmente, el período de incubación de la prueba (5 días) pudo dar lugar a una liberación paulatina del extracto, favoreciendo el contacto prolongado entre el activo y *M. tuberculosis*.

Particularmente, las formulaciones elaboradas a partir de los polímeros biodegradables (PLA-HMM y PLGA-HMM) destacaron por aumentar en mayor medida la actividad antituberculosa del extracto con CMI de 23.19 ± 5.24 , 30.67 ± 6.65 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Se sabe que *M. tuberculosis* es una bacteria que necesita un pH ácido para desarrollarse, por lo que el medio Middlebrook utilizado tiene un valor de pH de 6.6 en la preparación final (BD Becton, Dickinson and Company, 2012). Por su parte, es conocido que los polímeros PLA y PLGA tienen como pH óptimo para su degradación un valor ligeramente ácido (Van Nostrum, Veldhuis, Bos, & Hennink, 2004). En conjunto, las condiciones específicas que requiere la micobacteria para su crecimiento pudieron favorecer la degradación/liberación del HMM a partir de las NP y así, aumentar la cantidad de extracto que se encontraba en contacto con la micobacteria, además de prolongar el tiempo de exposición entre los mismos (extracto y bacteria), favoreciendo la actividad antituberculosa del activo incorporado. Potencialmente, se esperaría que un proceso similar también se dé a lugar dentro de los macrófagos alveolares, células que tienen la capacidad de fagocitar NP y en las que la *M. tuberculosis* reside una vez que comienza la etapa de formación de granulomas

cómo parte de la patología de la tuberculosis pulmonar avanzada (García-Sancho, 2001), favoreciendo la acumulación de partículas y por ende la actividad antituberculosa del extracto HMM *in vivo*, sin embargo, otro tipo de estudios más específicos son necesarios para confirmar esta hipótesis.

Por su parte, aunque fue mayor al libre, la formulación EL10055-HMM presentó una disminución en la actividad antituberculosa (CMI=44.50±15.38 µg/ml) en comparación con las formulaciones de polímeros biodegradables, PLA-HMM y PLGA-HMM. Éste hecho puede deberse a que las condiciones para el crecimiento de la bacteria inducen un efecto sobre la interacción del nanosistema cargado de HMM y el microorganismo. El metacrilato EL10055 es un polímero que comienza a liberar activos a partir de un pH de 5.5 (relajación de cadenas poliméricas) (Meenakshi Joshi, 2013), por lo que, al tener un pH ácido en el medio de cultivo durante la incubación de la prueba biológica, la relajación de las cadenas que componían el sistema nanoparticulado fue limitada, por lo que se requirió una mayor cantidad de extracto HMM para lograr la inhibición en el crecimiento de la micobacteria, lo cual se vio reflejado en el aumento de la CMI para esta formulación. Potencialmente, la formulación EL10055-HMM fue diseñada para una aplicación vía oral, la cual, en primera estancia, debe resistir el pH ácido del estómago para que las NP lleguen intactas al duodeno (pH básico) y ahí comience la liberación del extracto, el cual se absorbería a través del epitelio intestinal al torrente sanguíneo, donde llegaría a establecer contacto con la micobacteria libre o presente en otros órganos como pulmones, hígado, bazo, etc.

En conjunto, los resultados obtenidos durante los ensayos biológicos con *M. tuberculosis* muestran el gran potencial que tienen las tres nanoformulaciones desarrolladas para ser utilizadas como coadyuvantes en el tratamiento de la tuberculosis. El hecho de tener tres formulaciones basadas en un sistema de liberación controlada, como las NP, con extracto natural incorporado, libre de solventes tóxicos y en cantidad suficiente (porcentaje de encapsulación) para aumentar la capacidad antimicobacteriana del activo libre, representa un avance importante en el desarrollo y potencial aplicación de formulaciones basadas en productos naturales, lo cual permite establecer las bases para una aplicación de estos vectores con extractos vegetales contra la TB y otros patógenos.

Pruebas de liberación *in vitro* del HMM incorporado en las nanopartículas poliméricas. Una parte importante del desarrollo de formulaciones farmacéuticas es el estudio del comportamiento y la manera de liberación del activo a partir de su sistema de dosificación (Soppimath, Aminabhavi, Kulkarni, & Rudzinski, 2001). Particularmente, estudiar los perfiles de liberación *in vitro* permiten establecer y extrapolar los diversos mecanismos fisicoquímicos que, en una aplicación *in vivo*, influyen en el comportamiento del extracto que se administre a través de las NP. Así, se realizaron pruebas *in vitro* con el fin de establecer el perfil de liberación del extracto HMM en las nanoformulaciones. La Figura IV.9 muestra el porcentaje de HMM liberado en función del tiempo.

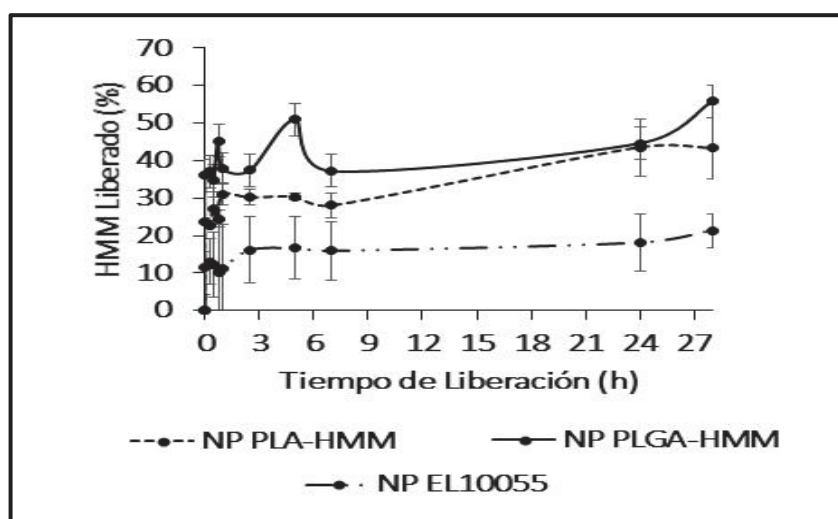


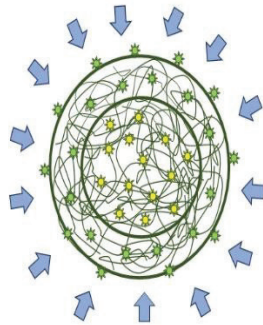
Figura IV.9. Perfil de liberación para las nanoformulaciones cargadas (Durante 28 h.) ($n=2; \bar{n} \pm DS$).

En el perfil podemos observar una primera etapa de liberación rápida con un marcado efecto burst. Éste tipo de liberación puede atribuirse a la liberación inmediata de los compuestos del extracto que se encuentran adsorbidos en el sistema particulado, o bien, aquellos que se encuentran en las capas más superficiales de la NP (Hasan *et al.*, 2007; Huang & Brazel, 2001). En el caso de los polímeros biodegradables la primera etapa de liberación estuvo determinada por procesos de difusión simple de las moléculas de activo a través de la red polimérica. La segunda etapa de liberación que podemos observar en el perfil (a partir de las 2.5-3 h) muestra un proceso más lento y paulatino, es decir una liberación más controlada. El proceso de liberación posiblemente está determinado por procesos fisicoquímicos más complejos que se dan

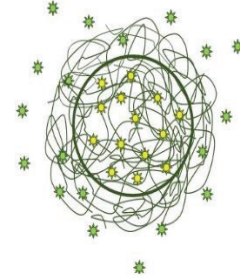
en la matriz polimérica, como lo es la degradación y erosión propias del polímero. Mientras la degradación del polímero se lleva a cabo, la liberación de las moléculas de HMM se llevó a cabo de manera paulatina, debido a que estos procesos físicoquímicos no son inmediatos, sino que se dan en períodos prolongados de tiempo (Fig. IV.10) (Fredenberg, Wahlgren, Reslow, & Axelsson, 2011).

Determinación de la citotoxicidad in vitro del extracto HMM libre y nanoencapsulado: Con la intención de estudiar la interacción y posible toxicidad de las nanoformulaciones con células humanas, se realizó un ensayo de citotoxicidad por medio de la determinación de hemólisis inducida en eritrocitos humanos. La Figura IV.11 muestra los resultados del ensayo en el que el extracto libre se probó en un rango de concentración de 50 a 500 ppm, mostrando una citotoxicidad del 100 % a partir de las 200 ppm. Por su parte, de manera general, las tres nanoformulaciones de HMM mostraron disminuir significativamente la citotoxicidad, registrando el 100 % de este índice a partir de las 400 ppm. Particularmente, la formulación de PLGA mostró un mayor índice citotóxico inicial (56.03 % a las 200 ppm) en comparación con las formulaciones de PLA y EL 100-55 (54.08 y 52.76 % a la misma concentración, respectivamente). Además, cuando se probaron formulaciones blanco (sin extracto incorporado), estas presentaron nula citotoxicidad. La disminución en la citotoxicidad por parte de las nanoformulaciones en comparación con el extracto libre, puede atribuirse a la liberación gradual de los componentes del extracto desde la NP. La incorporación de extracto en las NP preparadas con materiales biocompatibles y que controlan su liberación, permite, de primera instancia, que el activo interactúe con la célula de manera menos directa que en el caso del extracto libre, dónde el contacto entre activo-célula es inmediato. Estos resultados sugieren que las nanoformulaciones incrementan la biocompatibilidad del extracto HMM con células humanas, lo que favorecería aún más su potencial administración como tratamiento en el humano.

**PRIMERA ETAPA DE LIBERACIÓN
EFECTO "BURST"**

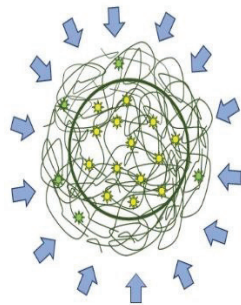


Contacto inicial entre NP-medio liberación
FORMACIÓN DE POROS

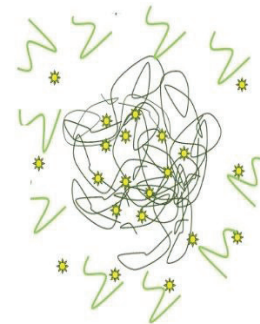


Liberación de moléculas de HMM adsorbidas o
en capas superficiales de NP
DIFUSIÓN

**SEGUNDA ETAPA DE LIBERACIÓN
LIBERACIÓN LENTA Y SOSTENIDA**



Agua y pH cataliza **HIDRÓLISIS** de
polímero



DEGRADACIÓN de **POLÍMERO**
Liberación sostenida de moléculas
de HMM en capas internas
de NP

Figura IV.10. Esquema representativo de la liberación de extracto HMM a partir de las nanoformulaciones elaboradas.

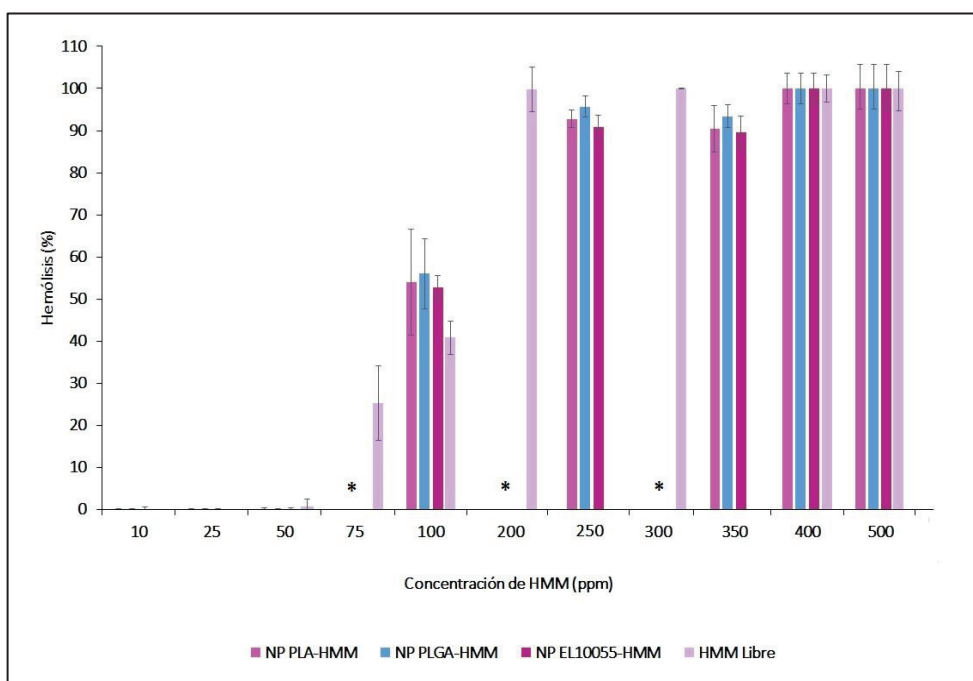


Figura IV.11. Porcentaje de citotoxicidad del extracto HMM libre y nanoencapsulado por hemólisis inducida con eritrocitos humanos ($n=3$, $\bar{x} \pm DS$).

Determinación de citotoxicidad del extracto HMM y las nanopartículas poliméricas cargadas por bioensayo con *Artemia salina*. Con el objetivo de ampliar el perfil toxicológico del extracto libre y las nanoformulaciones elaboradas, se realizó otro bioensayo de toxicidad con un organismo, la *Artemia salina*. A partir de un análisis estadístico Probit se determinó la Concentración Letal Media (CL_{50}) tanto para el extracto libre como para las tres nanoformulaciones. Los resultados se muestran en la Tabla IV.6. Para el extracto HMM se determinó una CL_{50} de 35 ppm, mientras que para las nanoformulaciones los valores fueron de 178.30, 111.20 y 75.58 ppm para las NP de PLA, PLGA y EL 100-55, respectivamente.

Al igual que otros estudios toxicológicos, éstos resultados muestran que la nanoencapsulación de un extracto natural (como el HMM) disminuye potencialmente la toxicidad que éste presenta frente a un organismo de manera libre (de 2 hasta 5 veces) (Dhamodharan & Mirunalini, 2013; Yen, Wu, Lin, Cham & Lin, 2008). Los resultados coinciden con la tendencia que se presentó en el bioensayo de citotoxicidad con eritrocitos humanos.

Tabla IV.6. Determinación de CL₅₀ por bioensayo con *Artemia salina* para el extracto HMM libre y las nanoformulaciones.

Formulación	Muestra	CL ₅₀ (ppm)
Extracto HMM	Libre	35
NP	PLA-HMM	178.30
	PLGA-HMM	11.20
	EL10055-HMM	75.58

(n=3, \bar{x})

Es evidente que la nanoencapsulación del extracto HMM con polímeros de diversa naturaleza (biodegradables y metacrilatos) disminuye considerablemente la toxicidad del extracto, lo cual, puede ser atribuido, nuevamente, a la biocompatibilidad que los sistemas particulados presentan, permitiendo una interacción e incorporación menos agresiva con un organismo, al no permitir un contacto rápido entre el extracto y la *A. salina*, sino más bien de manera paulatina y gradual, lo cual también puede ser correlacionado con el perfil controlado de liberación del activo a partir de las NP. Con esto, las nanoformulaciones desarrolladas en este trabajo no sólo presentan características fisicoquímicas adecuadas, actividad antituberculosa eficiente, sino también son potencialmente seguras para su posterior aplicación en sistemas de estudio *in vivo* más avanzados o en el humano mismo.

IV.5 Conclusiones

La TB es una infección que actualmente presenta alta incidencia y muertes a nivel mundial. Dentro de las estrategias que ayuden a su control destacan el empleo de nuevos sistemas de liberación de activos y obtención de productos naturales a partir de plantas que se empleen en los esquemas terapéuticos del tratamiento. Se desarrollaron tres formulaciones a base de NP y extracto metanólico de *S. molle* incorporado. Las formulaciones elaboradas con polímeros biodegradables, PLA y PLGA, mostraron un tamaño alrededor de los 200 nm y características fisicoquímicas adecuadas para su evaluación *in vitro* contra *M. tuberculosis*. Con eficiencias de

encapsulación de 33-35% y debido a las propiedades fisicoquímicas que presentan las NP como sistemas de liberación controlada, estas formulaciones mostraron aumentar de 2 a 4 veces más la actividad antituberculosa que presentó el extracto HMM de manera libre. Además, las formulaciones demostraron disminuir la toxicidad frente del extracto HMM frente a eritrocitos humanos y el organismo *A. salina*, registrando menor índice de citotoxicidad y CL_{50} inferior a la registrada con el extracto HMM libre.

Por su parte, la nanoformulación con EL 100-55 fue desarrollada con el objetivo de aplicar el extracto por vía oral. Las NP mostraron características ideales para su evaluación *in vitro* contra *M. tuberculosis*. Un tamaño alrededor de los 200 nm, una eficiencia de encapsulación cerca del 45% y un perfil de liberación sostenido del activo, permitió aumentar la actividad antituberculosa y disminuir la toxicidad en células humanas (eritrocitos) y el organismo *A. salina* del extracto HMM incorporado en la formulación.

En conjunto, los resultados muestran que las tres formulaciones desarrolladas con polímeros de diversa naturaleza química (biodegradables y metacrilato) tienen un gran potencial para ser utilizadas dentro de un esquema terapéutico como coadyuvantes en el tratamiento de la TB.

REFERENCIAS

- Augusti-Boligon A, Linde-Athayde M. 2014. Importance of HPLC in analysis of plants extracts. *Austin Chromatography*, 1(3), 2.
- Anbinder PS, Deladino L, Navarro AS, Amalvy JI, Martino MN. 2011. Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: Interactions between active compound encapsulation polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 01(04), 80–87.
- Armendáriz-Barragán B, Álvarez-Román R, Galindo-Rodríguez SA. 2016. Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro- y nanoparticulados. In *Investigación en Plantas de Importancia Médica* (Primera, Vol. 0, pp. 411–436). Omnia Science.
- Armendáriz-Barragán B, Zafar N, Badri W, Galindo-Rodríguez SA, Kabbaj D, Fessi H, Elaissari A. 2016. Plant extracts: from encapsulation to application. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(8), 1165–1175.
- Azwanida NN. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 4(3):196.
- BD Becton Dickinson and Company. (2012, September). BD Middlebrook 7H10 Agar. Consultado en <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8796>
- Bonifácio BV, da Silva PB, Ramos MADS, Negri KMS, Bauab TM, Chorilli M. 2014. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1–15.
- De Mendonça Rocha PM, Rodilla JM, Díez D, Elder H, Guala MS, Silva LA, Pombo EB. 2012. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (*Schinus molle* L.). *Molecules*, 17(10), 12023–12036.
- De Moraes Porto ICC. (2012). Chapter 3: Polymer Biocompatibility. In *"Polymers"*. Ailton de Souza Gomes (Ed.), Septiembre 2012. INTECH.
- Dhamodharan G, Mirunalini S. 2013. A detail study of phytochemical screening, antioxidant potential and acute toxicity of *Agaricus bisporus* extract and its chitosan loaded nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research*, 6(8), 818–822.
- Cabieses F. 2013. Apuntes sobre Medicina Tradicional de Fernando Cabieses. México (1920), Perú (Primera edición 1993): Diselpesa. Consultado en <https://peregrinadanza.wordpress.com/2013/05/24/para-descargar-apuntes-sobre-medicina-tradicional-de-fernando-cabieses-1993/>

- Clemens DL, Lee BY, Courtney T, Huang M, Ferris D, Nel AE, Zink JI, Horwitz MA. 2012. Targeted intracellular delivery of antituberculosis drugs to *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages via functionalized mesoporous silica nanoparticles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2535-2545.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1–R4.
- Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1–2), 34–52.
- Galindo-Rodriguez SA, Allémann E, Fessi H, Doelker E. 2004. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428–1439.
- García-Sancho Figueroa MCE. 2001. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 14(2), 114–128.
- Hao S, Wang Y, Wang B, Deng J, Liu X, Liu J. 2013. Rapid preparation of pH-sensitive polymeric nanoparticle with high loading capacity using electrospray for oral drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 33(8), 4562–4567.
- Hasan AS, Socha M, Lamprecht A, Ghazouani FE, Sapin A, Hoffman M, Ubrich N. 2007. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *International Journal of Pharmaceutics*, 344(1–2), 53–61.
- Huang X, Brazel CS. 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2–3), 121–136.
- Ibrahim B, Al-Naser Z. 2014. Analysis of fruits *Schinus molle* extractions and the efficacy. *International Journal of ChemTech Research*, 6(5), 2799–2806.
- Jia D, Barwal I, Thakur S, Yadav SC. 2015. Methodology to nanoencapsulate hepatoprotective components from *Picrorhiza kurroa* as food supplement. *Food Bioscience*, 9, 28–35.

- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954–3962.
- Krimm S, Liang CY, Sutherland GBBM. 1956. Infrared spectra of high polymers. V. Polyvinyl alcohol. *Journal of Polymer Science*, 22(101), 227–247.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020–6047.
- Lim YH, Tiemann KM, Hunstad DA, Elsabahy M, Wooley KL. 2016. Polymeric nanoparticles in development for treatment of pulmonary infectious diseases. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(6), 842-871.
- López A, Castro S, Andina MJ, Ures X, Munguía B, Llabot JM, Domínguez L. 2014. Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 53, 209–216.
- Luque-Alcaraz AG, Cortez-Rocha MO, Velázquez-Contreras CA, Acosta-Silva AL, Santacruz-Ortega H del C, Burgos-Hernández A, Plascencia-Jatomea M. 2016. Enhanced antifungal effect of chitosan/pepper tree (*Schinus molle*) essential oil bionanocomposites on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores. *Journal of Nanomaterials*, 2016, e6060137.
- Mailänder V, Landfester K. 2009. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*, 10(9), 2379-2400.
- Makadia HK, Siegel SJ. 2011. Poly lactic-*co*-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397.
- Mandal TK, Bostanian LA, Graves RA, Chapman SR, Womack I. 2002. Development of biodegradable microcapsules as carrier for oral controlled delivery of amifostine. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(3), 339–344.
- Martins N, Barros L, Ferreira ICFR. 2016. *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 1–12.
- Meenakshi J. 2013. Role of eudragit in targeted drug delivery. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 5(2), 58–62.
- Mishra B, Patel BB, Tiwari S. 2010. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(1), 9–24.

- Molina-Salinas GM, Pérez-López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Said-Fernández S, de Torres NW. 2007. Evaluation of the flora of Northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), 435–441.
- Nasiruddin M, Neyaz MK, Das S. 2017. Nanotechnology-Based approach in tuberculosis treatment. *Tuberculosis Research and Treatment*, 2017, e4920209.
- Newton SM, Lau C, Wright CW. 2000. A review of antimycobacterial natural products. *Phytotherapy Research: PTR*, 14(5), 303–322.
- Odeh F, Al-Jaber H, Khater D. 2014. Nanoflora — How nanotechnology enhanced the use of active phytochemicals. In *Application of Nanotechnology in Drug Delivery* (pp. 343–368). INTECH. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/application-of-nanotechnology-in-drug-delivery/nanoflora-how-nanotechnology-enhanced-the-use-of-active-phytochemicals>
- Okunade AL, Elvin-Lewis MPF, Lewis WH. 2004. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*, 65(2004):1017-1032.
- Orozco VH, Brostow W, Chonkaew W, López BL. 2009. Preparation and characterization of poly(lactic acid)-g-maleic anhydride + starch blends. *Macromolecular Symposium*, 277, 69–80.
- Pereira MC, Hill LE, Zambiasi RC, Mertens-Talcott S, Talcott S, Gomes CL. 2015. Nanoencapsulation of hydrophobic phytochemicals using poly (dl-lactide-co-glycolide) (PLGA) for antioxidant and antimicrobial delivery applications: Guabiroba fruit (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) study. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 100–107.
- Renuka RSP. 2013. Design of polymeric nanoparticles of *Embllica officinalis* extracts and study of in vitro therapeutic effects. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 7(3).
- Schubert S, Delaney JT, Schubert US. 2011. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter*, 7(5), 1581–1588.
- Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. 2014. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, 12, 5.

- Song KC, Lee HS, Choung IY, Cho KI, Ahn Y, Choi EJ. 2006. The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-*co*-glycolide) nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 276(1–3), 162–167.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70(1-2), 1-20.
- Stevanović M, Radulović A, Jordović B, Uskoković D. 2008. Poly(DL-lactide-*co*-glycolide) Nanospheres for the sustained release of folic acid. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 4(3), 349–358.
- Swarnali Islam. 2011. Lipophilic and hydrophilic drug loaded PLA/PLGA *in situ* implants: Studies on thermal behavior of drug & polymer and observation of parameters influencing drug burst release with corresponding effects on loading efficiency & morphology of implants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 181–188.
- Tapan Parikh, Gupta SS, Meena A, Serajuddin ATM. 2014. Investigation of thermal and viscoelastic properties of polymers relevant to hot melt extrusion, III: polymethacrylates and polymethacrylic acid based polymers. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 5(1), 56–64.
- Tokiwa Y, Calabia BP. 2006. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 244–251.
- Van Nostrum CF, Veldhuis TFJ, Bos GW, Hennink WE. 2004. Hydrolytic degradation of oligo(lactic acid): a kinetic and mechanistic study. *Polymer*, 45(20), 6779–6787.
- Von Linné C. 1753. *Species plantarum: exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas / Caroli Linnæe.* (Vol. t.1 (1753)). Berlin : Junk,. Disponible en: <http://www.biodiversitylibrary.org/item/84235>
- World Health Organization. 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendatios for prevention and control. *Weekly Epidemiological Record*. 81(45):430-432.

- World Health Organization. 2016. Global Tuberculosis Report 2016. World Health Organization. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>
- World Health Organization. 2017. What is multidrug-resistant tuberculosis and how do we control it?. World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/79/en/>
- Yen FL, Wu TH, Lin LT, Cham TM, Lin CC. 2008. Nanoparticles formulation of *Cuscuta chinensis* prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), 1771–1777.
- Zorzi GK, Carvalho ELS, Von Poser GL, Teixeira HF. 2015. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(4), 426–436.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements pour accroître l'efficacité de la lutte contre la tuberculose, quatre nanoformulations ont été développées dans ce travail. Les préparations ont été caractérisées physicochimiquement et leur activité antimicrobienne a été évaluée *in vitro* sur *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.

Dans un premier temps, une nanomédecine a été obtenue à partir de NP chargées avec un principe actif de deuxième ligne, la clofazimine. En raison de sa taille autour de 200 nm, son efficacité d'encapsulation (environ 63%) et le profil de libération prolongée de la clofazimine *in vitro*, cette formulation a montré une diminution de la concentration minimale inhibitrice en comparaison avec le principe actif non encapsulé. De plus, la nanomédecine présentait une stabilité acceptable jusqu'à deux ans, dans des conditions de stockage standard. Ces résultats établissent la base pour que cette formulation soit potentiellement utilisée dans un schéma de traitement de la tuberculose.

Dans un second temps, deux nanoformulations de NP contenant l'extrait de *S. molle* ont été développées pour une potentielle application parentérale (i.e. intraveineuse ou pulmonaire), elles ont pour cela été préparées à base de polymères biodégradables (PLA et PLGA). En plus, une formulation de NP-extrait de *S. molle* a été développée pour une application par voie orale ; dans ce cas les NP ont été préparées avec du polymère commercial utilisé pour la formulation de formes pharmaceutiques orales (Eudragit L 100-55). Les nanoformulations présentaient des caractéristiques physicochimiques voisines, par exemple, une taille de 200 nm, une efficacité d'encapsulation entre 33 et 45% et un profil de libération prolongée *in vitro* de l'extrait

végétal encapsulé. Ensuite, les nanoformulations ont permis d'augmenter l'activité antimicrobienne *in vitro* de l'extrait de *S. molle*, d'un facteur compris entre 2 et 4 sur *M. tuberculosis H37Rv*. De plus, on a pu démontrer une diminution de la toxicité de l'extrait de *S. molle* lorsqu'il a été testé *in vivo* en utilisant comme modèle biologique le crustacés *Artemia salina* et *in vitro* en utilisant le modèle cellulaire des érythrocytes humains. Avec ces résultats, il a été possible confirmer le grand potentiel de ces formulations contenant des extraits de plantes (*i.e. S. molle*) pour être utilisées comme des adjuvants efficaces et viables dans le le traitement de la tuberculose.

ANEXO I

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

- **Artículo en Revista Científica**

Brenda Armendáriz-Barragán, Nadiah Zafar, Waisudin Badri, Sergio Arturo Galindo-Rodríguez, Dounia Kabbaj, Hatem Fessi & Abdelhamid Elaissari (2016) Plants extracts: from extraction to application, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13:8, 1165-1175, DOI: [10.1080/17425247.2016.1182487](https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182487)

- **Congresos Internacionales**

1. Evaluación y perfil de la capacidad antioxidante de cinco aceites esenciales. 12va. Reunión de Investigación en Productos Naturales. AMIPRONAT. Xalapa, Veracruz, México, 18-20 de Mayo 2016. (Cartel)
2. Determinación de la capacidad antioxidante de extractos metanólicos de hoja y fruto de *Schinus molle* para su potencial aplicación en humanos. 11va. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. AMIPRONAT. Sonora, México, 20-22 de Mayo 2015. (Cartel)
3. Obtención y caracterización fisicoquímica de extractos de *Schinus molle* para su potencial aplicación en el tratamiento de la tuberculosis. 10ma. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. AMIPRONAT. Yucatán, México, 21-24 de Mayo 2014. (Cartel)

- **Congresos Nacionales**

1. Desarrollo y validación de un método analítico por CLAR-UV para cuantificar clofazimina en nanopartículas poliméricas biodegradables. XXVIII Congreso Nacional. AMQA. Guerrero, México, 24-27 de Junio 2015. (Cartel).

ANEXO II



Plant extracts: from encapsulation to application

Brenda Armendáriz-Barragán, Nadiah Zafar, Waisudin Badri, Sergio Arturo Galindo-Rodríguez, Dounia Kabbaj, Hatem Fessi & Abdelhamid Elaissari

To cite this article: Brenda Armendáriz-Barragán, Nadiah Zafar, Waisudin Badri, Sergio Arturo Galindo-Rodríguez, Dounia Kabbaj, Hatem Fessi & Abdelhamid Elaissari (2016) Plant extracts: from encapsulation to application, Expert Opinion on Drug Delivery, 13:8, 1165-1175, DOI: 10.1080/17425247.2016.1182487

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2016.1182487>



Accepted author version posted online: 03 May 2016.
Published online: 17 May 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 32



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iedd20>

Download by: [Miss Brenda Armendáriz-Barragán]

Date: 16 August 2016, At: 08:08

REVIEW

Plant extracts: from encapsulation to application

Brenda Armendáriz-Barragán^{a,b}, Nadiah Zafar^b, Waisudin Badri^b, Sergio Arturo Galindo-Rodríguez^a, Dounia Kabbaj^c, Hatem Fessi^b and Abdelhamid Elaissari^b

^aDepartamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, México;

^bLaboratoire d'Automatique et des Génies des Procédés (ESCPE, CNRS UMR 5007), Université Claude Bernard Lyon I, Villeurbanne, France;

^cDepartment of Agronomy and Life Science, Universiapolis, International University of Agadir, Agadir, Morocco

ABSTRACT

Introduction: Plants are a natural source of various products with diverse biological activities offering treatment for several diseases. Plant extract is a complex mixture of compounds, which can have antioxidant, antibiotic, antiviral, anticancer, antiparasitic, antifungal, hypoglycemic, anti-hypertensive and insecticide properties. The extraction of these extracts requires the use of organic solvents, which not only complicates the formulations but also makes it difficult to directly use the extracts for humans. To overcome these problems, recent research has been focused on developing new ways to formulate the plant extracts and delivering them safely with enhanced therapeutic efficacy.

Areas covered: This review focuses on the research done in the development and use of polymeric nanoparticles for the encapsulation and administration of plant extracts. It describes in detail, the different encapsulation techniques, main physicochemical characteristics of the nanoparticles, toxicity tests and results obtained from *in vivo* or *in vitro* assays.

Expert opinion: Major obstacles associated with the use of plant extracts for clinical applications include their complex composition, toxicity risks and extract instability. It is observed that encapsulation can be successfully used to decrease plant extracts toxicity, to provide targeted drug delivery and to solve stability related problems.

ARTICLE HISTORY

Received 30 January 2016

Accepted 19 April 2016

Published online

17 May 2016

KEYWORDS

Polymeric nanoparticles;
plant extracts; biological
activity; drug delivery;
encapsulation techniques

1. Introduction

Since ancient times, it is known that plants are a natural source of various products with diverse biological activities. These products have been used for the treatment of different diseases.[1] Actually, about three quarters of the world's population rely on the use of particular plant extracts as a remedy for various afflictions.[2] Within the natural products, we can find essential oils, plant extracts, tea, salves, etc.

Natural extracts are complex mixtures of chemicals with biological properties derived mainly from the leaves, the stems, the fruits, or roots of medicinal plants. Among the biological activities presented by plant extracts, the most prominent ones include the antioxidant, antibiotic, anticancer, antifungal, antiparasitic, hypoglycemic, and antihypertensive properties.[3–9]

Even though, the plant extracts are suitable for treatment for various diseases, studies show that their therapeutic use is still limited because of their complex composition and toxicity when they are applied in organisms with more complex metabolic systems. Furthermore, for obtaining these extracts, generally organic solvents (e.g. methanol, ethanol, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, etc.) are used. Hence, the final vehicle in which the extracts are found prevents their direct application in organisms. In addition to this, the protection, conservation, and targeted delivery (into organism) of

plant extracts are another challenge to overcome their potential use as a treatment for diseases.[10]

At present, research is more focused on the composition of plant extracts, whereas, solutions that enable the efficient, safe, and direct application of these natural products need to be more focused on. One of the newest and most current ways for the application of the natural extracts, which also reduces the limitations outlined, is the use of polymeric nanoparticles (nanoparticles). Polymeric nanoparticle is a particle of polymer of any shape and an equivalent diameter from 1 to 100 nm and polymeric microparticle is a particle of polymer of any shape with an equivalent diameter from approximately 0.1–100 μm . Polymers can be of natural source, e.g. chitosan, albumin, gelatin, etc. or synthetic, e.g. methacrylates. Due to their size and unique physicochemical characteristics of nanoparticles, they generate formulations with several advantages, such as: (i) encapsulation of compounds of different chemical nature in the same formulation (mixture of compounds), (ii) targeting of specific organs (low toxicity), (iii) easy removal of organic solvent during the development of the nanoparticles (effective purification procedures), (iv) protection and conservation of the encapsulated active (enzymes damage, environment, etc.), and (v) controlled release of incorporated actives. [11–13]

In order to combine the diversity of biological activities of plant extracts and the advantages offered by the

Article highlights

- About three quarters of the world's population rely on the use of plants extracts as remedies for various afflictions.
- The use of plants extracts, as treatment is still limited due to their complex composition and toxicity when they are used directly in larger organisms.
- The polymeric nanoparticles are colloidal systems, which could act as carriers of natural extracts.
- The polymeric nanoparticles encapsulating plants extracts find applications in the fields of foods industries, medicine, cosmetics and health sector.
- Different formulations based on polymeric nanoparticles have demonstrated enhanced biological activity (e.g. anticancer, antibacterial, antidiabetic, antihypertensive, cosmetology, etc.) of plant extracts.
- A gradually increasing tendency for the usage of polymeric nanoparticles encapsulating plant extracts will be observed in future medicinal therapies.

This box summarizes key points contained in the article.

nanoparticles, recently, researchers are increasingly focused on designing formulations consisting of nanoparticles constituted from different polymers and containing encapsulated plant extracts. These formulations are developed for potential application in the field of medicine, food, and cosmetics.

The latest research on formulations containing natural extracts encapsulated in nanoparticles, generally reports about standardizing techniques for obtaining carriers, physicochemical characterization of the formulation (size, morphology, zeta potential, etc.), encapsulation of the active (percentages of encapsulation), the release profiles of the extract from the nanoparticles, biological evaluations both free extract and embedded extract (*in vitro* and *in vivo* models) and stability studies of the formulation. The aim of this review is to present the most recent data on polymeric nanoparticles encapsulating plant extracts, highlight their characterization, and report the results obtained from studies related to biological activities *in vitro* and *in vivo* models.

2. Elaboration of carriers using preformed polymers

The use of colloidal carriers has gained tremendous interest during the past decades, which paved the way for further advancements in biomedical and biotechnology field. These particulate carriers find applications in both *in vivo* and *in vitro* studies. Colloidal carriers have distinct advantages that make them a preferable choice over a simple solution of active molecules. These carriers protect active pharmaceutical ingredients from degradation or inactivation (by light or enzymatic attack), reduce toxicity of drugs.[14–17] Therapeutic efficacy of active is enhanced, since after the encapsulation the drug's biodistribution depends no longer on its own physicochemical properties but on carrier's ones.[18–21] Encapsulation of the actives in carriers also masks the unpleasant taste and odor associated with some drugs. When compared to drug solutions, carriers may give better membrane absorption and drug targeting to the tissues where pharmacotherapeutic action occurs. Reproducible and prolonged release of the active is thus provided.[22–28] The biomedical applications of the

carriers are constantly increasing.[29–31] The different polymers employed to construct these carriers may differ in physicochemical properties but mainly are biodegradable and biocompatible. Drug's encapsulation in biodegradable polymers makes them nontoxic, stable in blood, and noninflammatory. By using polymers, the physicochemical properties (e.g. hydrophobicity and zeta potential), drug release characteristics (e.g. delayed, prolonged, and triggered), and biological behavior (e.g. bioadhesion and improved cellular uptake) of the nanoparticles can be modified.[32–34] The uptake of the particles by the macrophages may also be prevented by modulating the particle's surface with coating of substances, such as polyethylene glycol (PEG). The selection of the polymer is generally made considering its final application as well as its toxicity.[35] Various techniques are available to formulate the colloidal carriers. These techniques differ by their principles or the nature of the active, which is to be encapsulated. Correct selection of the technique is very important to obtain a formulation bearing suitable properties for the *in vitro* and *in vivo* applications. Broadly speaking, there are two techniques namely: dispersion of preformed polymers and polymerization of monomers. Under preformed polymers techniques, such as solvent evaporation, nanoprecipitation, solvent diffusion, and dialysis are included. On the other hand, polymerization of monomers includes processes, such as miniemulsion, microemulsion, interfacial polymerization, and radical polymerization. After careful search through literature, it is observed that not all encapsulation techniques have been employed for the encapsulation of natural plant extracts. So here, we will briefly describe the basic principles involved in the preformed polymers-based techniques that are very frequently used for formation of particles encapsulating natural plant extracts.

2.1. Emulsion solvent evaporation

The technique emulsion solvent evaporation was introduced by Vanderhoff and colleagues.[36] This method consists of two major steps: formation of single or double emulsion and organic solvent evaporation. Evaporation results in polymer precipitation and subsequent particles' formation (Figure 1). [35] Microencapsulation by solvent evaporation is mostly used in pharmaceutical industries to get controlled release formulations. Different methods are available to use microencapsulation by solvent evaporation technique. The selection of a method that will give adequate drug encapsulation usually depends on the hydrophilic or hydrophobic character of the active molecules.[37] In single emulsification (e.g. o/w), polymer (selected according to desired properties) is dissolved in volatile, water immiscible solvent, such as dichloromethane, ethyl acetate, or chloroform. This organic phase is then emulsified in an aqueous phase already containing a dissolved surfactant. High speed homogenization or sonication is the key to good dispersion of the oil phase in aqueous phase.[35] However, this technique fails when it comes to encapsulation of highly hydrophilic agents. This is because the active agent may diffuse into the continuous phase during the formulation or it may not get dissolved in the organic solvent. Multiple emulsions are more suitable in such cases. In this case, primary

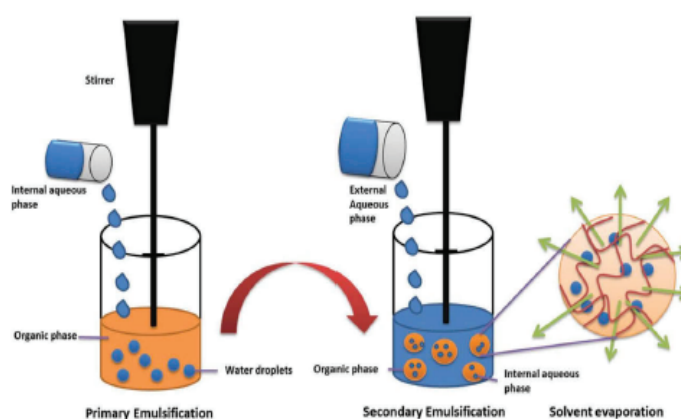


Figure 1. Emulsion solvent evaporation technique (w/o/w type).

emulsion formed via single emulsification (generally w/o) is again dispersed in second aqueous phase.[38] Most hydrophilic drugs have been encapsulated via (w/o/w) method.[39–41] In both single and double emulsification, the organic solvent is evaporated either by stirring at room temperature or under low pressure and high temperature conditions. The formed particles can be obtained by ultracentrifugation or filtration and finally can be washed or lyophilized.[28] Stabilizers play dual role in emulsions. They form films and provide barrier to drug release at internal interface and act as steric stabilizer on the external aqueous phase.[21,35,42]

2.2. Nanoprecipitation

Nanoprecipitation, also known as solvent displacement or interfacial deposition, is considered quite simple and reproducible method, which allows the production of polymer-based sub-micrometer particles (Figure 2). It is also thought to be one of the first developed techniques employed for the encapsulation of the active molecules. This method was introduced by Fessi

et al. [43] Since its development, this technique is mostly limited to encapsulation of mainly hydrophobic actives (because of the miscibility of the solvent with the aqueous phase) in either nanocapsules or nanospheres.[44–50] However, hydrophilic actives have also been encapsulated via nanoprecipitation.[51–55] Many different polymers have been used for this technique, especially biodegradable polyesters, such as polylactide (PLA), polylactide-co-glycolide (PLGA), and poly-ε-caprolactone (PCL).[56] Basically, this technique requires two miscible phases: an organic solvent in which polymer is dissolved and an aqueous phase (non-solvent of the polymer). Commonly used organic solvents are ethanol and acetone. Such solvents are miscible in water and can be removed by evaporation. The addition of one phase to the other under moderate magnetic stirring causes the interfacial deposition of the polymer after displacement of the organic solvent from the organic solution. This leads to the formation of nanoparticles. The formation of particles involves three basic steps: particle nucleation, molecular growth, and aggregation. The rate of every step is quite important for the particles size distribution.

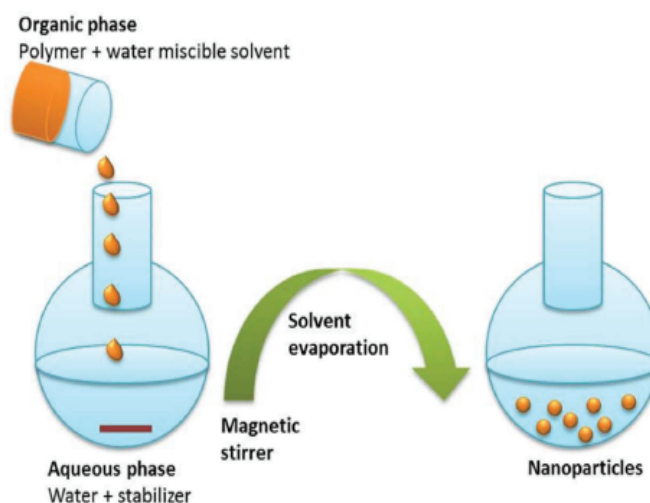


Figure 2. Nanoprecipitation technique.

Different formulation parameters that should be controlled include organic-non-organic phase ratio, polymer concentration, stabilizer concentration, and the amount of active molecules. Each of these parameters may influence the characteristics of the obtained nanoparticles (size, uniformity, and charge). This technique has many advantages over other encapsulation methods, such as simplicity, ease of scalability, good reproducibility, submicrometer particles with narrow size distribution, avoidance of usage of large amounts of toxic solvents, and no high energy input required.[57] Membrane contactor and microfluidic technologies have been successfully used to improve reproducibility and increase the convenience of application of nanoprecipitation in industries.[58]

2.3. Emulsion solvent diffusion

This method was introduced by Leroux et al. in 1995.[59] This technique basically requires the presence of three liquid phases: an aqueous phase (stabilizer dissolved in water), an organic phase (polymer in organic solvent and a hydrophobic active), and a dilution phase. The organic solvent must be partially soluble in water. The aqueous and organic phases are mutually saturated and emulsified using high-speed homogenization. Finally, addition of large volume of water allows the

diffusion of organic solvent from dispersed phase to external aqueous phase. This causes the precipitation of the polymer and, hence, the formation of particles (Figure 3).[35,60] The solvent is removed depending on its boiling point either by evaporation or filtration. Usually encapsulation efficiency is approximately 70%. This method is mainly used for the entrapment of hydrophobic actives. However, hydrophilic molecules may also be encapsulated by a modified solvent diffusion method using an aqueous inner phase.[61] The different operating conditions affecting the obtained particles include external/internal phase ratio, emulsification stirring rate, volume, and temperature of water for dilution, amount of polymer and the concentration of the stabilizer.[21,62]

2.4. Ionic gelation (IG)

IG is considered as a mild process since the use of toxic organic solvents and surfactants is avoided. It mainly involves the usage of hydrophilic natural polymers for preparation of particulate carriers. These polymers include chitosan, gelatin, agarose, and alginate. The basic principle of this method is the electrostatic interaction between the oppositely charged polymer and a polyelectrolyte (Figure 4). A solution of the charged polymer when added drop-wise under constant stirring to an

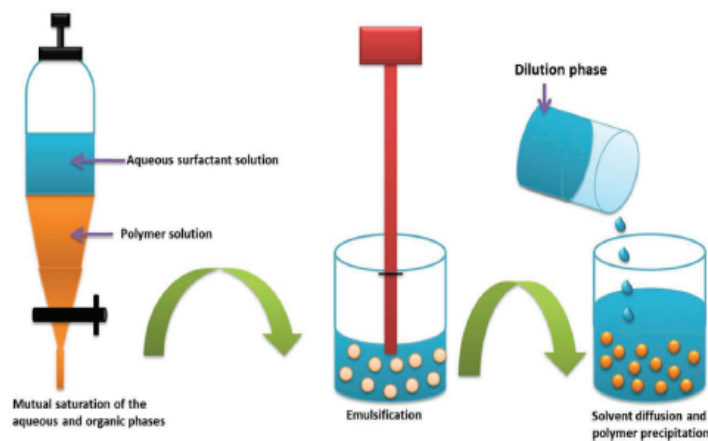


Figure 3. Emulsion solvent diffusion technique (adopted from Miladi et al. [28])

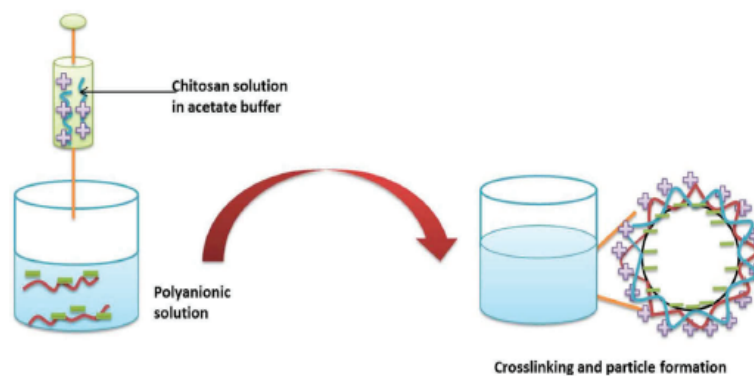


Figure 4. Ionic gelation technique (Adopted from Miladi et al. [28])

oppositely charged polyelectrolyte causes the cross-linking of the two entities and, hence, the particulate formation.[63,64] Gelatin-based particles are obtained after hardening of the droplets of emulsified gelatin solution. The gelatin emulsion droplets are cooled below the gelation point in an ice bath to obtain the particles. Alginate particles are obtained by drop-by-drop extrusion of the sodium alginate solution into the calcium chloride solution. Sodium alginate is a hydrophilic polymer, which gels in the presence of multivalent cations such as calcium. This technique was widely used to prepare chitosan particles. Electrostatic interaction occurs between positively charged chitosan (in an acidic medium) and negatively charged tripolyphosphate or arabic gum.[65–67]

3. Applications of encapsulated plants extract

3.1. Cosmetic applications

The use of plant extracts for skin application is limited because some of their active compounds exhibit high volatility, low solubility in aqueous systems and/or a short residence time on the skin. The use of controlled release systems, such as nanoparticles enables an increase in the amount of active incorporated in aqueous systems and increased bioactivity, protection and stability of the actives. Due to their size, the nanoparticles can penetrate intracellular or intercellular spaces and through the hair follicles, which makes them a suitable pharmaceutical carrier of the extracts for the skin application.

In recent years, several works support the feasibility of using nanoparticles for the release of plant extracts in the skin. Tachaprutinun et al.[68] developed formulations containing both free *Garcinia mangostana* Linn extract and encapsulated *Garcinia mangostana* Linn extract in ethylcellulose or methylcellulose. They evaluated the intracellular and follicular penetration of the nanoparticles by tape stripping technique and fluorescence microscopy, respectively. The nanoparticles loaded with extract showed an average size of 625 ± 20 nm, a zeta potential of 3.6 ± 0.2 mV. Both free extract and encapsulated extract were incorporated into creams or aqueous systems, and it was determined that both formulations in cream (free extract and encapsulated) penetrated deeper into the hair follicles as compared to those applied in aqueous systems. Furthermore, *G. mangostana* Linn extract incorporated into nanoparticles showed higher and more homogeneous distribution in the layers of the stratum corneum compared to the free extract. Hence, the results showed that the viability and dermal penetration of plant extract was increased when it was encapsulated in nanoparticles.[68]

The lavender extract is one of the most commonly used extracts in cosmetics. However, its application is limited by its physicochemical instability. Pereira et al. encapsulated methanolic extracts of *Lavandula stoechas* and *L. pedunculata* in nanoparticles of PLGA for increasing the chemical stability of the extract. Before the encapsulation process, it was determined that the methanolic extracts of both plants contained a high amount of flavonoids and, therefore, they possessed high antioxidant properties and low toxicity to human keratinocytes (up to $15 \mu\text{g/mL}$ during 24 h), which favored their dermal application. The physicochemical characterization of

the loaded nanoparticles showed a particle size of 300 nm for formulations prepared with both extracts. The obtained zeta potential was -15.74 ± 9.93 and -19.35 ± 8.42 mV for *L. stoechas* and *L. pedunculata*, respectively. The scanning electron microscopy showed nanoparticles with spherical form and smooth surface. The percentage of encapsulation was 95.8% for *L. stoechas* and 96.7% for *L. pedunculata*. The loaded nanoparticles were not tested for skin penetration; therefore, it was difficult to determine if the nanoparticles increased the deposition of the lavender extracts in skin. However, this work provides fundamentals for the elaboration of nano-objects containing lavender extracts for application in cosmetics or dermatological treatments.[69]

3.2. Food additives applications

In recent years, increasing interest in eating healthy and less processed foods, has led to the reduction of synthetic compounds and they are being replaced by natural sources such as plant extracts products. However, the replacement of these compounds is not easy due to the poor chemical stability shown by plant extracts during the processing steps in food industry. Thus, nanoparticles composed of different polymers have been developed for this purpose.

In 2011, Anbinder et al. developed a formulation from alginate, chitosan, and aqueous extract of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) in order to use it as a delivery system of antioxidants and add them to functional foods. The extract was incorporated in three different systems (composed of calcium alginate, chitosan, and a mixture of both polymers) and their physicochemical characteristics were compared by scanning electron microscopy, thermal analysis, and infrared spectroscopy. The system based on the mixture of both polymers showed an interaction between calcium alginate matrix and the external layer of chitosan. The chitosan nanoparticles showed enhanced release of polyphenols in the simulated intestinal fluid. This suggested a greater interaction between chitosan and the extract. The thermal analysis indicated that the systems do not decompose at high temperatures, making it feasible for the systems to be used in the production of fortified foods.[70] Subsequently, in 2013, the same research team, studied the release of polyphenols from loaded yerba mate nanoparticles (hydrated or dried) elaborated with mixture of calcium alginate/chitosan. The release of polyphenols from the hydrated nanoparticles was immediate in acidic pH due to the erosion of the system, while dried nanoparticles enabled release of the compounds after a period of swelling (hydration of the system). The results supported the implementation of these nanoparticles in instant soups, thereby increasing the amount of natural antioxidants available from foods.[71]

It is well known that plant extracts are a source of antimicrobial agents, which can be used as preservatives in different types of food. However, sometimes the addition of large amounts of extract to foods may cause odor and taste disturbances. Moreover, many of these extracts are hydrophobic, limiting their potential application. To resolve this problem, biodegradable nanoparticles have been developed. Hill et al. encapsulated root extract of cinnamon using biodegradable

PLGA in two different ratios (65:35 and 50:50) to promote the antimicrobial activity of the extract. The size of nanoparticles was 145–167 nm with a percentage encapsulation of 39% and 48% for PLGA 65:35 and PLGA 50:50, respectively. Release tests showed an initial burst effect due to the extract present in the surface of the nanoparticles, followed by a controlled release of the extract from the polymeric matrix. The two types of nanoparticles inhibited the growth of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* after 24 and 72 h in a concentration range of 224–529 mg/mL. In conclusion, the PLGA-based nanoparticles of cinnamon improved the release and antimicrobial activity of hydrophobic compounds in aqueous media, commonly found in foods.[72]

Pereira and collaborators used nanoparticles of PLGA (ratio 65:35 and 50:50) for encapsulation of an extract rich in carotenoids obtained from the fruit of guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) to improve the antioxidant and antimicrobial activity. The size of nanoparticles obtained was in a range of 145–162 nm. All nanoparticles showed a spherical shape and smooth surfaces. Encapsulation efficiency of the extract was 83.7% and 98.5% for nanoparticles of PLGA 50:50 and PLGA 65:35, respectively. Furthermore, release profile of the extract (based on the measurement of carotenoids release) from the nanoparticles showed an initial burst effect followed by a decrease in cumulative release over time for both formulations. The initial burst effect was more pronounced in nanoparticles of PLGA 50:50 (92% in an hour) compared with 37% obtained from the nanoparticles of PLGA 65:35. The antimicrobial activity was enhanced when the extract was encapsulated in PLGA 50:50 nanoparticles. Assays for determination of antioxidant activity showed the highest activity for the PLGA 50:50 based nanoparticles. Moreover, a lower concentration of encapsulated guabiroba extract was required to reduce reactive oxygen species (oxidation) in human colon adenocarcinoma HT-29. Overall, the results showed that PLGA nanoparticles could be used to incorporate extracts rich in carotenoids or other functional lipids as delivery systems with increased biological activity.[73]

In the food area, nanoparticles may also provide controlled release formulations of nutraceutical compounds. The root and rhizome of *Pichorhiza kurroa* has demonstrated significant hepatoprotective activity that improves liver function. However, principal molecules in the extract (picroside I and II) show poor gastrointestinal absorption and bioavailability (low aqueous solubility). Recently, Jia et al. developed biodegradable nanoparticles constituted using PLA and pluronic F-68. The observed size was about 175 and 155 nm and encapsulation efficiency 60% and 67% for picroside I and II, respectively. The value of zeta potential for both formulations was –27.87 and –31.5 for blank and loaded nanoparticles, respectively. This confirmed good stability of nanoparticles for long periods of storage. Meanwhile, in the release studies, an initial burst effect followed by a sustained release up to 210 h was observed. The formulation could be used as a nutraceutical with hepatoprotective effect. However, it is important to undertake studies to demonstrate the biological activity of the extract after the encapsulation process.[74]

3.3. Phytotherapy applications

Despite the great potential of plant extracts as source of treatments for various diseases, there are few investigations that support their use in formulations, because, in general, the extracts show lower *in vitro* biological activity when are compared with pure chemical compounds. It has been demonstrated that a strong synergy exists between the compounds present in the extracts, which, in many occasions is lost if these compounds are isolated. Moreover, the poor water solubility, physicochemical instability, and complexity of such extracts further limit their use. The application of nanoscale release systems for extracts provides an increase in solubility of the compounds, improved bioavailability, dose reduction, steady plasma levels and enhanced stability.

3.3.1. Antidiabetic activity

In this context, Samadder et al. developed formulation, which encapsulated the ethanolic extract of the seeds of *Syzygium jambolanum*. The aim was to improve treatment of hyperglycemic stress induced by arsenic poisoning. The average size of these nanoparticles was 122 nm, with spherical shape and smooth surface. Constant release of *Syzygium jambolanum* from its nano-encapsulated form was observed from 0 to 30 min in L6 cells. The studies showed that the application of extract encapsulated in nano-objects allowed increased consumption compared to the application of free extract. This may be because the loaded nanoparticles enable better functioning of the cellular glucose transporter GLUT4. In addition, the loaded nanoparticles showed a potential protection/recovery of cells damaged by arsenic. In *in vivo* (mice) models, it is determined that the free extract and encapsulated extract decreased the glucose and glycated hemoglobin levels induced by arsenic. Finally, by fluorescence techniques it was observed that the nanoparticles could effectively cross the blood brain barrier, whereby the formulation could provide targeted treatment in this important area. Thus, formulation showed a significant potential for use in the treatment of hyperglycemia induced by arsenic poisoning.[75]

3.3.2. Anti-inflammatory activity

Because of the wide range of biological activities offered by the extracts of the fruit of *Embllica officinalis*, Renuka et al. encapsulated ethanolic and aqueous extracts of this plant in polyvinylpyrrolidone (PVP)-based nanoparticles and evaluated their antioxidant and anti-inflammatory activity. The encapsulation efficiency of the nanoparticles with extracts was found to be between 58% and 70%. The particle size was determined to be in the range of 550–825 nm. The obtained zeta potential was in a range of –7.49 to –13 mV, indicating a high stability for the systems. The release profile of the nanoparticles was better in 50 mg of ethanolic or aqueous extract. The formulation prepared with 50 mg of ethanolic extract showed the highest antioxidant activity, which could be attributed to the greater amount of flavonoids present in this kind of extract. In the anti-inflammatory activity test, the formulations prepared with the aqueous extracts showed greater activity than those containing ethanolic extracts. Generally, the results showed

that the encapsulation of aqueous and ethanolic extracts of *E. officinalis* in nano-objects increased their antioxidant and anti-inflammatory activities.[76]

In 2014, with the aim of increasing anti-inflammatory activity of *Scutellaria baicalensis*, Choi et al. developed lectin nanoparticles loaded with aqueous or ethanolic extract of the plant. Nanoparticles loaded with ethanolic extract showed an average size of 94 nm and a percentage encapsulation of 62%. The antioxidant activity of nanoparticles was established by a 60% inhibition in the activity of DPPH radical. In addition, a concentration of 0.5 mg/mL of loaded nanoparticles inhibited the production of nitric oxide and produced only a concentration of 743.7 pg/mL PGE2 in macrophages RW264.7. Furthermore, this study was the first to show that the penetration of nanoparticles in human fibroblasts using scanning confocal microscopy.[77]

3.3.3. Anticholesterolemia activity

Considering the medicinal properties of *Clerodendrum infortunatum*, Suman et al. encapsulated root ether extract in nanoparticles of PLGA for treating hypercholesterolemia. The formulation showed particle size of about 608 nm with a zeta potential, drug efficiency and encapsulation efficiency of -30 mV, 32.8%, and 98.40%, respectively. Based on these characteristics, the nanoparticles-based preparation could be used for the treatment of hypercholesterolemia by passive targeting to the liver. However, there is no solid evidence about it.[78]

3.3.4. Antiulcerolitic activity

The crude extract (CE), the fraction obtained with ethyl acetate (EAF), and the residual aqueous fraction obtained from leaf *Passiflora serratodigitata* L. show a potential antiulcer activity due to the presence of a high content of flavonoids. To increase the aqueous solubility and provide increased stability of these substances, Strasser et al. developed poly(ϵ -caprolactone) (PCL)-based nanoparticles encapsulating *P. serratodigitata* extract, which could be used for gastroprotective properties. PCL-CE and PCL-EAF nanoparticles presented a size of 379 and 383 nm and a zeta potential of -20.2 and -27.3 mV, respectively. The encapsulation efficiency (based on the total amount of flavonoids) was 90.6% and 79.9% (w/v), respectively. *In vivo* studies showed that the nanoparticles loaded with CE provided four times more gastric protection than the free CE extract. The nanoparticles-EAF required 10 times less extract for achieving the same gastroprotective activity as that of EAF free extract. Probably, the nanoparticles-EAF was more potent due to the high purity of the extract. These results showed that both crude extracts of *P. serratodigitata* L., and their nanoencapsulated form had a high antiulcer activity and would be potential candidates for treatment of gastric ulcers.[79]

3.3.5. Anticancer activity

A large number of plants show a significant cytotoxic activity against various cancer cells. However, due to their toxicity they could be potentially fatal if administered for long periods. Nowadays, the use of nanoparticles for the delivery of plant extracts against cancer is one of the major focused fields. The studies related to nanoparticles for this purpose includes the

physicochemical characterization, *in vitro* or *in vivo* toxicology analysis, cell internalization studies and the influence on apoptosis and genetic damage.

In this field, Bhattacharyya et al. developed PLGA-based nanoparticles of ethanolic extract (tincture) of *Gelsemium sempervirens* and studied the effect of the formulation on their cellular internalization and *in vitro* bioactivity. Loaded nanoparticles had an average size of 122 nm. Their morphology showed spherical particles with smooth surface. The zeta potential was -14.8 mV, which suggested that the formulation was physically stable. The extract loaded nanoparticles showed to be more potent and active compared to non-encapsulated extract. In comparison with the free extract, the nanoparticles were better internalized. For the cellular effect of formulation, the results showed that loaded nanoparticles caused increased expression of p53 and caspase-3 (two key proteins markers in apoptosis) and downregulation of survivin, cyclin-D1, and PCNA; thus providing evidence about the working mechanism of these carriers. Test results of Annexin V-FITC and TUNEL FACS techniques confirmed that encapsulated extract induced greater degree of apoptosis with little necrotic potential as compared to free extract. *In vivo* model studies are needed to use these formulations in cancer treatment.[80]

The ethanolic extract of the root of *Polygala senega* cause death and apoptosis in lung cancer cell line A549 but show no toxicity in normal lung cells. Paul et al. encapsulated methanolic extract of this plant in PLGA-based nanoparticles in order to increase bioavailability and cellular internalization of the active in the A549 cell line for use in cancer therapy. Neither free extract nor the loaded nanoparticles showed cytotoxic effects on normal lung cells. However, after 24 h, a dose of 200 μ g/mL of free extract or encapsulated extract inhibited 68.65% and 77.46% of the growth of cancer cells A549, respectively. Fluorescence techniques showed that loaded nanoparticles were internalized faster than free extract (30 and 45 min, respectively). Both formulations saturated cancer cells after 240 min. Furthermore, both free extract and encapsulated extract induced apoptosis of A549 cells, which was associated with decreased expression of survivin, PCNA, and increased expression of caspase-3 and p53 in cell line A549. These results showed the great therapeutic potential of ethanolic extract loaded in PLGA nanoparticles.[81]

Another plant extract with potential anticancer activity in cell line A549 was obtained from root of *Phytolacca decandra*. Das et al. developed nanoparticles loaded with ethanolic extract of this plant and studied their therapeutic effectiveness *in vitro* and *in vivo* models. The nanoparticles showed a size around 110 nm, a zeta potential of -17.5 mV, and a smooth surface. The Fourier transform infrared spectroscopy, high performance liquid chromatography, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance analysis showed the incorporation of a tri-terpenoid (derivative of betulinic acid) in biodegradable nanoparticles. The encapsulation efficiency of the loaded nanoparticles was 82.15%, from which, only 56% had a constant release for 24 h. The loading of *P. decandra* in PLGA nanoparticles provided more effective release of the extract with higher antitumor efficacy. Extract loaded nanoparticles

also showed a significant modulation of apoptosis and increased bioactivity of the active probably due to their small size, high cellular/tissue internalization and improved bioavailability.[82]

Helicobacter pylori bacterium is one of the principal causes for the development of gastric cancer and over the past years it has shown resistance to antibiotics. The extract of *Garcinia mangostana* L. shows anticancer and anti-*H. pylori* activity. However, its therapeutic application in the stomach mucosa requires a delivery system that can withstand the acidic condition for a sufficient period of time. Pan-In et al. formulated nanoparticles loaded with *G. mangostana* using ethyl cellulose (EC) and methylcellulose (MC) as polymer to improve the residence time and increase resistance to damage by the acidic conditions of the stomach. EC:MC nanoparticles showed an encapsulation efficiency of 98.9% and loading capacity of 49.7%, with an average particle size of 500 nm and a zeta potential of 1 mV. Loaded nanoparticles presented a sustained release of the extract at pH 2 and pH 7.4. In addition, encapsulation of extract in the nanoparticles did not reduce their anti-*H. pylori* activity. *In vitro* antiadhesion activity of the extract of *G. mangostana* was enhanced with their nanoencapsulation, preventing the infection of *H. pylori*. Moreover, in oral administration *in vivo* studies, the encapsulated extract showed a greater ability to combat *H. pylori* in mice stomach. The results showed that the extract of *G. cambogia* encapsulated in nanoparticles had high potential as anti-*H. pylori*. [83] In 2014, the same research team developed a similar formulation and tested the internalization and cytotoxic activity of nanoparticles in the HeLa cell line. The nanoparticles loaded with *G. mangostana* of EC:MC with a size of 250 nm showed twice as much cytotoxic activity than the nanoparticles developed with only EC. Based on the *in vitro* tests, it was established that the loaded nanoparticles were internalized by endocytosis mechanism mediated by clathrin and mobilized internally through endolysosomal pathway.[84]

Due to chemical complexity posed by plant extracts, current studies on nano-object-based formulations not only focus on cytotoxic-bioactive behavior of nanoparticles both *in vitro*

and *in vivo* models, but also focus on establishing experimental designs that will produce more efficient formulations or functionalization of the nanoparticles to achieve an increased anticancer properties of the extracts. In this context, Ribeiro et al. elaborated biodegradable PLGA-based nanoparticles loaded with hydroalcoholic extract of *Uncaria tomentosa*, which present a significant antitumor activity. Besides, obtaining a formulation with potential therapeutic application in cancer, the most novel aspect of this work was the development of a fractional factorial design study based on behavior variables during the formulation to facilitate selection of optimal conditions and develop the best nano-objects with the plant extract of *U. tomentosa*. [85] Another new study was developed by Narayanan et al. They obtained PLGA-based nanoparticles loaded with grape seed extract with a size of approximately 100 nm and encapsulation efficiency of 60%. Through a process of chemical conjugation, folic acid was added to the surface of the nanoparticles, generating a specifically functionalized preparation for the folate receptors, which are overexpressed in cancer cells. Fluorescence and flow cytometry made evident a high and specific internalization of the functionalized nanoparticles. Moreover, it was possible to relate the functionalization of the nanoparticles with an increase death of HeLa cells. The IC_{50} of the functionalized nanoparticles-based preparation was about three times less than free extract and showed a higher rate of apoptosis. This *in vitro* study establishes bases for the use of functionalized preparation to increase bioavailability and anticancer activity of plant extracts.[86] Table 1 summarizes the most commonly used techniques for the encapsulation of plant extracts.

4. Conclusion

Currently, the great potential of the plant extracts, as the source of various chemical compounds with important biological activities is very well known. Plant extracts might be used in different areas, such as food, therapy, and cosmetics. However, many of these plant extracts have shown poor

Table 1. Encapsulation methods and applications of plant extracts.

Extract name	Encapsulation method	Application	Encapsulation efficiency (EE, %)	Reference
<i>Garcinia mangostana</i>	Nanoprecipitation	Anticancer	87	[84]
<i>Picrothiza kurroa</i>	Nanoprecipitation	Hepatoprotective	63.6	[74]
<i>Polygala senega</i>	Nanoprecipitation	Anticancer	80	[81]
<i>Passiflora serrato-digitata</i>	Nanoprecipitation	Antulceritic	90.6	[79]
<i>Syzygium jambolanum</i>	Nanoprecipitation	Antidiabetic	Not mentioned	[75]
<i>Gelsemium sempervirens</i>	Nanoprecipitation	Anticancer	81.6	[80]
<i>Garcinia mangostana</i>	Nanoprecipitation	Skin penetration enhancement	98.94	[68]
<i>Vitis vinifera</i>	Nanoprecipitation	Nutraceuticals bioavailability enhancement and effective targeting of cancer	Not mentioned	[86]
<i>Emblica officinalis</i>	Solvent evaporation	Anti-oxidant and anti-inflammatory	58–70	[76]
<i>Phytalacca decandra</i>	Nanoprecipitation	Better chemo-preventive action against lung cancer	82.15	[82]
<i>Uncaria tomentosa</i>	Emulsion solvent evaporation	Anticancer	64.6	[85]
<i>Cinnamomum</i> spp.	Emulsion-solvent evaporation	Antimicrobial	47.6	[72]
<i>Lavandula</i> ssp.	Modified-spontaneous Emulsification solvent diffusion method (mSEDM)	Anti-aging and antioxidant agents	>96%	[69]

solubility in aqueous systems, short residence time onto the site of application, high chemical instability, and chemical complexity, which affects the biological activity of their different compounds. These challenges limit their direct and efficient application. Controlled release systems such as polymeric nanoparticles offer a solution to these problems. Right selection of the encapsulation method is the key element to obtain a formulation (nanoparticles) bearing suitable characteristics for the *in vitro* and *in vivo* applications. Generally, it is observed that nanoprecipitation technique provides most suitable nanoparticles in terms of size and encapsulation efficiency. Among the advantages provided by nanoparticles as carriers of plant extracts are: (i) protection against enzymatic degradation, (ii) protection in the application environment, (iii) design of sustained release systems of bioactive compounds, (iv) enhancement of solubility, (v) bioavailability improvement, (vi) affected areas targeting, (vii) boosting of cell or tissues internalization, (viii) reduction of toxicity, and (ix) masking of unpleasant odor and taste. Literature also shows that mostly dermal and oral routes are employed for the delivery of formulations based on encapsulated plant extracts.

5. Expert opinion

In recent years, one of the biggest challenges in the area of pharmaceutical technology is the development and efficient implementation of new therapies. The products obtained from natural sources (e.g. extracts, essential oils, infusions, etc.) represent a novel and efficient alternative to conventional treatment. Many of these natural products, particularly plant extracts, have important biological activities. However, both the formulation and the implementation thereof represent an even greater challenge due to the complex chemical nature of these extracts. Other obstacle associated with using conventional plant extracts-based formulations for humans is the risk of toxicity. Instability of such plant extracts is another concern to be dealt with.

To resolve these problems, recently, it has been proposed to use nanoparticles as carriers of plant extracts. Today, there are a considerable number of investigations are performed in which the nanoparticles are evaluated not only for the administration of the extracts, but also to increase their biological properties. Due to encapsulation of the plant extracts in the nanoparticles (embedded, adsorbed, or bonded), these vehicles represent an excellent approach for controlled release of actives, thereby decreasing the number of doses and toxic effects that occur with conventional delivery.

Among the most important features of nanoparticles in the area of pharmaceutical technology, are: (1) nanometric size, which allows greater interaction of actives with specific cells or tissues, (2) nanoparticles formulations are generally more stable as compare to simple plant extracts solutions, (3) natural extracts are protected by the polymeric wall from external factors (e.g. light, temperature, humidity) and within biological systems (e.g. enzymes, pH,) and (4) rough surface of nanoparticles provides better interactions with biological systems (e.g. cells, tissues, and organs). All these characteristics

can increase the therapeutic efficiency of nanoencapsulated plant extracts.

In the investigations discussed above, formulations containing nanoparticles and encapsulated plant extracts, mainly, maintain and increase the biological activity of the extracts incorporated. Important activities, such as, anti-cancer, anti-diabetic, antiulcerolitic, antioxidant, and antimicrobial are tested in these formulations. The results obtained from the formulations with encapsulated plant extracts show the great potential of nanoparticles for use as carriers of this type of actives.

However, it is very important to carry out careful studies regarding the toxicological aspects involved in the administration of the nanoparticles loaded with plant extracts in biological systems. There is still no specific evidence to support the use of nanoparticles without any risk. In addition, toxic effects, accumulation in biological systems and removal mechanisms must be established. Moreover, the methodologies that are conventionally used for evaluation *in vivo* and *in vitro* of plant products must be adapted to provide reliable results. Another important aspect to consider is to scale-up these processes in industries.

Because of all favorable physical and biological characteristics presented by the nanoparticles, it is clear that their usage is one of the newest routes for the delivery of actives with different chemical properties. In coming years, nanotechnology employment in plant extracts delivery for safe usage in the areas, such as health, medicine, food, cosmetics, and environment, among others could be an interesting field for research.

Declaration of interests

B Armendáriz-Barragán had a doctoral fellowship from CONACyT-México (Nanoscience & Nanotechnology Network and Short Term Research Training Programme in France 2015) and PALSE-France. This work was supported by AIRD-France (JEA1-2011, NANOBIOISA), PAICYT-UANL and PRODEP-SEP Networks (DSA 103.5/15/14155). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
 - of considerable interest
1. WHO |WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. [cited 2015 Nov 5]. Available from: http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/
 2. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect.* 2001;109:69-75.
 3. Clark AM. Natural products as a resource for new drugs. *Pharm Res.* 1996;13:1133-1141.
 4. Butler MS. Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics? [cited 2015 Nov 5]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295205006635>
 5. Surya S, Salam AD, Tomy DV, et al. Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. *Asian Pac J Trop Dis.* 2014;4:337-347.
 6. Memvanga PB, Tona GL, Mesia GK, et al. Antimalarial activity of medicinal plants from the democratic Republic of Congo: a review. *J Ethnopharmacol.* 2015;169:76-98.
 7. Chakraborty B, Nath A, Saikia H, et al. Bactericidal activity of selected medicinal plants against multidrug resistant bacterial

- strains from clinical isolates. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7:5435–5441.
8. Njimoh D, Lemuh AJCN, Mokake SE, et al. Antimicrobial activities of a plethora of medicinal plant extracts and hydrolates against human pathogens and their potential to reverse antibiotic resistance. *Int J Microbiol.* 2015;2015:1–15.
 9. Patten GS, Abeywardena MY, Bennett LE. Inhibition of angiotensin converting enzyme, angiotensin II receptor blocking and blood pressure lowering bioactivity across plant families. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;56:181–214.
 10. Rubió L, Motilva MJ, Romero MP. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53:943–953.
 11. Brambilla D, Luciani P, Leroux JC. Breakthrough discoveries in drug delivery technologies: the next 30 years. *J Controlled Release.* 2014;190:9–14.
 12. Torchilin VP. *Nanoparticulates as drug carriers.* London: Imperial College Press and distributed by World Scientific Publishing Co.; 2006.
 13. Shakeri A, Sahebkar A. Nanotechnology: a successful approach to improve oral bioavailability of phytochemicals. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2016;10(1):4–6.
 14. Khachane P, Date AA, Nagarsenker MS. Eudragit EPO nanoparticles: application in improving therapeutic efficacy and reducing ulcerogenicity of meloxicam on oral administration. *J Biomed Nanotechnol.* 2011;7:590–597.
 15. Mazzaferro S, Bouchemal K, Maksimenko A, et al. Reduced intestinal toxicity of docetaxel loaded into mucoadhesive nanoparticles, in mouse xenograft model. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2012;1:210–217.
 16. Tammam S, Mathur S, Affi N. Preparation and biopharmaceutical evaluation of tacrolimus loaded biodegradable nanoparticles for liver targeting. *J Biomed Nanotechnol.* 2012;8:439–449.
 17. Barratt G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:21–37.
 18. Gagliardi M, Bardi G, Bifone A. Polymeric nanocarriers for controlled and enhanced delivery of therapeutic agents to the CNS. *Ther Deliv.* 2012;3:875–887.
 19. Heneweer C, Gendy SEM, Peñate-Medina O. Liposomes and inorganic nanoparticles for drug delivery and cancer imaging. *Ther Deliv.* 2012;3:645–656.
 20. Herrero EP, Alonso MJ, Csaba N. Polymer-based oral peptide nanomedicines. *Ther Deliv.* 2012;3:657–668.
 21. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 2010;385:113–142.
 22. e Silva C, de Oliveira D, Estevanato LLC, et al. Successful strategy for targeting the central nervous system using magnetic albumin nanospheres. *J Biomed Nanotechnol.* 2012;8:182–189.
 23. Levchenko TS, Hartner WC, Torchilin VP. Liposomes for cardiovascular targeting. *Ther Deliv.* 2012;3:501–514.
 24. Poletto FS, Fiel LA, Lopes MV, et al. Fluorescent-labeled poly(ϵ -Caprolactone) lipid-core nanocapsules: synthesis, physicochemical properties and macrophage uptake. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2012;1:89–98.
 25. Wang F, Li J, Wang C. Hydrophilic and fluorescent colloidal nanorods of MWNTs as effective targeted drug carrier. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2012;1:192–200.
 26. Cenni E, Granchi D, Avnet S, et al. Biocompatibility of poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate. *Biomaterials.* 2008;29:1400–1411.
 27. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2007;3:20–31.
 28. Miladi K, Sfar S, Fessi H, et al. Drug carriers in osteoporosis: preparation, drug encapsulation and applications. *Int J Pharm.* 2013;445:181–195.
 29. Ahmad H. A special issue on polymer and hybrid particles for biomedical applications. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2013;2:153–154.
 30. Soares ASP. A Special issue on applications of microencapsulation. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2013;2:77.
 31. Miladi K, Ibraheem D, Iqbal M, et al. Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *EXCLI J.* 2014;13:28–57.
 32. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;75:1–18.
 33. Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Controlled Release.* 2006;116:1–27.
 34. Galindo-Rodriguez SA, Allemann E, Fessi H, et al. Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2005;22:419–464.
 35. Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Cyclodextrin containing biodegradable particles: from preparation to drug delivery applications. *Int J Pharm.* 2014;461:351–366.
 36. El-Aasser MS, Ugelstad J, Vanderhoff JW. *Polymer Emulsification Process.* US4177177 A. 1979 Dec 4.
 37. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm.* 2008;363:26–39.
 38. Giri TK, Houdhary C, Ajazuddin A, et al. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. *Saudi Pharm J.* 2013;21:125–141.
 39. Crotts G, Park TG. Protein delivery from poly(lactic-Co-Glycolic Acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. *J Microencapsul.* 1998;15(6):15699–15713.
 40. Okochi H, Nakano M. Preparation and evaluation of W/o/w type emulsions containing vancomycin. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;45:5–26.
 41. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Controlled Release.* 2003;90:261–280.
 42. Khoe S, Yaghoobian M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *Eur J Med Chem.* 2009;44:2392–2399.
 43. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm.* 1989;55:R1–R4.
 44. Seju U, Kumar A, Sawant KK. Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: in vitro and in vivo studies. *Acta Biomater.* 2011;7:4169–4176.
 45. Katara R, Majumdar DK, Eudragit RL. 100-based nanoparticulate system of aceclofenac for ocular delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;103:455–462.
 46. Seremeta KP, Chiappetta DA, Sosnik A. Poly(ϵ -Caprolactone), Eudragit® RS 100 and poly(ϵ -caprolactone)/Eudragit® RS 100 blend submicron particles for the sustained release of the antiretroviral efavirenz. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;102:441–449.
 47. Wang G, Yu B, Wu Y, et al. Controlled preparation and antitumor efficacy of vitamin E TPGS-functionalized PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel. *Int J Pharm.* 2013;446:24–33.
 48. Siqueira-Moura MP, Primo FL, Espreafico EM, et al. Development, characterization, and phototoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. *Mater Sci Eng C.* 2013;33:1744–1752.
 49. Van de Ven H, Paulussen C, Feijens PB, et al. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: potent in vitro and in vivo alternatives to fungizone and AmBisome. *J Control Release.* 2012;161:795–803.
 50. Mazzarino L, Travelet C, Ortega-Murillo S, et al. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. *J Colloid Interface Sci.* 2012;370:58–66.
 51. Sanson C, Schatz C, Le Meins JF, et al. A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes. *J Control Release.* 2010;147:428–435.
 52. Barwal I, Sood A, Shama M, et al. Development of stevioside pluronic-F-68 copolymer based PLA-nanoparticles as an antidiabetic nanomedicine. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;101:510–516.
 53. Eidi H, Joubert O, Némos C, et al. Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. *Int J Pharm.* 2012;422:495–503.
 54. Cheow WS, Hadinoto K. Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-Co-Glycolic Acid)

- nanoparticles: modifications of standard nanoparticle preparation methods. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 2010;370:79–86.
55. Bilensoy E, Sarisozen C, Esendağlı G, et al. Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of mitomycin C to bladder tumors. *Int J Pharm.* 2009;371:170–176.
 56. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci.* 2011;36:887–913.
 57. Lassalle V, Ferreira ML. PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. *Macromol Biosci.* 2007;7:767–783.
 58. Khayata N, Abdelwahed W, Chehna MF, et al. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. *Int J Pharm.* 2012;439:254–259.
 59. Leroux JC, Allemann E, Doelker E, et al. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;41:14–18.
 60. Kwon HY, Lee JY, Choi SW, et al. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 2001;182:123–130.
 61. Ma J, Feng P, Ye C, et al. An improved interfacial coacervation technique to fabricate biodegradable nanocapsules of an aqueous peptide solution from polylactide and its block copolymers with poly(ethylene Glycol). *Colloid Polym Sci.* 2001;279:387–392.
 62. Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, et al. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-Lactic Acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm.* 1996;143:133–141.
 63. Doustgani A, Farahani EV, Imani M, et al. Dexamethasone sodium phosphate release from chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2012;1:42–50.
 64. Fan W, Yan W, Xu Z, et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012;90:21–27.
 65. Jafarnejad S, Gilani K, Moazeni E, et al. Development of chitosan-based nanoparticles for pulmonary delivery of itraconazole as dry powder formulation. *Powder Technol.* 2012;222:65–70.
 66. Li P, Wang Y, Peng Z, et al. Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends. *Carbohydr Polym.* 2011;85:698–704.
 67. Avadi MR, Sadeghi AMM, Mohammadpour N, et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2010;6:58–63.
 68. Tachaprutinun A, Meinke MC, Richter H, et al. Comparison of the skin penetration of *Garcinia mangostana* extract in particulate and non-particulate form. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;86:307–313.
 69. Pereira F, Baptista R, Ladeiras D, et al. Production and characterization of nanoparticles containing methanol extracts of portuguese lavenders. *Measurement.* 2015;74:170–177.
 - **This manuscript provides a report that nanoencapsulation could be a stable and promising approach in cosmetics and dermatology with anti-aging and anti-oxidant effects.**
 70. Anbinder PS, Deladino L, Navarro AS, et al. Extract encapsulation with alginate and chitosan systems: interactions between active compound encapsulation polymers. *J Encapsulation Adsorpt Sci.* 2011;1:80–87.
 71. Deladino L, Navarro AS, Martino MN. Carrier systems for yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions. *LWT Food Sci Technol.* 2013;53:163–169.
 72. Hill LE, Taylor TM, Gomes C. Antimicrobial efficacy of poly (DL-Lactide-Co-Glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped cinnamon bark extract against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *J Food Sci.* 2013;78:626–632.
 73. Pereira MC, Hill LE, Zambiasi RC, et al. Nanoencapsulation of hydrophobic phytochemicals using poly (DL-Lactide-Co-Glycolide) (PLGA) for antioxidant and antimicrobial delivery applications: guabiroba Fruit (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) study. *LWT Food Sci Technol.* 2015;63:100–107.
 74. Jia D, Barwal I, Thakur S, et al. Methodology to nanoencapsulate hepatoprotective components from *Picrorhiza kurroa* as food supplement. *Food Biosci.* 2015;9:28–35.
 - **This paper reports that *Picrorhiza kurroa* extract has been successfully encapsulated in order to improve its release profile and consecutively enhance intestinal absorption, biocompatibility, and bioavailability.**
 75. Samadder A, Das S, Das J, et al. Ameliorative effects of *zygium jambolanum* extract and its poly (lactic-Co-Glycolic) acid nano-encapsulated form on arsenic-induced hyperglycemic stress: a multi-parametric evaluation. *J Acupunct Meridian Stud.* 2012;5:310–318.
 76. Renuka RSP, Design of polymeric nanoparticles of *Embolica Officialis* extracts and study of in vitro therapeutic effects. *Curr Trends Biotechnol Pharm.* 2013;7:716–724.
 - **This paper describes how crude extract from *Embolica officialis* can be encapsulated inside polyvinylpyrrolidone (PVP)-based nanoparticles prepared via solvent evaporation technique. Required entrapment efficiency and size can be achieved by optimizing the composition of the variables used and process parameters.**
 77. Choi W, No RH, Kwon HS, et al. Enhancement of skin anti-inflammatory activities of *Scutellaria baicalensis* extract using a nanoencapsulation process. *J Cosmet Laser Ther.* 2014;16:271–278.
 78. Suman TS, Gupta R. Development of herbal biodegradable polymeric nanoparticle from *Clerodendrum infortunatum* L. *J Bionanoscience.* 2013;7:341–347.
 79. Marc Strasser PN. Antitumorogenic potential activity of free and nanoencapsulated *Passiflora serotodigitata* L. extracts. *BioMed Res Int.* 2014;2014. Article ID 434067, 7 pages.
 80. Bhattacharyya SS, Paul S, Khuda-Bukhsh AR. Encapsulated plant extract (*Gelsemium sempervirens*) poly (lactide-Co-Glycolide) nanoparticles enhance cellular uptake and increase bioactivity *in vitro*. *Exp Biol Med Maywood NJ.* 2010;235:678–688.
 81. Paul S, Bhattacharyya SS, Boujedaini N, et al. Anticancer potentials of root extract of polygala senega and its PLGA nanoparticles-encapsulated form. *Evid Based Complement Altern Med.* 2010;2011:e517204.
 82. Das J, Das S, Samadder A, et al. Poly (lactide-Co-Glycolide) encapsulated extract of *Phytolacca decandra* demonstrates better intervention against induced lung adenocarcinoma in mice and on A549 cells. *Eur J Pharm Sci.* 2012;47:313–324.
 83. Pan-in P, Tachaprutinun A, Chaichanawongsaraj N, et al. Combating *Helicobacter pylori* infections with mucoadhesive nanoparticles loaded with *Garcinia mangostana* extract. *Nanomed.* 2014;9:457–468.
 - **This paper shows that encapsulated *Garcinia mangostana* extract cellular uptake and accumulation was higher compared to free *Garcinia mangostana* extract.**
 84. Pan-In P, Wanichwecharungruang S, Hanes J, et al. Cellular trafficking and anticancer activity of *Garcinia mangostana* extract-encapsulated polymeric nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:3677–3686.
 85. Ribeiro AF, Ferreira CTG, Dos Santos JF, et al. Design of experiments for the development of poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) nanoparticles loaded with *Uncaria Tomentosa*. *J Nanoparticle Res.* 2015;17:1–16.
 - **The preliminary experimental done here provides important information regarding the behavior of the nanoparticulate system and the fractional factorial design used informs how to select the most optimal conditions for formulation development.**
 86. Narayanan S, Binulal NS, Mony U, et al. Folate targeted polymeric 'green' nanotherapy for cancer. *Nanotechnology.* 2010;21:285107.

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Brenda Armendáriz Barragán

Candidata al Grado de

Doctora en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: **NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS NATURALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS.**

Campo de Estudio: Nanotecnología Aplicada a las Ciencias de la Salud.

Datos Personales: Nacida el 06 de mayo de 1987 en San Luis Potosí, S.L.P., hija de Felipe de J. Armendáriz Esparza (+) y Olga Barragán Álvarez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2012 con la elaboración de Tesis titulada “Preparación y evaluación *in vitro* de la actividad antituberculosa de nanopartículas poliméricas biodegradables cargadas con clofazimina”.

Experiencia Profesional: Investigación en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas desde 2012 y Profesora Asistente en la asignación de Análisis Instrumental (100% práctica; 50% teórico).