



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE
COMPLEJOS DE INCLUSIÓN β -CICLODEXTRINA/TIMOL
INCORPORADO A UNA NANOCÁPSULA POLIMÉRICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ADAN OLVERA ALMARAZ

DIRIGIDA POR

DRA. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO. 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISIQUÍMICA
DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN
 β -CICLODEXTRINA/TIMOL INCORPORADO A UNA
NANOCÁPSULA POLIMÉRICA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ADAN OLVERA ALMARAZ

DIRIGIDA POR

DRA. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ

SINODALES

DRA. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ
PRESIDENTE

DR. ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO
SINODAL

M. EN C. ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ
SINODAL

Q. EN AL. ADRIANA DE LA PAZ BLANCO PADILLA
SINODAL SUPLENTE

AGRADECMIENTOS

A Dios y a la virgen por permitirme concluir este trabajo.

A un ángel que me cuida en el cielo y que siempre la voy a recordar, mi abuelita que siempre me cuidó todo el tiempo. Gracias por todo el tiempo que estuviste conmigo, te quiero mucho

Le quiero agradecer a mis padres que me apoyaron desde el primer momento en que pisé la Facultad de Química, me sobran palabras para agradecer todo el apoyo que tuve de ustedes y que creían en mi para terminar esta etapa de mi vida.

A CONACYT por otorgarme una beca para la realización de dicho proyecto.

A la Dra. Sandra Mendoza por apoyarme y asesorarme durante la realización del proyecto.

A mi familia, hermano, hermana y sobrina, ustedes que siempre estuvieron conmigo cuando ya creía no poder más con la carrera, sé que siempre estarán ahí cuando lo necesite.

Un agradecimiento a mis compañero de la facultad y que ahora son grandes amigos: Ale, Zyanya, Ceci, Nacho, Hugo, Borre, Amairaní, Karla, Luis, Lucero, Aarón, amigos de Durango. Saben que son los mejores y siempre pasamos grandes momentos y aventuras.

A el laboratorio de nutraceuticos y a todos sus integrantes que me apoyaron durante todo el proyecto: Adriana, Magaly, Alexa, Cynthia, Arely, Memo, gracias por su apoyo para concluir este trabajo.

GRACIAS a todos los que mencioné y a los que me faltaron perdón. Los quiero mucho.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Sistemas de encapsulación y liberación controlada	2
2.2. Materiales para la encapsulación	2
2.3. Complejos de inclusión	3
2.3.1. Ciclodextrinas	4
2.3.2. Técnicas para la formación de complejos de inclusión	5
2.3.3. Aplicaciones de los complejos de inclusión	6
2.4. Doble encapsulación	7
2.5. Nanopartículas poliméricas	7
2.5.1. Eudragit	8
2.6. Timol y sus aplicaciones	9
2.7. Justificación	11
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS	14
4.1. Objetivo general	14
4.2. Objetivos específicos	14
5. METODOLOGIA	15
5.1. Materiales	15
5.2. Desarrollo experimental	15
5.2.1. Preparación de los complejos de inclusión β -ciclodextrina con timol.	15
5.2.2. Preparación de nanopartículas poliméricas	15
5.2.3. Caracterización fisicoquímica de la doble encapsulación	16
5.2.3.3. Microscopía de fluorescencia	16
5.2.4. Capacidad antioxidante	19

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	21
6.1. OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	21
6.1.1. Tamaño de partícula y morfología por SEM	21
6.1.2. Cuantificación de timol en nanocápsulas por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	22
6.1.3. Eficiencia de encapsulación	23
6.1.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	25
6.1.5. Determinación de la cinética de liberación encapsulación en las nanopartículas.	27
6.1.6. Espectroscopia de Infrarrojo usando Transformada de Fourier.	28
6.2. Capacidad antioxidante.	32
6.2.1. Método ABTS	32
7. CONCLUSIONES	33
8. REFERENCIAS	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Materiales para encapsulaciones	2
2	Gradiente para la separación de timol	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación de la formación del complejo de inclusión con ciclodextrinas	3
2	Estructura de la diferentes ciclodextrinas	4
3	Estructura de nanocápsula y nanoesfera	7
4	Micrografías de nanopartículas poliméricas	22
5	Variación de dimensiones de nanopartículas poliméricas	22
6	Micrografías de fluorescencia de complejos de inclusión β -CD/ timol incorporadas en nanopartículas poliméricas	24
7	Cromatograma de timol	25
8	Termogramas de A) β -Ciclodextrina, B) complejos de inclusión, C) eudragit D) nanopartículas poliméricas	27
9	Cinética de liberación de las nanopartículas poliméricas a diferentes pH's A) 2.0 B) 4.5 y C) 7. 2	28
10	Espectro FTIR correspondiente a: A) timol B) β -Ciclodextrina C) eudragit D) nanopartículas poliméricas	30
11	Espectro FTIR de los complejos de inclusión β -Ciclodextrina/ timol	32
12	Comparación de espectro FITR de: A) eudragit B) nanopartículas poliméricas	32
13	Cinética de capacidad antioxidante a diferentes pH's A) 2.0, B) 4.5, C) 7. 2 y D) método convencional ABTS	33

RESUMEN

El timol es una molécula bioactiva que tiene actividad antimicrobiana y antioxidante, sin embargo es un compuesto que se degrada fácilmente y es poco soluble en agua. El desarrollo de una doble encapsulación nos ofrece una alternativa viable para preservar su actividad biológica. El objetivo de este trabajo fue la obtención y caracterización de una doble encapsulación cargadas con timol. Se calculó la eficiencia de encapsulación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), dando un porcentaje de Eficiencia de encapsulación de las Nanopartículas poliméricas (NP's) cargadas con complejos de inclusión β -CD/timol de $58.34 \pm 6.23\%$. También se observó que la capacidad antioxidante está en función del pH, donde a pH 4.5 y 2.0, en el minuto 10 se observó un mayor aumento en su capacidad antioxidante en comparación a pH 7.2. Al minuto 60 el aumento de la capacidad antioxidante llegó a 392.3 ± 42.5 μ mol equivalente de trolox / mg. Eudragit, se observó que el polímero presentó dos transiciones de fase cerca de los 70° y 190° $^\circ$ C, lo cual corresponde a la temperatura vítrea (T_g) y a la disociación de los puentes de hidrógeno del polímero. Los resultados sugieren que estos sistemas de liberación controlada pueden ser adecuados para la encapsulación de compuestos bioactivos dentro de productos alimentarios o farmacéuticos y para su liberación en el intestino delgado donde pueden ser absorbidos.

1. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de las enfermedades metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas e infecciosas ha aumentado, colocándose como principales causas de muerte. Lo anterior ha traído consigo un aumento en el consumo de moléculas con actividad biológica y, por lo tanto, la necesidad de encontrar nuevas fuentes de compuestos bioactivos. Sin embargo, la actividad biológica de estos compuestos se ve afectada por varios factores una vez que estos se ingieren, tal como la mala absorción en membranas, la facilidad de su metabolización en el cuerpo o incluso la interacción con compuestos alimenticios de la dieta.

La nanoencapsulación ofrece una alternativa viable para preservar la actividad biológica de los compuestos bioactivos dentro del cuerpo humano o durante el procesamiento y almacenamiento de estos, al incluirlos dentro de un sistema de barrera o material de pared. No obstante, aún es necesario el desarrollo de nuevos sistemas de encapsulación que mejoren la preservación de los compuestos bioactivos o incluso que permitan una liberación más controlada de los mismos o sitio-dirigida.

2. ANTECEDENTES

2.1. Sistemas de encapsulación y liberación controlada

La encapsulación es un proceso que se define como el atrapamiento de una sustancia (agente activo) dentro de otra (material de pared); teniendo como objetivo preservar la estabilidad de los compuestos bioactivos durante el procesamiento y almacenamiento de un fármaco y evitar interacciones entre el compuesto bioactivo y otros componentes presentes en la dieta regular. Además, la encapsulación es una herramienta muy útil para mejorar la biodisponibilidad de moléculas bioactivas. Dentro de las tecnologías empleadas para encapsular ingredientes activos se encuentran los complejos de inclusión, micro y nanopartículas, nanofibras, micelas, emulsiones (micro y nanoemulsiones), entre otros (Nedovic y *col.*, 2011).

2.2. Materiales para la encapsulación

Existen varios materiales de pared para la elaboración de nanopartículas, la selección se basa en sus características y propiedades, así como la compatibilidad que se pueden tener entre sí cada uno de ellos, para realizar dicha interacción y formar más de una capa. Estos biopolímeros son utilizados en diferentes áreas como la biomedicina, alimentaria y la farmacéutica para formar, proteger y transportar los compuestos activos que van dirigidos a diferentes funciones. Entre ellos se encuentran los de origen natural, tales como almidones, ciclodextrinas, gomas, lípidos, proteínas entre otros como se pueden observar en el cuadro 1.

Cuadro 1. Materiales de pared (Wandrey y col., 2010)

Origen	Polímeros de carbohidratos	Proteínas	Lípidos
Plantas	<ul style="list-style-type: none"> • Almidón • Celulosa • Exudados de plantas 	<ul style="list-style-type: none"> • Zeína • Aislado proteico de amaranto 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácidos grasos • Glicerol • Ceras • Fosfolípidos
Microbiano/animal	<ul style="list-style-type: none"> • Polisacáridos • Carrageninas • Alginato • Xantano • Gelano • Dextrato • Quitosano 	<ul style="list-style-type: none"> • Caseínas • Proteínas de sueros • Gelatina 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácidos grasos • Glicéridos • Ceras • Fosfolípidos (goma laca)

2.3. Complejos de inclusión

Ésta tecnología consiste básicamente en obtener un complejo molecular que resulta de incluir la molécula del principio activo dentro de otra que contiene características específicas tales como: una fuerza de repulsión entre moléculas de agua y una cavidad apolar, con esto nos ayuda a la incorporación de moléculas hidrófobas más pequeñas, promoviendo la formación de los complejos de inclusión. (Figura 1). (Szejtli, 1998).

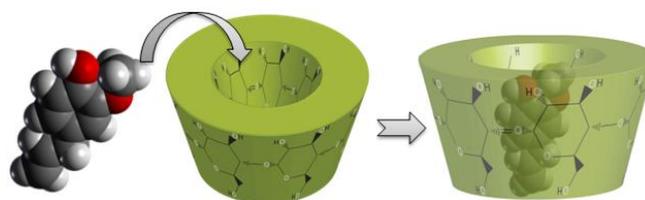


Figura 1. Representación de la formación de complejo de inclusión con ciclodextrina.

Por consiguiente, los complejos de inclusión (o complejos de huésped-huésped) pueden modificar algunas propiedades de la molécula huésped, por ejemplo, mejora de la solubilidad de los huéspedes altamente insolubles, la estabilización de los huéspedes lábiles contra los efectos degradativos de la oxidación, la luz y el calor visible o UV, control de la volatilidad y la sublimación, el aislamiento físico de compuestos incompatibles, separaciones cromatográficas, modificación gusto por los sabores de enmascaramiento, los malos olores y la liberación controlada de fármacos y sabores (Astray y col., 2009 ; Singh e y col., 2002). Uno de los materiales más utilizados en la actualidad son las ciclodextrinas, ya que contiene las características que ayudan a las formación de los complejos de inclusión (Atwood, 2006).

2.3.1. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos, que consisten en 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina), 8 (γ -ciclodextrina) o más unidades de glucopiranosas respectivamente, unidas por enlaces α -1-4 (Mourtzinos *et al.*, 2008) (Figura 2). Las ciclodextrinas se pueden obtener por la degradación enzimática de almidón, o por el metabolismo de ciertas bacterias, como *Bacillus macerans* (Ponce C, y col., 2010). El interés por estos oligosacáridos surgió debido a su estructuras moleculares en forma de anillo, debido a la falta de rotación libre en el nivel de enlaces entre unidades de glucopiranosas, no son cilíndricas sino, más bien, presenta forma de cono (Duchene, 2011). Además que tienen una estructura rígida con una superficie exterior hidrófila, lo que permite la solubilidad en agua, mientras que la parte interna corresponde a una cavidad hidrófoba debido a la ausencia de grupos hidroxilo., permitiendo la encapsulación de compuestos hidrofóbicos como aceites esenciales y otros compuestos, mejorando la solubilidad, estabilidad química y la biodisponibilidad (Del Valle, 2004).

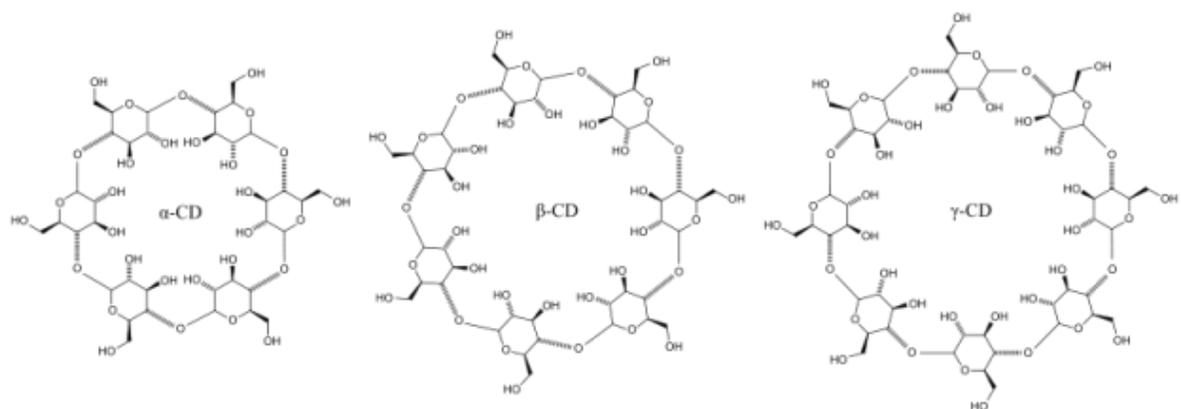


Figura 2. Estructura de las diferentes ciclodextrinas.

La β -ciclodextrina es una de las más utilizadas en la actualidad, debido a su tamaño de cavidad, la cual es adecuada para medicamentos comunes con pesos moleculares entre 200 y 800 g / mol y ha estado en la lista GRAS desde 1998, como un portador de sabor y protector (Szente, y col., 2004; *Waleczek y col.*, 2003).

2.3.2. Técnicas para la formación de complejos de inclusión

Para la formación de complejos de inclusión donde se utilizan las ciclodextrinas se pueden realizar por métodos en estados sólido tales como: co-precipitación y neutralización. También están los métodos en estado líquidos como: el amasado, fusión de huésped y molienda. (Liu, L, et al., 2010).

2.3.2.1 Co-precipitación

Este método es el más utilizado, en él, la ciclodextrina se disuelve en agua y el huésped se añade mientras se agita la solución de ciclodextrina. La concentración de ciclodextrina puede ser tan alta como 20%. En muchos casos, la solución de ciclodextrina y la molécula huésped debe ser enfriada mientras se agita antes de la formación del precipitado. El precipitado puede ser recogido por decantación, centrifugación o filtración. El precipitado se puede lavar con una pequeña cantidad

de agua u otro disolvente miscible en agua tal como alcohol etílico, metanol o acetona (Del Valle, 2003).

2.3.2.2. Neutralización

Se coloca la ciclodextrina en su disolvente y se adiciona una solución alcalina, se le agrega el principio activo, se mezcla y se adiciona ácido hasta la formación de un precipitado que indica que el complejo de inclusión se ha formado y se filtra (Del Valle, 2003).

2.3.2.3. Complejos en pasta o Amasado

Sólo se añade una pequeña cantidad de agua para formar una pasta, mezclando la ciclodextrina usando un mortero, o se puede utilizar una amasadora a gran escala. Se amasa hasta incorporación total dejando evaporar el disolvente (Del Valle, 2003).

2.3.2.4. Fusión del huésped

Esta técnica consiste en fundir el fármaco y después adicionarles la ciclodextrina correspondiente. Sin embargo no es muy utilizada, ya que varios activos se pueden degradar a altas temperaturas antes de llegar a su punto de fusión. (Del Valle, 2003).

2.3.2.5. Mezclado en seco

Algunos huéspedes pueden formar complejos solo añadiendo el huésped y la ciclodextrina dentro de un molino y se deja moler durante el tiempo que se desee (Del Valle, 2003).

2.3.3. Aplicaciones de los complejos de inclusión

Los complejos de inclusión producidos por ciclodextrinas se utilizan en la industria farmacéutica para aumentar la solubilidad de algunos fármacos en agua. Las moléculas del principio activo se incluyen en la cavidad y pueden ser transportadas por la ciclodextrina hasta el lugar de acción. Además, dichas moléculas, son

protegidas del oxígeno y de la irradiación ultravioleta, liberándose uniformemente en un tiempo prolongado (Polyakov y col., 2010).

El mayor porcentaje de complejos de inclusión de ciclodextrinas usadas comercialmente corresponde a la industria alimentaria, a la cosmética y al desarrollo de productos de aseo personal como su aplicación en la eliminación de olores formados en la degradación microbiana del sudor, incorporándose con este fin, en desodorantes de barra. Se puede mejorar la solubilidad de determinados compuestos como el retinol, empleado en formulaciones anti-envejecimiento, al tiempo que los complejos con ciclodextrina son más estables a la reacción de oxidación y a la acción de la radiación ultravioleta (Del Valle, 2003).

Sin embargo este el uso de este tipo de encapsulación no puede realizarse en como un método de protección de pH muy elevados o muy bajos, por lo que no puede conferir una liberación prolongada en el estómago o en el intestino, ya que contiene pH ácidos y no pueden ser utilizadas (Couvreur y col., 2002).

2.4. Doble encapsulación

Recientemente, se ha puesto atención en la doble encapsulación debido a que se logra una liberación más controlada del activo y una mejor estabilidad. Dentro de estas estrategias se han utilizado nanopartículas. (Couvreur y col., 2002).

2.5. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas se definen como sistemas coloidales submicrónicos con diámetros que oscilan entre 1 y 100 nm y, que de acuerdo al proceso utilizado para su elaboración, se pueden obtener nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas están formadas por una densa matriz polimérica en la que se dispersa el activo en la superficie de la partícula y tienen un diámetro entre 100 y 200 nm mientras que las nanocápsulas son sistemas vesiculares donde el activo se encuentra en una cavidad acuosa u oleosa, rodeado por una membrana polimérica (Letchford y col., 2007).



Figura 3. Estructura de nanocápsula y nanoesfera.

Existen diversos agentes encapsulantes para la elaboración de nanopartículas, dentro de los naturales se usan almidones, ciclodextrinas, gomas, lípidos, proteínas etc. Sin embargo, se prefieren los agentes encapsulantes sintéticos los cuales generan una mayor estabilidad del sistema y entre los que destaca el Eudragit (Bei y col, 2010).

2.5.1. Eudragit

Se conoce como Eudragit a los copolímeros del ácido metacrílico y a los diferentes ésteres acrílicos o metacrílicos (Lira, 2009). Estas resinas acrílicas son particularmente atractivas como consecuencia de su elevada estabilidad química, de su compatibilidad con diferentes materiales y del considerable número de variedades disponibles, que cubren un amplio espectro de características de solubilidad, permeabilidad y estado físico (Barreto, 2009).

Además, dichos compuestos presentan excelentes propiedades adhesivas y plásticas, lo que los hace una excelente opción para emplearlos como recubrimiento. Estos compuestos ya se han empleado en dispositivos electrónicos,

pinturas, componentes ópticos en comunicaciones y en sistemas farmacéuticos como componentes de sistemas de liberación de fármacos (Higashi K, 2015).

El Eudragit L30 D-55, proporciona propiedades gastrorresistentes a las nanopartículas (Pastor y col., 2013). Como grupo funcional tiene el ácido metacrílico.

2.5.1.1. Aplicaciones del Eudragit

Entre las numerosas aplicaciones que se han encontrado para los Eudragit como excipientes en formas de dosificación, hay que destacar en primer lugar, su empleo como materiales de recubrimiento. Así, los grupos funcionales amino de la cadena lateral de las variedades de Eudragit dan lugar a la formación de películas solubles a pH ácido que resultan de utilidad para la liberación de compuestos con actividad biológica a nivel gástrico, consiguen un efecto protector frente a la humedad y frente a otros factores ambientales o permiten el enmascaramiento de las propiedades organolépticas de algunos fármacos. Las formas anicónicas de Eudragit (FS, L y S), que incorporan en su estructura grupos carboxílicos, son solubles a valores más elevados de pH y han encontrado aplicación como materiales gastrorresistentes. Las variedades insolubles (NE, NM, RL, RS) dan lugar a películas adecuadas para la liberación controlada de fármacos, con cubiertas de permeabilidad proporcional a su espesor (Barreto, 2009).

2.6. Timol y sus aplicaciones

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es una sustancia cristalina incolora con un olor característico, es un componente fenólico monoterpeno de aceites esenciales producidos por numerosas plantas aromáticas y especias como el comino negro (*Nigella sativa*), mejorana (*Origanum majorana*), orégano (*Origanum vulgare*) y el tomillo (*Thymus vulgaris*) (Silva y col., 2012).

El timol es un efectivo agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de microorganismos, su mecanismo de acción se basa en el rompimiento de la membrana bacteriana. El timol ha demostrado frenar el crecimiento de bacterias, en particular son las *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp y *Listeria* spp (Burt y col., 2007). Estudios recientes han demostrado el uso del timol contra varios parásitos, entre ellos *Gardia lamblia* y se ha comparado con el tinidazol, dando como resultado un mayor efecto inhibitorio contra dicho parásito. Incluso en la apicultura es utilizado para combatir una plaga de un parásito llamado *Varroa jacobson* (Bruneton J, 2008).

También utiliza como antiséptico en productos como enjuagues bucales que tienen como objetivo eliminar las bacterias en la boca y pastas de dientes, además de tener un sabor agradable. El timol se administra por vía oral en el tratamiento de la bronquitis, tosferina, dolor de garganta, diarrea, dispepsia, gastritis, desórdenes de la piel, desinfectante urinario y antihelmíntico. Tópicamente se utiliza para prevenir las caries y para combatir la halitosis, para el tratamiento de la alopecia y también forma parte de muchos linimentos anti-inflamatorios. Por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas forma parte de gotas óticas. También utilizado en cosmética y perfumería (Bruneton J, 2008).

Por otro lado, es considerado como antioxidante, el cual son compuestos que retrasan o impiden la oxidación de otras moléculas (Brewer, 2011). Este interactúa con los radicales libres y previene el daño que pueden afectar los radicales libres. Por lo tanto, el tratamiento de timol con antioxidante es altamente útil para superar el estrés oxidativo. (Beena y Rawat, 2013). Estudio reciente con el timol investigaron el posible mecanismo de su actividad antioxidante, teniendo como resultado la acción inhibitoria contra 3-nitrotirosina un potente radical libre y la formación de malondialdehído, eliminador de radicales libres (Beena y Rawat, 2013 y Silva *et al.*, 2012).

Otro uso terapéutico del timol es el efecto antitusígeno y es utilizado como tratamiento para la bronquitis. Debido al exceso de líquido que se encuentra en el

pecho y los pulmones, los pacientes con bronquitis experimentarán episodios de tos violenta. Sin embargo, el timol puede ayudar a romper el moco que se encuentra en el cuerpo, haciendo que cada tos más eficaz en la limpieza de las vías aéreas.

El timol es reconocido como un compuesto seguro para el consumo, y ha sido aprobado por la Food and Drug Administration para uso alimentario y ha sido incluido por el Consejo de Europa en la lista de compuestos aromáticos que pueden añadirse a los productos alimenticios (De Vicenzi, y *col.*, 2004). Se han utilizado como antiséptico en la práctica médica, la agricultura, la cosmética y la industria alimentaria. Sin embargo, existen retos para usar timol como antimicrobiano y antioxidante, ya que tiene un umbral extremadamente bajo, un sabor el cual puede cambiar drásticamente las propiedades sensoriales de la comida y además es muy insoluble en agua debido a que es un compuesto lipofílico y puede tener un contacto limitado con los patógenos en los alimentos con alto contenido de humedad (Kalemba D, y *col.*, 2003); además se oxida, descompone o se evapora cuando se expone al aire, la luz o el calor (Locci E y *col.*, 2004). La inclusión del timol en ciclodextrinas (CD) es un método para superar estos problemas ya que esta técnica reduce en gran medida la volatilidad, oxidación y descomposición térmica (Wu Y, 2012).

2.7. Justificación

La encapsulación, es una técnica que se aplica para preservar y proteger numerosos compuestos. Es una forma de empacar materiales sólidos, líquidos o gaseosos.

La doble encapsulación nos permite conservar eficientemente las propiedades fisicoquímicas y biológicas de compuestos químicos muy sensibles. Además evita la formación de aromas indeseables producidos por interacciones entre compuestos de nuestra alimentación diaria, otorga la protección frente a la oxidación inducida como consecuencia de la radiación UV, minimiza la interacción entre componentes aromáticos, aumenta la útil de los aromas y controla la

liberación. La doble encapsulación es una excelente alternativa para proteger compuestos con actividad biológica.

3. HIPÓTESIS

El uso de un sistema de doble encapsulación para el timol confiere una liberación controlada, manteniendo la capacidad antioxidante.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Obtener y caracterizar fisicoquímicamente complejos de inclusión β -ciclodextrina/timol incorporados a una nanocápsula polimérica.

4.2. Objetivos específicos

- Formar complejos de inclusión de β -ciclodextrina/timol empleando la técnica de evaporación de solventes.
- Incorporar los complejos de inclusión de β -ciclodextrina/timol a nanocápsulas de Eudragit L30-D55, utilizando el método de co-precipitación.
- Caracterizar fisicoquímicamente la doble encapsulación.
- Medir la capacidad antioxidante de la doble encapsulación mediante la técnica de ABTS.

5. METODOLOGIA

5.1. Materiales

Para el desarrollo de la investigación se utilizaron timol al 99.5% y β -ciclodextrina al 97% marca Sigma Aldrich. Para la elaboración de las nanopartículas se utilizó Eudragit® L30 D55 y alcohol polivinílico.

5.2. Desarrollo experimental

5.2.1. Preparación de los complejos de inclusión β -ciclodextrina con timol.

Los complejos de inclusión de timol se prepararon por el método de co-precipitación, donde el anfitrión correspondió a la β -ciclodextrina y el huésped al timol. Se lleva a cabo el tratamiento, donde la proporción indicada fue 85:15. Se disolvió 850 mg en una mezcla de 10 mL de etanol/agua (1:2) a 55°C. Se realizó otra solución donde se disolvieron 150 mg de timol en etanol (10% p/p) y se añadió a la solución de β -ciclodextrina. La mezcla se agitó magnéticamente manteniendo una temperatura de 55°C, posteriormente, la mezcla se enfrió en agitación durante 4 h hasta que llegó a una temperatura de 25 °C. La solución se refrigeró durante 12 h a 7 °C. El precipitado se filtró al vacío, se secó en un horno de convección a 50 °C durante 24 h y el polvo resultante se secó 24 h más y se almacenó en un frasco ámbar para su posterior análisis.

5.2.2. Preparación de nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas se prepararon por el método de desplazamiento de solvente reportado por Pool *et al.*, (2012). El Eudragit (200 mg), junto con el complejo de inclusión (10 mg) se disolvieron en 20 mL de acetona por agitación magnética durante 90 min a 25 °C. La solución resultante, se le añadió lentamente a una solución acuosa 5% de PVA (40 mL) usando una jeringa. Ambas soluciones se homogenizaron usando un homogeneizador de alto corte de cizalla, a 19000 RPM por 5 min; durante esta etapa, las soluciones se colocaron en una bandeja

con hielo previo al homogeneizado, con la finalidad de evitar que se eleve la temperatura por la velocidad del corte de cizalla. Después, la solución orgánica y el agua se eliminaron de la mezcla utilizando un rota evaporador bajo condiciones de vacío por 90 min a 30 °C. Las nanopartículas formadas se lavaron tres veces empleando agua destilada y ultracentrifugando las soluciones de lavado a 20,000 RPM por 20 min a 4 °C en una ultracentrífuga. El precipitado se resuspendió en agua destilada por 24 h y se congeló a -72 °C en un ultracongelador. Finalmente, las nanopartículas se liofilizaron en una liofilizadora, y al terminar se almacenan en desecadores a temperatura ambiente para realizar su posterior caracterización.

5.2.3. Caracterización fisicoquímica de la doble encapsulación

5.2.3.1. Tamaño de partícula

El tamaño promedio de partícula se determinó con el programa ImageJ a partir de micrografías de Microscopia Electrónica de Barrido.

5.2.3.2. Morfología

La morfología de las nanopartículas será evaluaron por Microscopia Electrónica de Barrido

5.2.3.3. Microscopía de fluorescencia

Para determinar la encapsulación de timol en las nanocápsulas se observaron en microscopia de fluorescencia a una longitud de onda de 280 nm, se resuspendió 1mg de muestra en 1 ml de agua destilada, se colocó una gota en un portaobjetos y se tapó con un cubreobjetos, se colocó en el microscopio confocal Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta-Multifuncional, se observó a una de resolución de 100X.

5.2.3.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El comportamiento térmico del timol, los complejos de inclusión y nanopartículas se determinará por Calorimetría Diferencial de Barrido. Se usaron dos cápsulas o crisoles de aluminio, la cual una contiene la muestra y la otra estaba vacía y es utilizada como referencia.

Se tomó una muestra de 2 mg aproximadamente y colocó en un crisol de aluminio, se selló perfectamente antes de ponerlo en el calentador. Se aplicó una velocidad de barrido de 10°C/min en un rango de temperatura de 40 a 210°C bajo atmósfera de nitrógeno con una velocidad de flujo de 50 mL/min.

5.2.3.5. Determinación de la cinética de liberación encapsulación en las nanopartículas

La prueba de cinética de liberación se realizó de manera *in vitro* por la técnica de voltamperometría diferencial de pulso. Se empleó de igual forma un equipo BAS-Epsilon (modelo C-3) y el mismo sistema de celda de tres electrodos a la que se incorporó un electrodo sólido estacionario (carbón vítreo) como electrodo de trabajo, Ag/AgCl (3M KCl) como electrodo de referencia y un electrodo auxiliar de alambre de platino. Los experimentos de VDP se realizaron en soluciones dexogeninadas por burbujeo de nitrógeno gaseoso puro previamente. Antes de cada experimento, el electrodo se pulió con una lija utilizando una suspensión de alúmina y se enjuagó con agua desionizada después de cada experimento. Los parámetros utilizados fueron una amplitud de pulso de 70mV y una velocidad de barrido de 5mV/s. el sistema se mantuvo en agitación durante 32h, para provocar la difusión de las moléculas de los antioxidantes hacia el medio de dispersión, monitoreando a distintos tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 28 y 32h). El ensayo de liberación se realizó en una solución amortiguadora Sørensen a tres pH diferentes, simulando las condiciones de acidez del estómago (2 y 4.5) y del

intestino delgado (7.2). Se utilizaron 3 mg de muestra de nanopartículas, las cuales se añadieron en 3 mL de solución de amortiguadora de Sörensen (a pH ajustado a 2, 4.5 y 7.2 usando HCl). Se llevó a cabo el monitoreo de la concentración de timol liberado por medio de VDP, donde la corriente está directamente relacionada con la concentración de compuesto evaluado. Con la finalidad de mantener la estabilidad química del timol, la muestra en la solución de Sörensen se dejó burbujear con Nitrógeno gaseoso durante 5 min para eliminar la presencia de oxígeno, que pudiera oxidar al timol encapsulado.

5.2.3.6. Cuantificación de timol en nanopartículas por cromatografía de alta resolución (HPLC)

Para la determinación y cuantificación de timol se realizó mediante HPLC/DAD (Agilent serie 2100). La separación se realizó a 35°C en una columna Agilent fase reversa Sorbax XDB-C18 de (4.6 x250 mm, 5 µm de tamaño de partícula). Las fases móviles utilizadas fueron A: ácido acético 1% y B: acetonitrilo con un flujo de 1 mL/min. Se utilizó el gradiente de concentraciones que se muestra en el cuadro 2, además se utilizó el estándar de timol.

Cuadro 2. Gradiente para la separación del timol

Tiempo (min)	A%	B%
0	85	15
2.5	60	40
5	70	30
10	80	20
12	40	60
13	50	50
15	85	15

5.2.3.7. Eficiencia de encapsulación

Para la evaluación de la eficiencia de encapsulación (EE%) se siguió la metodología descrita por Mora et al. (2009) con algunas modificaciones, se dispersó una alícuota de nanopartículas, en 1 mL DMSO durante 48 h con agitación magnética en un vial ámbar para evitar la degradación del timol con la luz, burbujeando con nitrógeno gaseoso antes de sellar el vial. Después, 30 μ L de la solución se llevó a cabo su cuantificación del timol mediante HPLC/DAD (Agilent serie 2100), con los parámetros de la cuantificación del timol (6.2.3.8). La eficiencias de las NP's se determinó mediante la ecuación expuesta por Mourtzinos y col, 2008.

$$EE(\%) = \frac{\text{Concentracion del activo encapsulado}}{\text{Concentracion de timol encapsulado}} \times 100$$

5.2.3.8. Espectroscopia de Infrarrojo usando Transformada de Fourier

Los espectros de absorción de infrarrojo de los estándares de timol, mezclas físicas, polímeros y NP's de Eudragit cargadas con complejos de inclusión β -ciclodextrina/timol, se examinaron por FTIR.

5.2.4. Capacidad antioxidante

5.2.4.1. Método ABTS

La estimación de la capacidad antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) se realizó utilizando el ácido 2-2'-azino bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), ABTS por sus

siglas en ingles, descrito por Nenadis et al., (2004). El método se llevó a cabo en microplacas. Se colocaron 20µL de las muestras y se mezclaron con 230µL de ABTS. Se utilizaron controles que contuvieran todos los reactivos de la reacción y se agregó Trolox como control. Se realizaron las mediciones de absorbancia a 734nm en 0, 6, 10, 30, 60 y 90 minutos en un lector de microplacas. Se realizaron los cálculos de porcentaje de absorbancia de inhibición de acuerdo la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de inhibicion} = \frac{1 - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

Los resultados se expresan como TEAC, este valor se calcula empleando una curva de calibración de Trolox y se expresa como µmol de Trolox por miligramo de muestra.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Obtención de nanopartículas poliméricas

6.1.1. Tamaño de partícula y morfología por microscopía electrónica de barrido

La morfología las nanopartículas se pudieron observar mediante microscopía electrónica de barrido. En la figura 4 se pueden observar la formación de las nanocápsulas poliméricas de manera semi- esférica en su gran mayoría. La variación de morfología de las nanocápsulas en su forma semi-esférica y las superficies lisas se informó anteriormente (Choi et al., 2009) donde realizaron una encapsulación de carvacrol utilizando Eudragit como material de pared. Se obtuvo un diámetro de 60 a 150 nm. Se llevó a cabo la medición de diámetros de 100 NP'S, obteniendo los siguientes resultados que se pueden observar en la gráfica (Figura 5), resultados semejantes a la variación de diámetros que presentó Song *et al.* (2008), donde también mencionó que el tamaño de las nanopartículas depende de diversos factores como la concentración del polímero, concentración del activo y la concentración de surfactante, ya que influye en la viscosidad de la solución y por ende en el corte de cizalla, provocando una variación en el tamaño de partícula.

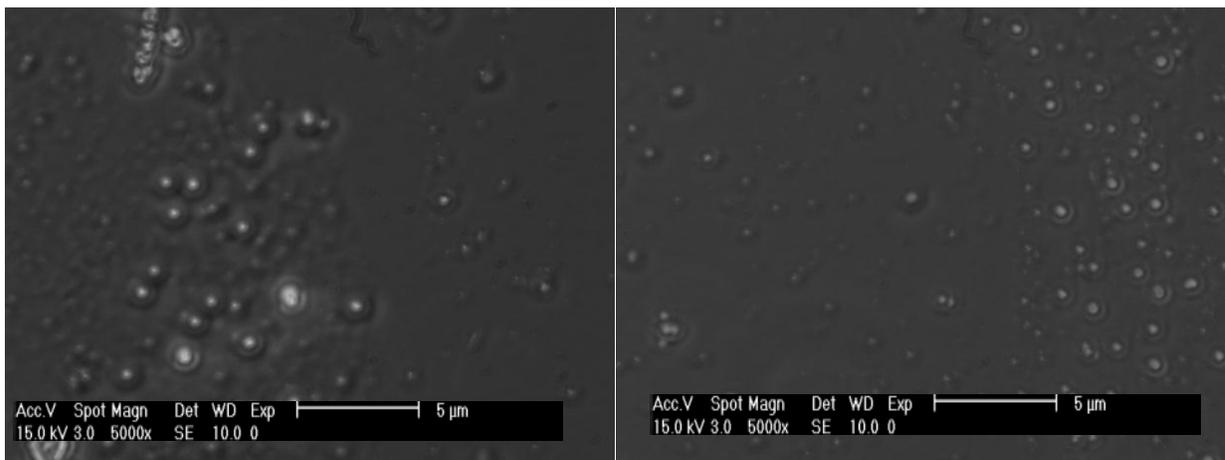


Figura 4. Micrografías Nanopartículas poliméricas.

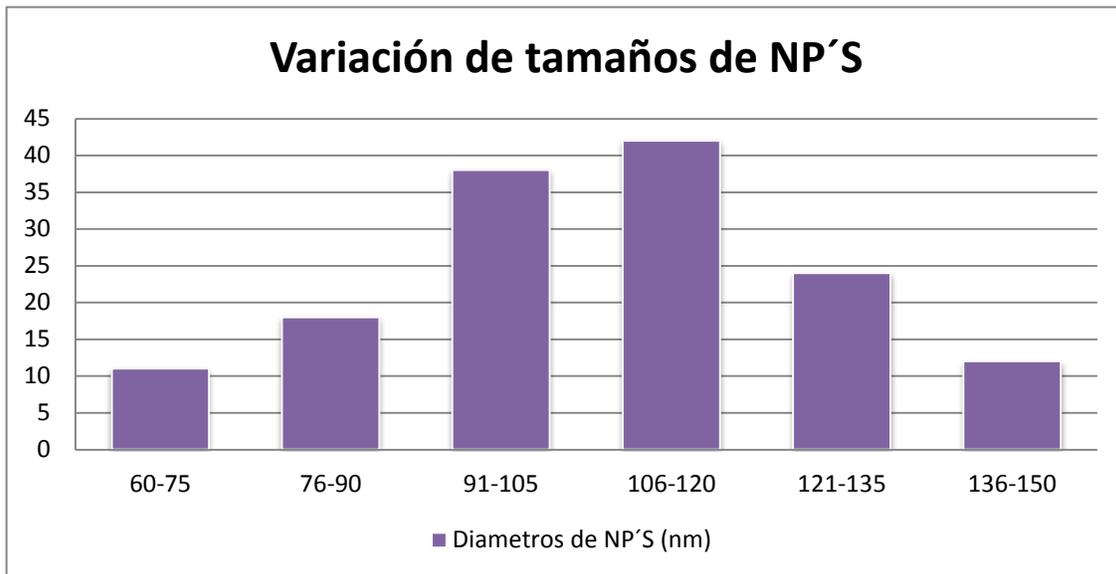


Figura 5. Variación de dimensiones de nanopartículas poliméricas.

6.1.2. Cuantificación de timol en nanocápsulas por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para la determinación de la eficiencia de encapsulación y la cuantificación de timol en capsulado se determinó mediante HPLC, se realizó la curva de calibración en la cual se obtuvo el tiempo de 15.04 min (Figura 7). En la muestra de nanopartículas se pudieron observar los picos con un tiempo de retención de 15.401 ± 0.34 min dando como resultado una concentración de 95.5 ± 26.7 μg de timol por cada mg de NP's.

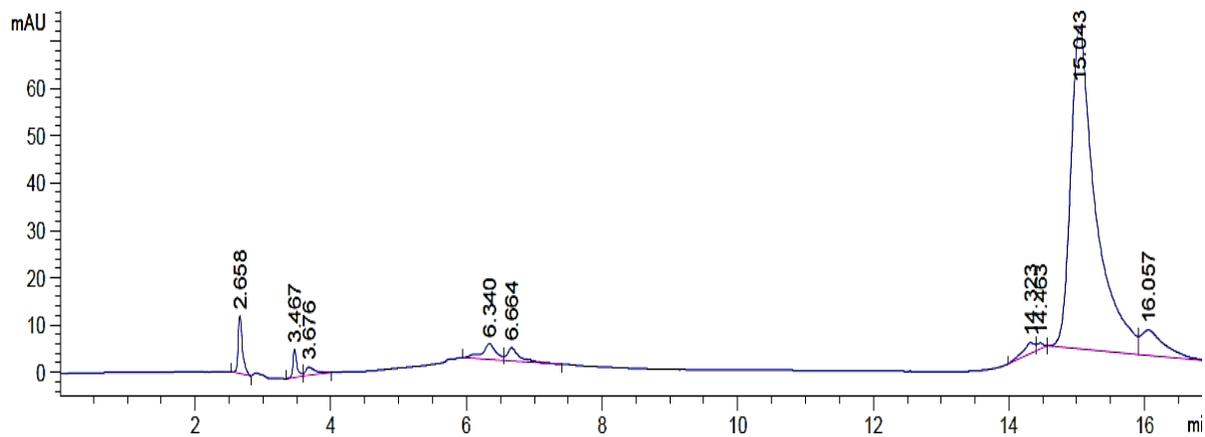


Figura 7. Cromatograma del timol en HPLC.

6.1.3. Eficiencia de encapsulación

Para la eficiencia de encapsulación, mediante HPLC, dando un porcentaje de Eficiencia de encapsulación de las NP's cargadas con complejos de inclusión β -CD/timol de $58.34 \pm 6.23\%$, estos resultados son menos comparados con los de Pool et al. (2010) Donde realizaron NP's cargadas con quercetina obteniendo una EE de 67.9% y con catequina de 76%, esto pudo deberse a varios factores, uno de ellos la concentración del timol en los CI, además que los CI β -ciclodextrina7timol tienen propiedades hidrófilas, característica por la cual se pierde una gran parte de estos durante el proceso de elaboración de NP'S.

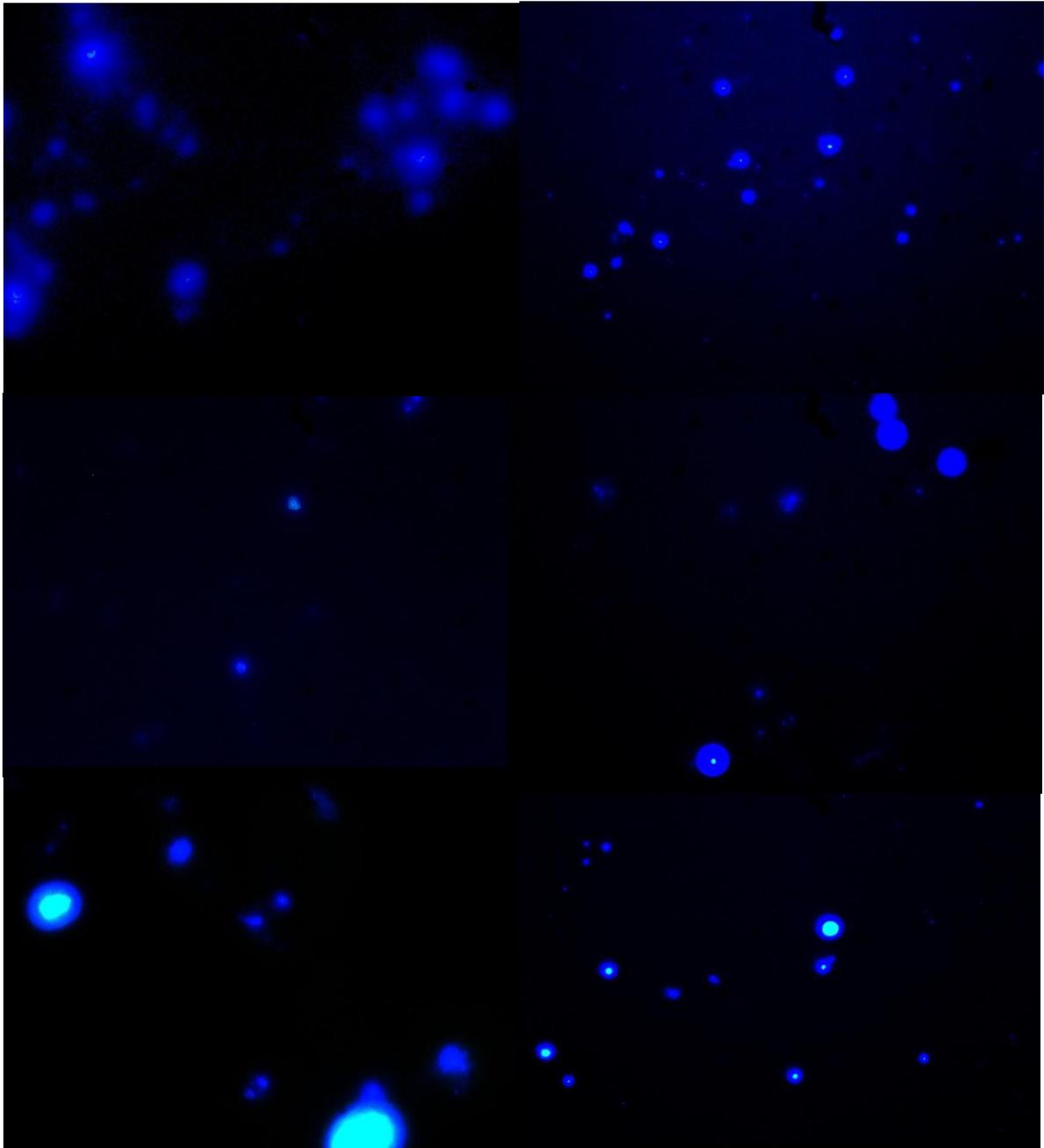


Figura 6. Micrografías de fluorescencia de complejos de inclusión β - CD/ timol incorporadas en Nanopartículas poliméricas.

6.1.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Una de las principales aplicaciones de métodos como DSC es el análisis del estado físico de los sistemas formados; es decir, en qué forma se encuentra disperso un activo dentro de las NP's poliméricas. Esta información es de suma importancia para tener una idea de la estabilidad y del proceso de liberación de los activos encapsulados desde las partículas formadas (Panyam y *col.* 2004; Pinto Reis y *col.* 2006). En la figura 8 se observan los termogramas obtenidos para de β -CD, Eudragit, complejos de inclusión y las nanopartículas poliméricas,

En cuanto a las NP's de Eudragit , se observó que el polímero presentó dos transiciones de fase cerca de los 70° y 190 °C, lo cual según otros autores corresponden a la Tg y a la disociación de los puentes de hidrógeno del polímero resultados cercanos a los reportados por Pool y *col.* (2012)

En las NP's cargadas con complejos de inclusión, el comportamiento térmico sugiere que el activo encuentra disperso en la matriz polimérica en estado amorfo, y el cambio observado en la Tg del polímero, se debe a las interacciones entre polímero y los complejos de inclusión (Joshi y *col.* 2010).

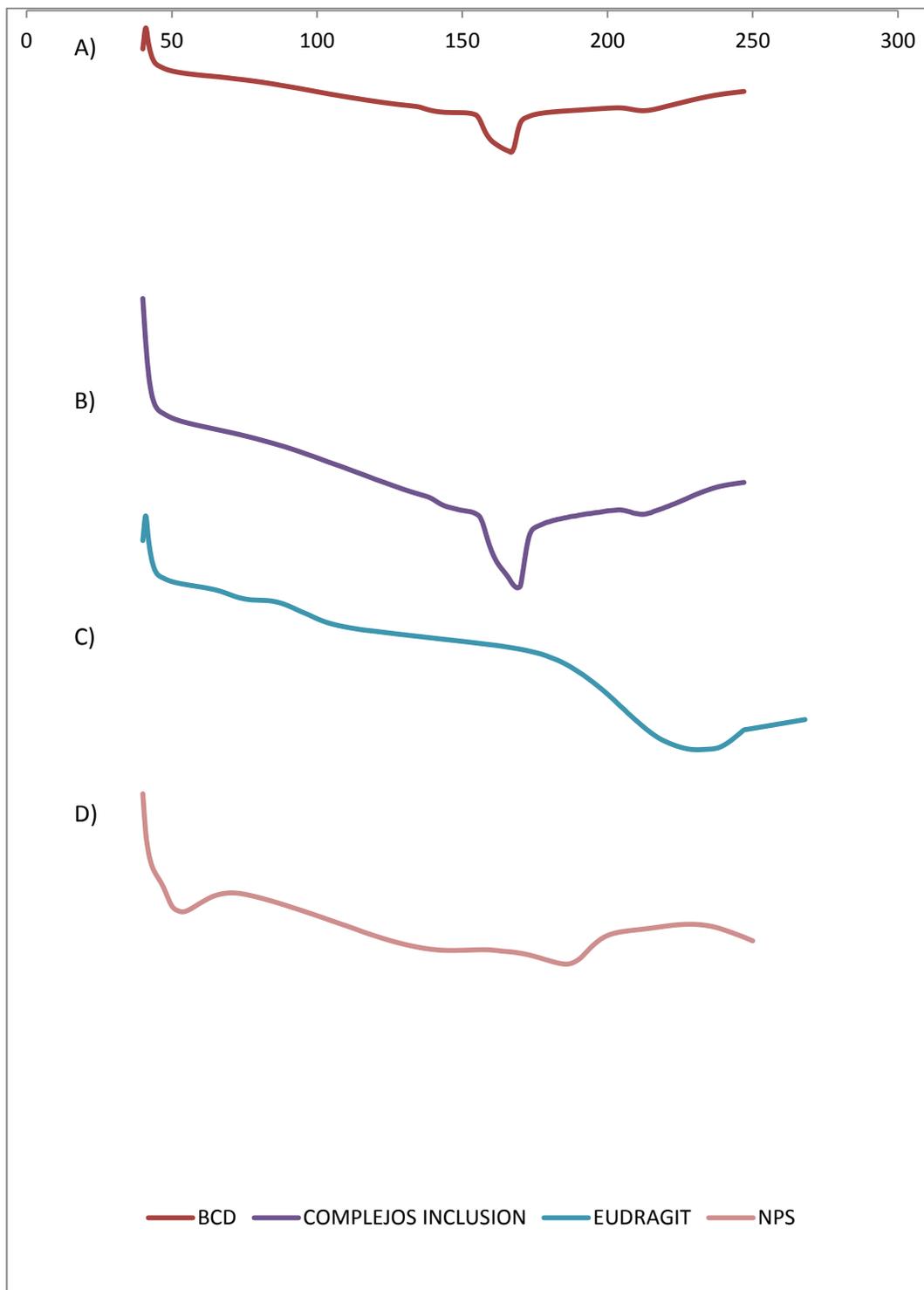


Figura 8. Termogramas de A) β -CD, B) Complejos de inclusión, C) Eudragit D) nanopartículas poliméricas.

6.1.5. Determinación de la cinética de liberación encapsulación en las nanopartículas.

Los resultados de la cinética de liberación del timol se pueden observar en la figura 9 , donde se observó que a pH 2.0 la liberación fue mucho más rápida en las primeras horas en comparación con los pH 4.5 y 7.2 fueron menores, la liberación en pH 2.0 a las 6 Horas su liberación era del 57% aproximadamente, en comparación con los otros pH's donde apenas se llegaba a una liberación no más de 34%, sin embargo en las últimas horas la liberación a los tres diferentes pH's, presentaron prácticamente la misma liberación. Por otro lado se observó que el porcentaje de liberación en las últimas 4 horas la liberación a pH 2 la concentración disminuyó esto se pudo deber a la presencia de un pH ácido y el cual el timol que ya se había liberado se comenzó a degradar.

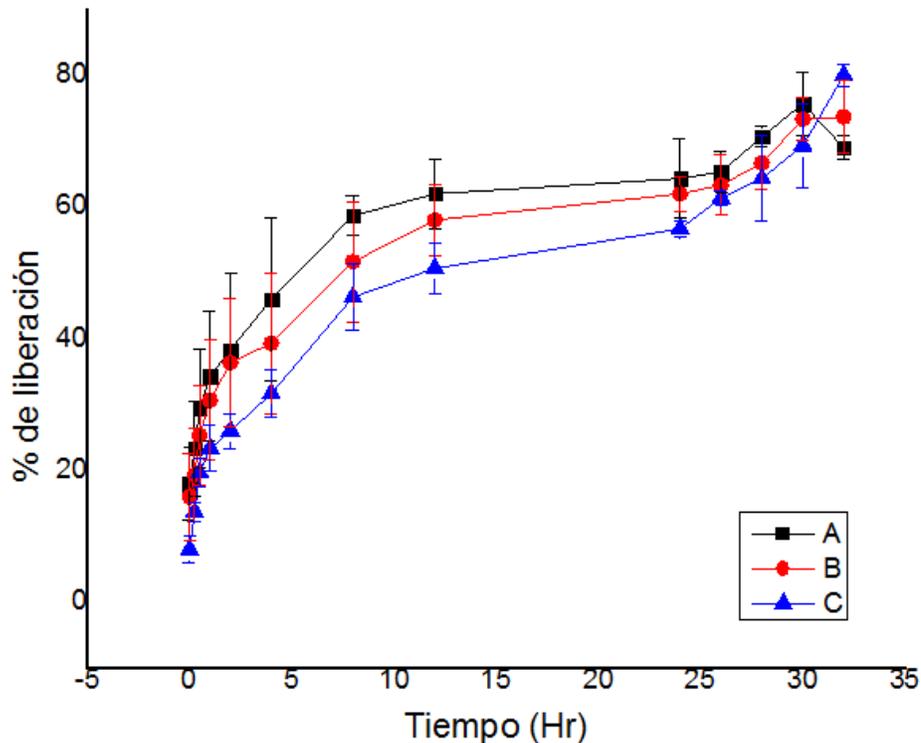


Figura 9. Cinética de liberación de las NP's a diferentes pH's A) 2.0 B) 4.5 C) 7.2.

6.1.6. Espectroscopia de Infrarrojo usando Transformada de Fourier.

Se llevó a cabo la corrida de los materiales de pared (β - CD y Eudragit) y del timol como principio activo, donde se determinó las bandas representativas de cada uno de ellos. Como se puede observar en la figura 8 se encuentra el espectro de timol donde se encuentran las bandas más representativas tales como: banda que se encuentra a 2958 cm^{-1} correspondientes al grupo metilo (CH_3), también se observan bandas correspondientes a un compuesto aromático en 1621.73 cm^{-1} y 1586.06 cm^{-1} . Se puede observar bandas a 804.55 cm^{-1} y 854.29 cm^{-1} corresponde a las triple sustitución del benceno que contiene el timol. También se observa el espectro de la β - Ciclodextrina el cual nos arroja bandas representativas tales como la banda que corresponde al grupo $-\text{OH}$, la cual se encuentra a 3249.99 cm^{-1} y una banda a 1022.29 cm^{-1} correspondiente al enlace C-O-C. En seguida se encuentra el espectro del Eudragit, el cual muestra bandas como la que se encuentra a 1697.95 cm^{-1} que corresponde al grupo carbonilo, también se observa una banda a 2986 cm^{-1} la cual predice la presencia de CH_3 en la estructura, más adelante se puede observar un ligero levantamiento de banda en 3100 cm^{-1} correspondiente al grupo hidroxilo y también presenta una banda huella presente en 1163.80 cm^{-1} correspondiente a la unión del enlace C-O-C, estos resultados del Eudragit cuales han sido reportados por otros autores para otros tipos de Eudragit con estructuras químicas similares a Eudragit L30-D55 (Eerikainen et al. 2004).

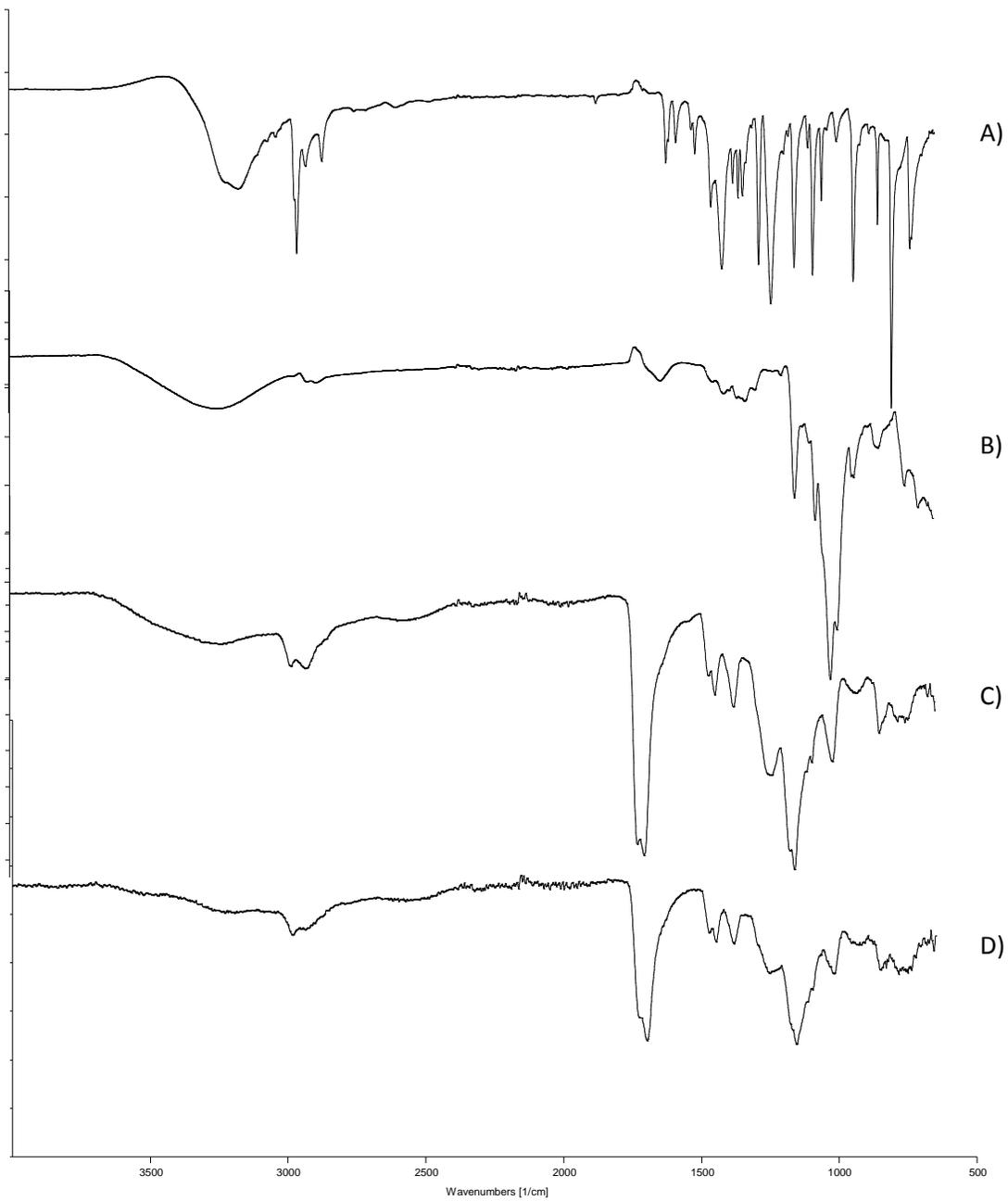


Figura 8. Espectros FTIR correspondiente al A) timol B) β -Ciclodextrina. C) Eudragit B) nanocápsulas poliméricas de Eudragit/ β -CD/ Timol.

Después se colocaron las muestras de los complejos de inclusión β -CD/timol y la doble encapsulación en nanopartículas poliméricas. Se llevó a cabo la comparación con el espectro del timol con los espectros de los complejos de inclusión y las nanopartículas poliméricas. En el espectro FTIR de los complejos de inclusión (figura 11) se ve la disminución de la intensidad los espectros correspondientes a las sustituciones de la estructura del benceno, también se observa la desaparición de las bandas del grupo aromático que se encontraban entre 1621.73 cm^{-1} y 1586.06 cm^{-1} . Aumenta la intensidad de la banda 3209 cm^{-1} que corresponde al grupo hidroxilo de la β -CD, también se puede observar la presencia de la banda 1023.16 cm^{-1} correspondiente al enlace C-O-C. Estos resultados son similares a los realizados por *Chai et al.* (2011), donde realizaron la encapsulación de timol en ciclodextrinas a diferentes concentraciones. En seguida en el espectro de las nanopartículas poliméricas (figura 10) se puede observar la eliminación de las principales bandas características del timol y de las bandas correspondientes a la de la β -CD, además se pueden observar la presencia de la banda correspondiente al grupo carbonilo que se encuentra a 1702.53 cm^{-1} , también se observa una banda a 2931.04 cm^{-1} que corresponde a los CH_3 presentes en la molécula del Eudragit, otra banda a 3100 cm^{-1} correspondiente al grupo hidroxilo y una banda que se encuentra a 1158.13 cm^{-1} por el enlace C-O-C. En comparación con el espectro del Eudragit puro, se puede concluir que presenta prácticamente las mismas bandas y se han desaparecido las bandas del timol y de la β -CD estos resultados son reflejando también en el trabajo de *Zeng et al*, 2012. De esta manera, las nanocápsulas poliméricas se pueden demostrar mediante el estudio de la modificación de la forma de pico, la posición y la intensidad como se puede observar en la figura 12 donde se realiza la comparación del Eudragit y las NP's cargadas con complejos de inclusión.

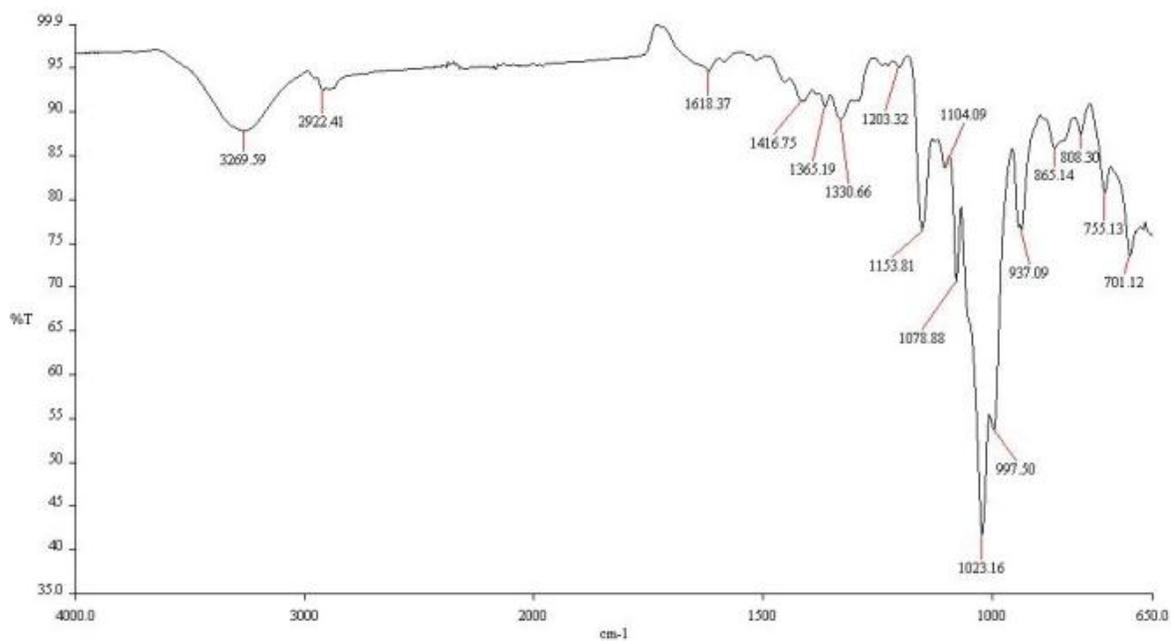


Figura 11. Espectro FTIR de complejos de inclusión β -CD/Timol.

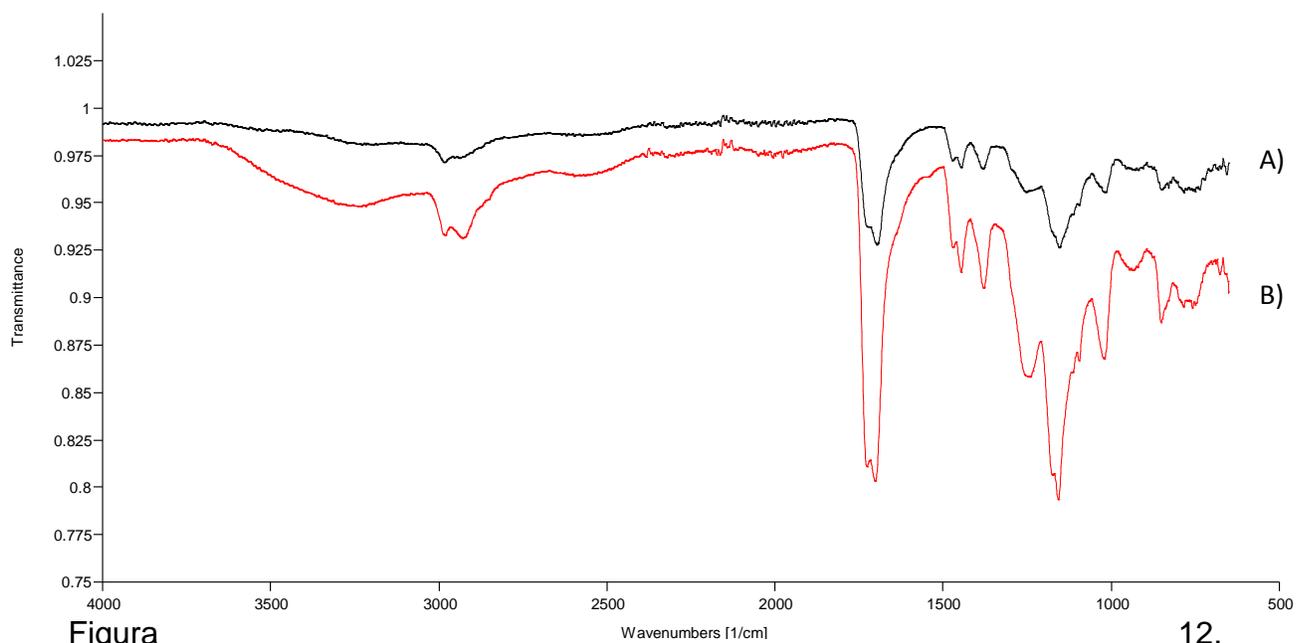


Figura 12. Comparación de espectro FTIR de Eudragit (A) y nanopartículas (B).

6.2. Capacidad antioxidante.

6.2.1. Método ABTS

En la figura 13 se observa la evaluación de la capacidad antioxidante de la doble encapsulación por el método ABTS. Se observa que la capacidad antioxidante está en función del pH, donde a pH 4.5 y 2.0, en el minuto 10 se observó un mayor aumento en su capacidad antioxidante en comparación con la técnica convencional de ABTS y el pH 7.2. Se realizó la comparación con la cinética convencional. Al minuto 60 el aumento de la capacidad antioxidante llegó a 392.3 ± 42.5 μmol equivalente de trolox / mg, dando una capacidad antioxidante menor comparando con resultados de Colchado (2014), donde obtiene hasta 604.5 μmol equivalente de trolox / mg, sin embargo lo realiza con aceite esencial.

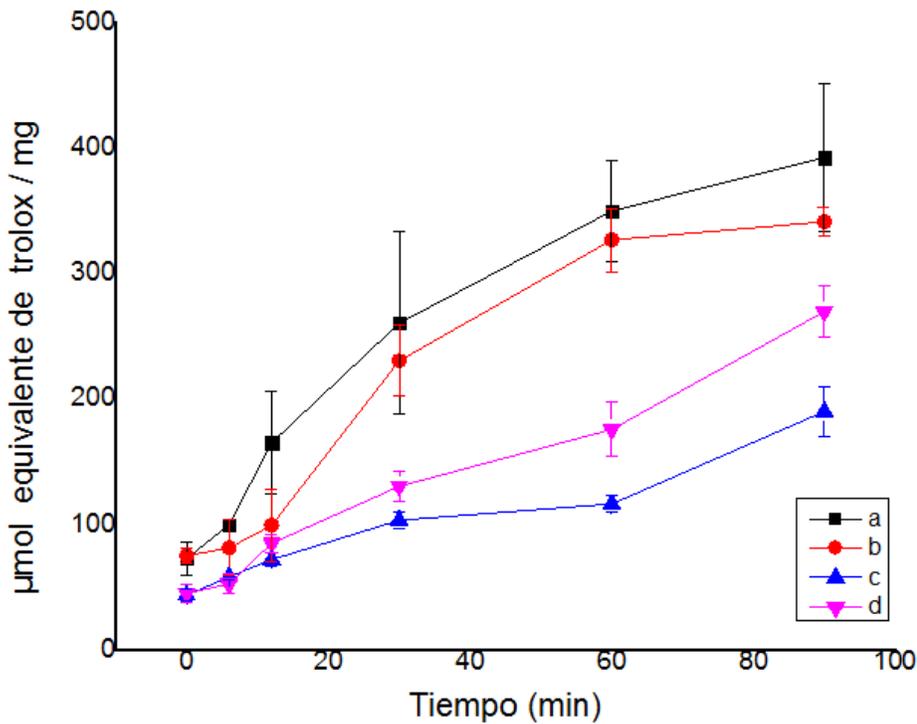


Figura 13. Cinética de capacidad antioxidante a diferentes pH's. a) 2.0 b) 4.5 c) 7.2 d) Método convencional ABTS.

7. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la obtención de NP's cargadas con complejos de inclusión β -CD /timol. Se demostró que las nanopartículas poliméricas desarrolladas resultaron ser exitosas, ya que se obtuvo un sistema de protección mejorado para el timol en condiciones que simulan pH gastrointestinal (2.0, 4.5 y 7.2) incrementando así su accesibilidad en el sistema digestivo.

El timol conservó su actividad antioxidante, después de ser encapsulado en complejos de inclusión incorporados en nanopartículas poliméricas. Los resultados sugieren que estos sistemas de liberación controlada pueden ser adecuados para la encapsulación de compuestos bioactivos dentro de productos alimentarios o farmacéuticos y para su liberación en el intestino delgado donde pueden ser absorbidos.

8. REFERENCIAS

- Abarca R.**, Rodríguez F, Abel Guarda A, Galotto M, Bruna J. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **2015**: 23; 10-39.
- Astray G**, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto, J.C, Rial-Otero R, Simal-Gándara J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*. **2009**: 23; 1631-1640.
- Atwood J. L**, Davies J. D, Macnicol D. D, Vögtle F. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*. Pergamon, Oxford. **2006**: 2; 1-11.
- Aydin S**, Basara A, Basaran N. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutat Reserch. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **2005**: 581; 43-53.
- Beena, D. K.**, Rawat, D. S. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2013**: 23; 641-645.
- Bei D**, Meng J, Youan B. B. C. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2010**: 9; 1385-1399.
- Brewer M. S.** Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2011**: 10; 221-247.
- Bruneton J**, *Farmacognosia, fitoquímica de plantas medicinales*, 2da edición, editorial ACRIBIA, S.A., **2008**: 239- 250
- Chai X**, Lin R, Wu K, Li S. Characterization de β -Cyclodextrin- Thymol Inclusion complexes. *Advanced Materials Research*. **2011**: 23, 1766-1773.
- Choi M. J**, Ruktanonchai U, Soottitantawat A, Min S. Morphological characterization of encapsulated fish oil with β -Cyclodextrin and polycaprolactone. *Food Reserch International*. **2009**: 49; 989-997.

- Couvreur P**, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. **2002**: 2; 99-134.
- De Vicenzi M**, Stamatii A., De Vicenzi A, Silano M. Constituents of aromatic plants: carvacrol and thymol. *Fitoterapia*. **2004**: 75; 801-804.
- Del Valle E. M.** Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. **2003**: 9; 1033-1046.
- De Oliveira H**, Tavares G, Nogueiras C, Rieumont J, Physico-chemical analysis of metronidazole encapsulation processes in Eudragit copolymers and their blending with amphiphilic block copolymers. *International Journal of Pharmaceutics*. **2009**: 380; 55-61.
- Duchene D.** Cyclodextrins and their inclusion complexes, in: Bilensoy, E. *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine. Current and Future Industrial Applications*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey. **2011**.
- Eerikäinen H.**, Peltonen L., Raula J., Hirvonen J., and Kauppinen E. Nanoparticles containing ketoprofen and acrylic polymers prepared by an aerosol flow reactor method. *AAPS PharmSciTech* **2004**: 4; 129-137.
- Ge B**, Bodeis S, Walker R.D, White D.G, Zhao S, McDermott P.F, Meng, J. Comparison of the Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2002**: 50; 487–494.
- He J**, Zhong C, Mi J. Modeling of drug release from bioerodible polymer matrices. *Drug Delivery*. **2005**: 12; 252-259.
- Higashi K**, Hayashi H, Yamamoto K, Moribe K. The effect of drug and EUDRAGIT® S 100 miscibility in solid dispersions on the drug and polymer dissolution rate. *International Journal of Pharmaceutics*. **2015**: 494; 9-1.
- Kalemba D**, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. **2003**: 10; 813-829.
- Koontz J**, Marcy J, O’Keefe S, Duncan S. Cyclodextrin Inclusion Complex Formation and Solid-State Characterization of the Natural Antioxidants α -

- Tocopherol and quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**: 57; 1162-1171.
- Lao, L. L.**, Peppas, N. A., Boey F. Y. C., Venkatraman S.S. 2011. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. **2011**: 1; 28-41.
- Letchford K**, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **2007**: 33-42.
- Lira de Sa Barreto, L. C.** Utilidad de algunos copolímeros acrílicos para el control de liberación de fármacos en pelets matriciales elaborados por extrusión-esferonización. Facultad de farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Servicios publicados e Intercambio científico. **2009**: 5-9.
- Liu H**, Cai X, Wang Y, Chen, J. Adsorption mechanism-based screening of cyclodextrin polymers for adsorption and separation of pesticides from water. *Water Research*. **2011**: 45; 3499-3511.
- Locci E**, Lai S, Piras A, Marongiu B, Lai A. ¹³C-CPMAS and ¹H-NMR study of the inclusion complexes of beta-cyclodextrin with carvacrol, thymol, and eugenol prepared in supercritical carbon dioxide. *Chemistry & Biodiversity*. **2004**: 1; 1354-1366.
- Loftsson T**, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *International journal of pharmaceutics*. **2007**: 329; 1-11.
- Mourtzinis I**, Kalogeropoulos N, Papadakis S. E, Konstantinou K, Karathanos V. T. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in β - Cyclodextrin and Modified Starch *Journal of Food Science*. **2008**: 73; 1750-1841.
- Mura P**. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*. **2014**: 101; 238-250.
- Nenadis N**, Wang L. F, Tsimidou M, Zhang H. Y. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS++ Assay. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **2004**: 52; 4669-4674.

- Pastor M**, Esquisabel A, Talavera A, Año G, Fernandez S, Cedrec B, Infante J, Calificó A, Pedraz J.L. An approach to a cold chain free oral cholera vaccine: in vitro and in vivo characterization of *Vibrio cholerae* gastro-resistant microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. **2013**: 448; 247-258.
- Ponce** Cevallos P, Buera M., Elizalde B. 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*. **2010**: 99; 70-75.
- Pool H**. Quintanar D, Figueroa J, Bechara J. E. H., McClemente D. J., Mendoza S. 2012. Polymeric Nanoparticles as Oral Delivery Systems for Encapsulation and Release of Polyphenolic Compounds: Impact on Quercetin Antioxidant Activity and Bioaccessibility *Food Biophysics*. **2012**: 7; 276-288.
- Polyakov N. E**, Stajanovic G. S, Radulovic N. S. Encapsulation of cinnamon oil in β -cyclodextrin. *Journal of Medicinal Plants Research*. **2010**: 14; 1382-1390.
- Rajkovic A.**, Uyttendaele M, Courtens T, Debevere J, 2005. Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. *Food Microbiology*. **2005**: 22; 189–197.
- Santos E**, Kamimura J, Hill L, Gomes C. Characterization of carvacrol β -cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *Food Science and Technology*. **2015**: 60; 583-592.
- Silva F**, Guimaraes A, Silva E, Sousa-Neto B, Machado F, Quintans-Junior L. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *Journal of Medicinal Food*. **2012**: 15; 984-991.
- Singh M**, Sharma R, Banerjee U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*. **2002**: 20; 341–359.
- Singh R**, Bharti N, Madan J, Hireman S. N. Characterization of Cyclodextrin inclusion Complexes: A Review. *Journal of Pharmaceutics Science Technology*. **2010**: 3; 171-183.
- Szente L**, Szejtli J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*. **2004**: 15; 137–142.

- Szetjli J.** Introduction and general Overview of Cyclodextrin Chemistry. Chemical Review. **1998**: 98; 1743-1753.
- Waleczeka K.J,** Marques H.M.C, Hempelc B, Schmidt P.C. Phase solubility studies of pure (-) bisabolol and camomile essential oil with b-cyclodextrin. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. **2003**: 55; 247-251.
- Wandrey C,** Bartkowlak A, Sthepen E, Harding E. Materials for encapsulation. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. **2010**: 3; 31-100.
- Wu Y,** Lou Y, Wang Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid dispersion method. Food Science and Technology. **2012**: 48; 283-290.
- Zeng Z,** Fang Y, Ji H. Side chan influencing the interaction between cyclodextrin and vainillin. Flavour and fragrance Journal. **2012**: 27; 378-385.