



Informe de Seguimiento técnico N° 4

Agregación de valor al aceite esencial, obtenido a partir de residuos madereros del Ciprés de las Guaitecas, aprovechando su potencial antimicrobiano en aplicaciones del área dental y cosmética

PYT-2017-0853

Período comprendido desde el 01-10-2020 hasta el 15-01-2021

Fecha Entrega 15-01-2021

Instrucciones:

- La información presentada en el informe técnico debe estar directamente vinculada a la información presentada en el informe financiero, y ser totalmente consistente con ella.
- El informe debe incluir en los Anexo los cuadros, gráficos, fotografías y diapositivas, publicaciones, material de difusión, material audiovisual y otros materiales que apoyen o complementen la información y análisis presentados en el texto central.
- Todas las secciones del informe deben ser contestadas.
- Evite repetir información en las distintas secciones
- Utilice caracteres tipo Arial, tamaño 11, y utilice los espacios asignados para ello.
- Los informes deben ser presentados en versión digital y en papel (dos copias), en la fecha indicada como plazo de entrega en el contrato firmado con el postulante y/o Entidad Responsable.
- FIA se preocupa por el medio ambiente, si le es posible, por favor imprima a doble cara.

Contenido

Contenido

1. Antecedentes
2. Costos
3. Resumen del Período
4. Objetivos Específicos
5. Resultados
6. Actividades
7. Hitos Críticos
8. Cambios en el entorno
9. Difusión
10. Auto Evaluación
11. Conclusión
12. Anexos.....

1. Antecedentes

1.1. Antecedentes Generales:

Nombre Ejecutor:	Universidad de Chile
Nombre(s) Asociado(s):	N-Active EIRL; Roberto Figueroa Velásquez
Coordinador del Proyecto:	René Julio Carmona Cerda
Regiones de ejecución:	Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo
Fecha de inicio iniciativa:	01/10/18
Fecha término Iniciativa:	30/09/20
Tipo Convenio FIA:	Fondo de Innovación para la Competitividad Regional Gobierno Regional de Aysén
Objetivo General:	Obtención de aceite esencial de ciprés de las Guaitecas a partir de descartes madereros y su aplicación en un gel cosmético y odontológico, útil para el acné y la enfermedad periodontal

2. Costos

2.1. Costo general:

Costo total de la Iniciativa	
Aporte FIA	
Aporte Contraparte	

2.2. Ejecución presupuestaria a la fecha:

Acumulados a la Fecha	
Aportes FIA	Suma cuotas programadas
	Suma cuotas pagadas
	Suma gasto programado
	Suma gasto real
Aportes Contraparte	Gasto programado
	Gasto real
	Gasto pecuniario programado
	Gasto pecuniario real

3. Resumen del Período

3.1. Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos en el período. Entregar valores cuantitativos y cualitativos. Explicar cuáles son las posibilidades de alcanzar el objetivo general y de desarrollar el negocio propuesto. Cada resumen debe contener información nueva, sin repetir lo mencionado en el resumen de informes anteriores. (Máx. 300 palabras)

En este período se trabaja en el OE3, los objetivos OE1 y OE2 ya fueron cumplidos. El OE3 tiene por objeto encapsular el aceite en una matriz hidrofílica y otra liposoluble, evaluando el producto disperso en un gel, evaluándolo contra patógenos del Acné y de la enfermedad periodontal. Las actividades asociadas a este período deben realizarse entre octubre 2020 y febrero 2021. Durante el período que se informa se realizaron las siguientes actividades: a) fabricar y caracterizar nanosuspensiones de quitosano-tripolifosfato (hidrofílico) y nanoemulsiones (hidrofóbicas) cargadas con muestras de aceite de ciprés; desarrollar y validar la metodología analítica mediante HPLC-DAD, para determinar los parámetros de encapsulación del aceite; c) cultivar bacterias relevantes de la enfermedad del acné y enfermedad periodontal; d) determinar la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de las muestras de aceite. Queda pendiente, a la fecha de este informe las siguientes actividades: a) seleccionar la mejor formulación de cada sistema (hidrofílico/hidrofóbico) para fabricar los geles ; evaluar el perfil de liberación del aceite desde los geles, en medios biorelevantes, y c) determinar la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de los geles.

4. Objetivos Específicos (OE)

4.1. Porcentaje de Avance:

Nº OE	Descripción OE	% de avance
1	Obtener un catastro en la región de Aysén de la biomasa residual disponible y potencial del ciprés de las Guaitecas en los lugares actuales de extracción, de donde se obtendrán muestras de madera muerta y residuos madereros para extracción de aceite, y verificar la existencia de biomasa para la sustentabilidad del proyecto.	100
2	Extracción por hidrodestilación, fluidos supercríticos y caracterización del aceite de ciprés de las Guaitecas por áreas de producción.	100

3	Encapsular el aceite en una matriz hidrofílica y otra liposoluble, evaluando el producto disperso en un gel, evaluándolo contra patógenos del Acné y de la enfermedad periodontal.	80
4	Desarrollar una estrategia de protección de la propiedad intelectual, de registro sanitario, plan de negocios, estudio de mercado y evaluación económica del proyecto para los geles desarrollados.	0
5	Difusión y transferencia de resultados.	0

4.2. Descripción de estado de avance del período (Máx. 70 palabras por objetivo)

Nº OE	Descripción del Avance del Período
1	Este objetivo está completo en su totalidad y el detalle de los resultados e indicadores se encuentra en el Informe del Catastro de existencias de Bosque quemado entregado a FIA con anterioridad.
2	OE cumplido extracción de aceite por áreas de de producción, mediante hidrodestilación y fluido supercrítico. Completa caracterización de los componentes del aceite mediante CG/MS.
3	Fabricación y caracterización de nanosuspensiones y nanoemulsiones cargadas con aceite. Desarrollo y validación de metodología para determinar parámetros de encapsulación. Cultivo de bacterias relevantes del acné y enfermedad periodontal. Determinación de concentración inhibitoria mínima y bactericida mínima de aceite, nanoemulsiones, y geles. Selección de formulación en gel e inicio estudio de estabilidad acelerado mes 1 de 3.
4	Sin avance en el período informado. Aunque el inicio de acciones para su realización está contemplado para el mes de marzo.
5	Sin avance en el período. No aplica, ya que la Difusión se realizará una vez que se completen los estudios técnicos y asegurada la propiedad intelectual.

5. Resultados Específicos (RE)

Nº O E	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)			Valor Actual	
			Indicador (cuantificable)	Línea base (situación sin proyecto)	Meta proyecto	Resultado	% Avance
1	1	Catastro con las superficies de bosque quemado de ciprés en las áreas actualmente intervenidas	Hectáreas con árboles muertos por incendios	No hay información	Superficie (has) estimadas con biomasa disponible	Obtención de superficies con presencia de bosque quemado. En la Provincia Capitán Prat. 2 sectores (predios) muestreados 80 ha	100
	2	Valor de biomasa total existente en las superficies con árboles muertos.	Precio de la pulgada	Sin Información	Valoración en \$ De la biomasa disponible	\$ 10.000 precio de la pulgada en trozos \$ 4.000 el saco de leña	100
	3	Catastro de aserraderos y otras unidades que procesen madera de ciprés de las Guaitecas en las áreas actualmente intervenidas de la región.	Número y tipo de unidad de transformación	Un aserradero y varios productores de postes y estacas	Registro actualizado de productores de madera	Un aserradero Producción variable. 0 – 2000 pulgadas/año	100
	4	Planilla ad-hoc con tipos de residuos, valores de volúmenes procesados, y rendimiento de cada aserradero	Informe con los resultados	Sólo los tipos de residuos	Volúmenes por tipo de residuos	Lampazos y cantoneras 40%; aserrín 18%	100
	5	Muestras de árboles muertos obtenidas	Masa de materia prima	150 Kg	150 Kg	25 Kg	100
	6	Muestras de residuos del	Volumen de materia prima	5 (Lts)	1000 Lts/mes	5	100

		procesamiento maderero obtenidas					
		Productor local capacitado en el uso de destilador	volumen de aceite obtenido	0,1 Lt/mes	2 Lts/mes	Instalado y funcionando correctamente el destilador de mayor capacidad	100
2	1	Obtener satisfactoriamente 20 mL de aceite esencial de ciprés de las Guaitecas a partir de madera muerta y residuos, obtenido por hidrodestilación, a nivel laboratorio	Volumen de aceite obtenido a nivel de laboratorio	0 mL	Mínimo 20 mL aceite obtenido de madera muerta y Mínimo 20 mL aceite obtenido de residuos	Informado anteriormente	100
	2	Obtener satisfactoriamente 10 mL de aceite esencial de ciprés de las Guaitecas a partir de madera muerta y residuos, obtenido por extracción con CO2 supercrítica	Volumen de aceite obtenido a nivel de laboratorio	0 mL	Mínimo 10 mL aceite obtenido de madera muerta y Mínimo 10 mL aceite obtenido de residuos	Ver Anexo 1. Entregado en Informe de seguimiento respectivo	100
	3	Aceite esencial de ciprés de las Guaitecas obtenido por hidrodestilación (madera muerta y residuos) caracterizado por GC-MS	Ficha técnica con composición de aceite	Información teórica Sin información ocupando el destilador utilizado	Composición y cuantificación de componentes	Ver Anexo 2. Entregado en Informe de seguimiento respectivo	100

	4	Aceite esencial de ciprés de las Guaitecas obtenido por extracción con CO2 supercrítica (madera muerta y residuos) caracterizado por GC-MS	Ficha técnica con composición de aceite	Sin información ocupando CO2 supercrítico	Composición y cuantificación de componentes	Ver Anexo 2	100
3	1	Formación de nanosuspensiones de quitosano-tripolifosfato por gelificación iónica, estable (nQTPP)	Tamaño de partícula PDI (índice de polidispersidad) Potencial zeta Capacidad de carga Eficiencia de encapsulación Rendimiento en partícula	Sin valores empírico	Tamaño de partícula de alrededor de 300 nm PDI (índice de polidispersidad) entre 0,4-0,6 Potencial zeta de 30-50 mV Capacidad de carga mayor al 5% Eficiencia de encapsulación mayor al 50% Rendimiento en partícula mayor a 30%	Tamaño de partícula en el rango de 130- 220 nm, PDI en el rango de 0,50 a 0,70, y un potencial zeta positivo en el rango de +51 a +57 mV. Eficiencia de encapsulación del 64%	100
	2	Formación de una nanoemulsión por método de emulsificación espontánea (nEBE), estable	Tamaño de partícula PDI (índice de polidispersidad) Capacidad de carga Eficiencia de encapsulación Rendimiento en partícula	Sin valores empírico	Tamaño de partícula de menor a 300 nm PDI (índice de polidispersidad) entre 0,1-0,3 Capacidad de carga mayor al 5%	Tamaño de partícula en el rango de 40 a 60 nm, PDI en el rango de 0,16 a 0,27, y un potencial zeta negativo en el rango de -17 a -12 mV.	100

					Eficiencia de encapsulación mayor al 50% Rendimiento en partícula mayor a 30%		
	3	Concentración del producto capaz de inhibir la proliferación bacteriana de agentes etiológicos asociados al acné, obtenida	Zona de inhibición del crecimiento. Concentración mínima inhibitoria Concentración mínima bactericida	Sin información	Obtención de un producto con actividad antimicrobiana	CIM formula seleccionada gel 0.4 QTPP Propionibacterium acnes 11,5 mg/ml Staphylococcus aureus 11,0 mg/ml Zona de inhibición Propionibacterium acnes 6,23 mm Staphylococcus aureus 4,23 mm	100
	4	Alta Actividad bactericida de los geles	eficiencia antimicrobiana del producto (%)	Sin información	Cantidad de producto capaz de matar el 99, 9% de la carga bacteriana asociada al acné	CBM formula seleccionada gel 0.4 QTPP Propionibacterium acnes 35,0 mg/ml Staphylococcus aureus 30,0 mg/ml	100
	5	Ensayos de liberación de aceite desde nanosuspensiones y nano emulsiones	Perfil de liberación controlado de principales sesquiterpenos presentes en aceite de CgD desde el gel	Sin información	>90% liberado al cabo de 8 horas <50% al cabo de 1 hora	pendiente	0
	6	Concentración del producto capaz de inhibir la proliferación bacteriana de agentes etiológicos asociados	Zona de inhibición del crecimiento. Concentración mínima inhibitoria Concentración mínima bactericida	Sin información	Obtención de un producto con actividad antimicrobiana	CIM formula seleccionada gel 0.4 QTPP Porphyromonas gingivalis 10,0 mg/ml Streptococcus gordonii 10,5 mg/ml Streptococcus sanguinis 10,5 mg/ml	100

		la enfermedad periodontal				Agregatibacter actinomycetemcomitans 10,5 mg/ml	
	7	Alta Actividad bactericida de los geles	eficiencia antimicrobiana del producto (%)	Sin información	Cantidad de producto capaz de matar el 99,9% de la carga bacteriana asociada al acné	CBM formula seleccionada gel 0.4 QTPP Porphyromonas gingivalis 25,5 mg/ml Streptococcus gordonii 25,0 mg/ml Streptococcus sanguinis 20,0 mg/ml Agregatibacter actinomycetemcomitans 30,0 mg/ml	100

5.1. Cuantificación del avance: (Cuantifique el avance para todos los resultados esperados)

5.2. Descripción del avance del período (describa sólo aquellos que han tenido actividad durante el período)

Nº RE	Descripción Avance	Problemas y Desviaciones	Repercusiones	Acciones Correctivas
1	Formación de nanosuspensiones de quitosano-tripolifosfato por gelificación iónica, estable (nQTPP)	Se ensayan cinco niveles de carga de aceite de 0,1 a 0,5 ml de aceite/100 ml sol quitosano. Se prueban tres relaciones Quitosano/Tween 1/1, 1/5,	Fórmula seleccionada se desafía frente a patógenos del acné (2) y periodontal (3).	

		1/10. Se selecciona 0,4 y 1,5		
2	Formación de una nanoemulsión por método de emulsificación espontánea (nEBE), estable	La fórmula desarrollada cumple con los parámetros de encapsulación y especificaciones nano.	Fórmula seleccionada se desafía frente a patógenos del acné (2) y periodontal (3).	
3	Determina CIM de gel de nQTPP frente a patógenos del acné Determina CIM nEBE frente a patógenos del acné	CIM Propionibacterium acnes 11,5 mg/ml CIM Staphylococcus aureus 11,0 mg/ml CIM Propionibacterium acnes 220 mg/ml CIM Staphylococcus aureus 100 mg/ml	Fórmula nQTPP adecuada porque CIM de gel menor que el aceite. Fórmula nEBE no apta porque CIM de nEBE mayor que el aceite.	Fórmula gel de nQTPP seleccionada Reformular nEBE
4	Determina CBM de gel de nQTPP frente a patógenos del acné Determina CBM nEBE frente a patógenos del acné	Propionibacterium acnes 35,0 mg/ml Staphylococcus aureus 30,0 mg/ml CBM Propionibacterium acnes no se evidencia una concentración capaz de ejercer un efecto bactericida. CBM Staphylococcus aureus no se evidencia una concentración capaz de ejercer un efecto bactericida.	Fórmula nQTPP adecuada porque CIM de gel menor que el aceite. Fórmula nEBE no apta para preparar gel porque no se evidencia una concentración capaz de ejercer un efecto bactericida.	Fórmula gel de nQTPP seleccionada Reformular nEBE

	Determina CBM nEBE frente a patógenos de enfermedad periodontal	30,0 mg/ml Porphyromonas gingivalis Streptococcus gordonii Streptococcus sanguinis Aggregatibacter actinomycetemcomitans No se evidencia una concentración capaz de ejercer un efecto bactericida.	Fórmula nEBE no apta para preparar gel porque CIM de nEBE mayor que el aceite.	Reformular nEBE
--	---	--	--	-----------------

6. Actividades

6.1. Cuantificación del avance. Cuantifique el avance para todos los resultados esperados:

Nº OE	Nº RE	Actividades	Programado		Real		% Avance
			Inicio	Término	Inicio	Término	
3	1	A1_ Fabricación de nanosuspensiones de quitosano-tripolifosfato cargadas con aceite de ciprés. A2_ Desarrollo y validación de metodología analítica para determinación de parámetros de encapsulación	1-10-2020	30-12-2020	1-10-2020	30-03-2021	100
	2	A3_ Fabricación de nanoemulsiones cargadas con aceite de ciprés. Formación de geles a partir de nano sistemas seleccionados	1-11-2020	30-01-2021	1-11-2020	30-03-2021	100
	3	A4_ Cultivo bacterias de acné	1-12-2020	30-01-2021	1-12-2020	30-03-2021	100

		A5_Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de los geles frente a cepas seleccionadas.					
	4	A6_Determinación de la capacidad bactericida de los geles	1-12-2020	30-01-2021	30-01-2021	30-03-2021	100
	5	A7_Ensayos de cinética de liberación de aceite	1-11-2020	30-01-2021	1-02-2021	30-04-2021	0
	6	A8_Cultivo bacterias enfermedad periodontal A9_Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de los geles frente a cepas seleccionadas.	1-12-2020	28-02-2021	1-12-2020	30-03-2021	100
	7	A10_Determinación de la capacidad bactericida de los geles	1-12-2020	30-01-2021	1-02-2021	30-04-2021	100

6.2. Descripción del avance del período (describa sólo aquellos que han tenido actividad durante el período)

Actividad	Descripción Avance	Problemas y Desviaciones	Repercusiones	Acciones Correctivas
A1	Nano suspensiones fabricadas con 3 tipos de muestras de aceite, caracterizado, tamaño hidrodinámico, polidispersidad y potencial zeta	bajo nivel de encapsulación. Resuelto con cambio de surfactante, se pudo aumentar carga de aceite. Obtención de nanosuspensiones dentro de especificaciones		cambio de surfactante de pluronic F127 a Tween 80.
A2	Método HPLC-DAD validado para terpineol	se chequeara el método con humeleno, analito con propiedades más similares a los componentes principales del aceite. Se mejorará el método de extracción de aceite desde nanoemulsión, usando un solvente más apolar.	Desarrollo de metodología analítica fiable de producto terminado	se está cambiando el solvente de acetonitrilo a tetrahidro furano, para mejorar extracción de compuestos de compuestos hidrofóbicos del aceite
A3	Nano emulsiones fabricadas con 3 tipos de muestras de aceite, caracterizado, tamaño hidrodinámico, polidispersidad y potencial zeta	Cumple con especificaciones tamaño, potencial zeta y PDI, y parámetros de encapsulación		

A4	Propionibacterium acnes cultivado	Cumplido		
A5	determinada la concentración inhibitoria mínima para 3 muestras de aceite frente a Propionibacterium acne	cumplido		
A6	determinada la concentración bactericida mínima para 3 muestras de aceite frente a Propionibacterium acne	cumplido		
A7	ensayo de liberación de aceite desde nanosistemas y geles -No realizado	pendiente	atraso cumplimiento RE	Reparación HPLC
A8	Porphyromonas gingivalis y Streptococcus gordonii cultivado	cumplido		
A9	determinada la concentración inhibitoria mínima para 3 muestras de aceite frente a Porphyromonas gingivalis y Streptococcus gordonii	cumplido		
A10	determinada la concentración bactericida mínima para 3 muestras de aceite frente a Porphyromonas gingivalis y	cumplido		

	Streptococcus gordonii			
--	------------------------	--	--	--

7. Hitos Críticos

7.1. Indique el grado de cumplimiento de los hitos críticos fijados:

Nº RE	Hitos críticos	Fecha Programado	% Avance a la fecha	Fecha Real Cumplimiento
1	Encapsular el aceite de ciprés de las Guaitecas mediante nanosuspensión de quitosano-tripolifosfato por gelificación iónica	30-12-2020	100	30-03-2021
2	Preparar una emulsión estable a partir de las nanosuspensiones, y obtener geles de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)	30-01-2021	70	30-05-2021
3-4	Evaluar geles frente a patógenos relacionados al acné	30-01-2021	100	30-03-2021
6-7	Evaluar geles frente a patógenos relacionados a la enfermedad periodontal	01-02-2021	100	30-03-2021

7.2. Describa el grado de cumplimiento y posibles desviaciones (máx. 200 palabras).

El OE3 tiene 7 RE y 10 actividades asociadas, y 4 hitos por cumplir. Es el objetivo específico de mayor demanda de trabajo experimental y que define la viabilidad de los OE 4 y 5 que están asociados al modelo de negocios, propiedad intelectual, registro de un producto cosmético, y la difusión de resultados en la región de Aysen. Lo avanzado hasta ahora muestra que el aceite tiene actividad antibacteriana relevante frente a cepas patógenas de la enfermedad del acné y periodontal, las concentraciones a las cuales son efectivas permite generar un producto nanoencapsulado. Hasta el momento los resultados muestran preliminarmente que la eficiencia de encapsulación del aceite en nanosistemas hidrófilicos (nanosuspensión de quitosano-tripolifosfato) e hidrofóbicos (nanoemulsiones) está cercana o por sobre el 50% y la capacidad de carga es razonable considerando la actividad antimicrobiana del aceite. Se obtuvo una forma definitiva para el gel de nQTPP con mejor desempeño CIM, CBM que el aceite puro. La nanoemulsión presenta un menor desempeño CIM y CBM, por lo que se esta reformulando, se espera tener una mejor formulación de aquí a mayo 2021. Aún persisten problemas analíticos, en método HPLC-DAD que permitan una precisa determinación del contenido de aceite en las nanoemulsiones. Durante el mes de febrero el HPLC tuvo una falla importante, por lo que se solicito presupuesto para su reparación. Se espera que el equipo este operativo en la primera semana de mayo.

8. Cambios en el entorno

8.1. Tecnológico

Se debe analizar la situación de la investigación básica y aplicada, así como los procesos, innovaciones, patentes, royalties o publicaciones de los agentes que intervienen y ofrecen soluciones en el sector en particular, en terceros relacionados y en toda la cadena de valor (Máx. 170 palabras)

Del punto de vista tecnológico, no hay modificaciones respecto del último informe ya que si bien hay bibliografía relacionada a las propiedades y uso de los aceites no hay información de artículos sobre el aceite de ciprés dado que es una especie poco conocida más allá de sus características madereras y tampoco desarrollos similares a los propuestos en ésta investigación (Patentes).

8.2. Mercado

Refiérase a los ámbitos de: oferta y demanda; competidores; nuevas alianzas comerciales; productos diferenciados, sustitutos o alternativos; mercados emergentes; productividad de los recursos humanos; precios de mercado, liderazgo del costo de producción; tipo de cambio, tasa de interés, disponibilidad de materias primas, barreras de entrada al mercado, tratados de libre comercio, subvenciones o apoyo estatal.

La pandemia, además de obligar a suspender las actividades durante el periodo abril - octubre del 2020 (fecha del último Informe Técnico), también ha reducido aún más la actividad de los productores madereros de la región al igual que la escasa demanda por productos madereros en base a ciprés. Cabe además recordar que la materia prima base de este proyecto corresponde a madera residual que no tiene utilidad en la obtención de dichos productos. La aparición de una segunda ola de la pandemia ha agudizado el impacto en la economía global y del país, profundizando los efectos en los precios, tasa de cambio y tasas de interés. Se espera que recién hacia mediados del año 2021 la economía comience una recuperación.

Como ya se señaló en el Informe anterior la actual prolongación de la crisis sanitaria afecta la actividad de Difusión contemplada a Nivel Internacional (presentación en Feria de Productos Naturales) y posiblemente obligue a retrasar la difusión a nivel nacional.

8.3. Otros

Describe cambios en leyes, regulaciones, impuestos, barreras normativas o legales, normas no escritas, normas medio ambientales, responsabilidad social empresarial “dumping” (laboral o ambiental), entre otros.

Como es de conocimiento general en nuestro país, existen regulaciones sanitarias que afectan el tradicional comportamiento de las empresas y personas, las que si bien son temporales, no tienen un plazo definido, afectando el desarrollo de las actividades del proyecto en el mediano plazo.

9. Difusión

9.1. Describa las actividades de difusión programadas para el próximo período.

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Perfil de los participantes	Medio de Invitación
Junio 2021	Coihayque	Seminario	15	Representantes organizaciones públicas regionales	Correo electrónico
Junio 2021	Cochrane	Taller	20	Recolectores de PFNM Representantes de Municipalidades de Cochrane y Tortel	Correo electrónico

9.2. Describa las actividades de difusión realizadas durante el período:

(No aplica por suspensión del proyecto debido a la pandemia)

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes*	Documentación Generada*

*Debe adjuntar en anexos material de difusión generado y listas de participantes

10. Auto Evaluación

10.1. ¿Considera que su proyecto logrará insertar en el mercado el bien o servicio o mejorar la competitividad? Explique (máx. 80 palabras)

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento de la real efectividad antimicrobiana del aceite y el desempeño del mismo al realizar las nanoemulsiones y nanosuspensiones, el proyecto logrará al menos la formulación de un producto factible de insertar en el mercado, una vez que tengamos los resultados de las pruebas de formulaciones más eficaces y de las pruebas de estabilidad de las formulaciones.

10.2. ¿Cómo evalúa los resultados obtenidos en función del objetivo general del proyecto? (máx. 80 palabras)

Los resultados del proyecto indican que existe recurso suficiente para la aplicación propuesta (OE1), el aceite obtenido por hidrodestilación y por CO₂ supercrítico fue completamente caracterizado mediante CG-MS, no encontrándose diferencias significativas en su composición (OE2). El aceite tiene actividad contra cepas de la enfermedad del acné y periodontal y presenta buenos parámetros de encapsulación en sistemas hidrofílicos (QTPP) e hidrofóbicos (nanoemulsión). Ya se dispone de una formulación en gel de nQTPP con mayor actividad que el aceite. Se comenzó un estudio de estabilidad acelerado de tres meses, con este gel, a tres temperaturas (25-30-40°C), se espera finalizarlo a fines del mes de mayo.

10.3. ¿Cómo evalúa el grado de cumplimiento de las actividades programadas? (máx. 80 palabras)

A pesar de los múltiples problemas de continuidad debido a razones ajenas a nuestra voluntad, hemos podido cumplir en un 100% los OE1 y OE2. Del OE3 tenemos un grado de avance del 80%, con un producto seleccionado, con el cual se ha iniciado un estudio de estabilidad. Esperamos resolver el problema de la nanoemulsión para así poder generar dos productos finales. Con los resultados que ya tenemos podemos comenzar a partir de abril el estudio del modelo de negocios, propiedad intelectual y registro cosmético. Esperando concluir el proyecto con la difusión de los resultados en la región de Aysén.

10.4. ¿Cómo ha sido la participación de los asociados? (máx. 80 palabras)

La participación del productor de Aysén ha sido permanente y de mucha colaboración. Y nuestro segundo socio N-Active ha estado interiorizado de los resultados, no obstante su participación está considerada una vez que se tenga la(s) formulación(es) comercial(es), específicamente en la Difusión del(los) producto(s) comerciales.

11. Conclusión

11.1. Concluya y explique la situación actual de la iniciativa, considerando amenazas u oportunidades (máx. 230 palabras).

El cumplimiento del OE1 muestra que existe suficiente recurso maderero disponible para la producción del aceite, el cumplimiento del OE2 permitió la completa identificación de todos los componentes del aceite mediante destilación y fluido supercrítico. Se ha probado la efectividad del aceite frente a patógenos de la enfermedad del acné y periodontal, el aceite presenta buenos parámetros de encapsulación en los dos sistemas propuestos (QTPP y nanoemulsión). Se ha obtenido una formulación en gel de nQTPP que presenta mayor actividad antimicrobiana del aceite, que ya se encuentra en estudio de estabilidad, mes 1 de 3 a tres diferentes temperaturas. A partir de este producto podemos comenzar a partir de abril el OE 4. Es decir el estudio del modelo de negocios, protección intelectual y registro. Con los resultados actualmente disponibles, se puede vislumbrar que el producto es competitivo frente a otros productos actualmente disponibles en el mercado para el tratamiento de las enfermedades señaladas en este estudio.

Persiste la amenaza de la pandemia del corona virus, situación de salud pública aún no resuelta, a pesar de la restricciones de movimiento que la pandemia conlleva hemos podido avanzar en un 80% el OE3, esperamos a la brevedad poder resolver la falla en el equipo HPLC, para completar los estudios de liberación, reformular la nanoemulsión y verificar la metodología HPLC-DAD para el control del producto final. La amenaza más grande es la imposibilidad de poder cumplir con el O5, que está relacionado con la Difusión de los resultados en la Región de Aysén.

12. Anexos

Realice una lista de documentos adjuntados como anexos.

anexo_nanosuspensión Q-TPP

anexo_nanoemulsiones

anexo_método de determinación de aceite de ciprés de las Guaitecas mediante HPLC-DAD

anexo_CIM_CBM

Informe aceite de ciprés de las Guaitecas

Preparado por Alexander Gamboa

Revisado y editado por Cristian Tapia

Código de muestras

M1/ troncos de diámetro pequeño/ (DP); M2/ troncos de diámetro grueso (DG); M3 troncos de árbol vivo (AV); M4/ Terpineol (estándar usado para el método mediante HPLC-DAD).

Desarrollo y validación del método mediante HPLC-DAD

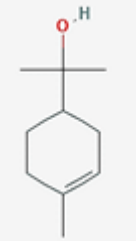
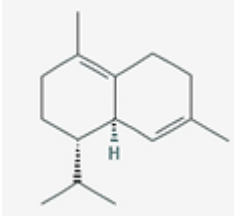
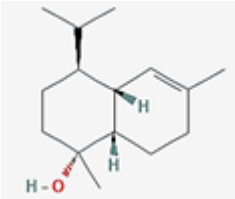
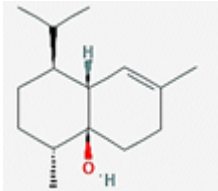
El desarrollo de una formulación en base al aceite esencial (AE) de ciprés de las Guaitecas, conlleva un gran número de análisis de muestras, en la primera fase para evaluar los procedimientos de encapsulación, en la determinación perfil de liberación de los componentes activos, luego el control de calidad del producto terminado y finalmente para el estudio de estabilidad.

En el objetivo específico 2 (Extracción por hidrodestilación, fluidos supercríticos y caracterización del aceite de ciprés de las Guaitecas por áreas de producción), se utilizó la cromatografía de gases acoplada a masa (GC-MS) para caracterizar las moléculas constituyentes del AE de ciprés de las Guaitecas obtenidos mediante hidrodestilación (HD) y extracción con fluido supercrítico (FS).

Sin embargo, esta metodología no es costo-eficiente para cumplir con los resultados y actividades asociados al OE3. Es por ello que se implementó un método de cromatografía líquida de alta eficiencia con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), tomando como referencia lo descrito por Strack y colaboradores, (Strack et al., 1980).

Preliminarmente, se eligió terpineol (mezcla de isómeros con densidad 0.943 g/mL) como modelo de componente del aceite esencial para la implementación de los procedimientos de encapsulación. A pesar de no ser una molécula presente en el extracto, es un alcohol terpénico monocíclico presente en 87 aceites esenciales (de Groot and Schmidt, 2016), está disponible fácilmente de los proveedores y tiene un coeficiente de partición simulado de 1.8 (XLogP3-AA) como se aprecia en la tabla 1. Por su parte, los componentes relevantes del aceite de ciprés: **δ-cadinol, (+)-δ- Epicubenol y (+)-δ-cadineno**, tienen coeficientes de partición entre 3,3 y 3,8, por lo tanto, son moléculas de mayor hidrofobicidad que el terpineol como se ve en la misma tabla.

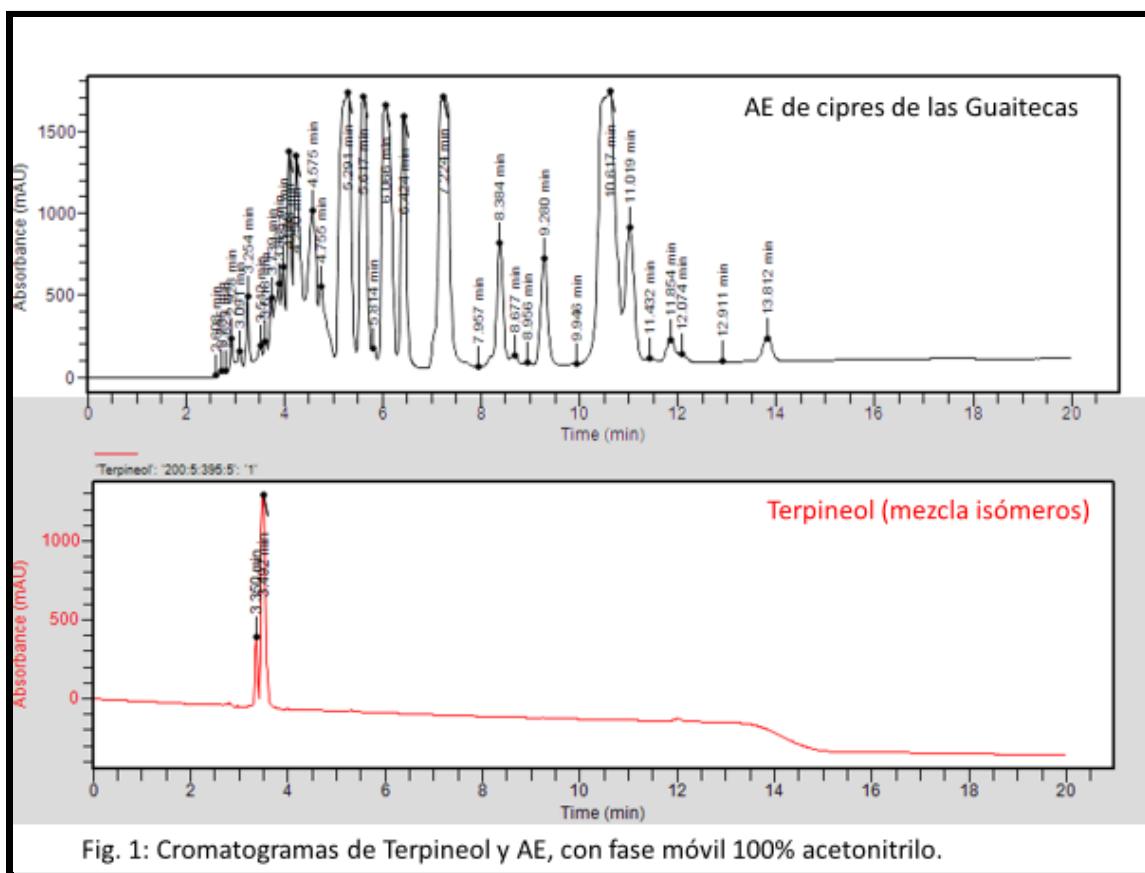
Tabla 1: Estructura de Terpeneol y derivados relevantes identificados en el aceite por GC-MS.

	
Terpeneol (XLogP3-AA = 1.8) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17100	(+)-δ-cadineno (XLogP3-AA = 3.8) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441005
	
δ-cadinol (XLogP3-AA = 3.3) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3084311	Epicubenol (XLogP3-AA = 3.7) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12046149

Esto es relevante, ya que los procedimientos de encapsulación elegidos son idóneos para encapsular compuestos activos hidrofóbicos, es decir, si se logra una carga adecuada para terpeneol (Peor caso), la esperada para el AE es más alta.

De esta manera, se inició el desarrollo del método analítico por HPLC-DAD en fase reversa, donde la fase estacionaria posee similar polaridad que estos analitos, es decir, mientras más hidrófobo es mayor es su retención en la fase estacionaria. La columna elegida fue una octadecilsilano (C18) de 250 mm x 4,6 mm y 5 micrones de tamaño de partícula, en conformidad a lo descrito por Strack y colaboradores (Strack et al., 1980).

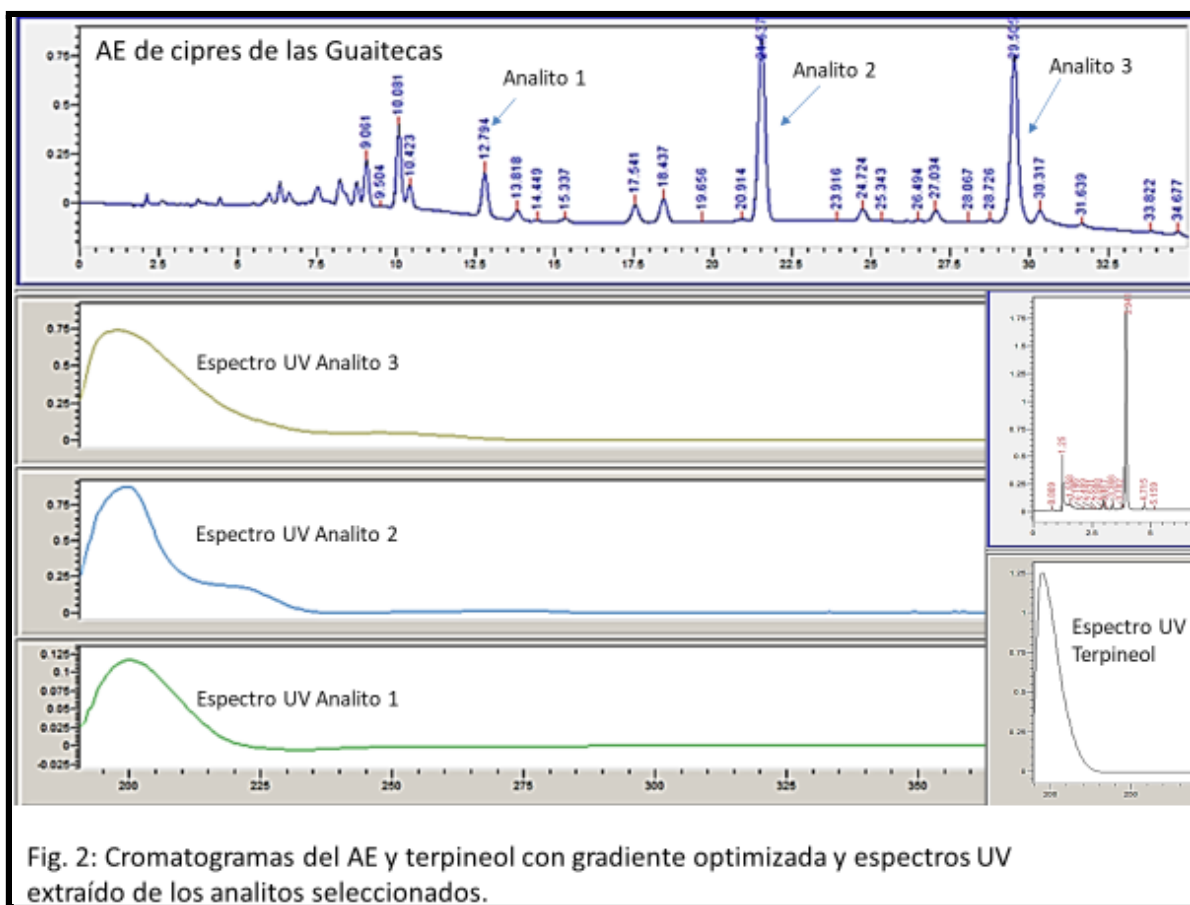
Para el primer ensayo, se eligió una fase móvil de 100% de acetonitrilo, con el objeto de eluir todos los componentes posibles en el AE y compararlos con el tiempo de retención de terpeneol (molécula modelo). La figura 1 muestra los resultados de este análisis preliminar, donde el analito mencionado tiene un tiempo de retención de aproximadamente 3,5 minutos (alfa y gama isómeros) y el último componente que sale de la columna en el AE de ciprés extraído por HD, tiene un tiempo de 13,8 minutos. Esto confirma, que las moléculas presentes en el AE son de alta hidrofobicidad, en conformidad a los coeficientes de partición descritos en la tabla 1 (XLogP3-AA entre 3,3 y 3,8).



A continuación, se procedió a optimizar las condiciones cromatográficas para conseguir una adecuada separación de los componentes, y tener al menos un pico cromatográfico de un analito bien resuelto en un tiempo de corrida aceptable. Después de varios ensayos, se consiguió la gradiente mostrada en la tabla 2, con 35 minutos se obtuvo un cromatograma con tres componentes, bien resuelto, y con la elusión total de los demás analitos (figura 2). De estos, se seleccionó el analito 1 con un tiempo de retención de aproximadamente 12 minutos, debido a su similitud espectral con terpineol (inserto de los espectros ultravioleta de la figura 2), por tener un porcentaje relevante (11.2% referido a Terpineol) y una hidrofobicidad intermedia de acuerdo con el perfil cromatográfico obtenido. Las condiciones finales fueron: Inicial solvente C (Acetonitrilo) : solvente D (Agua) 85:15; equilibrio por 3 minutos y luego gradiente según tabla 2; volumen de inyección 5 microlitros; flujo 1 mL/min y longitud de onda 200 nm.

Tabla 2: Gradiente para la separación de los terpenos y derivados por HPLC-DAD en fase reversa

Step	Step Type	Step Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve
0	Equil	3.0	1	0.0	0.0	85.0	15.0	0.0
1	Run	10.0	1	0.0	0.0	85.0	15.0	1.0
2	Run	20.0	1	0.0	0.0	100.0	0.0	1.0
3	Run	5.0	1	0.0	0.0	100.0	0.0	1.0



Con el método implementado, se procedió a determinar la relación entre la concentración del AE y la respuesta del método, representada por el área bajo la curva del compuesto trazador con tiempo de retención de alrededor de 12 minutos. La figura 3, muestra que hay una relación lineal entre la concentración del AE y la respuesta del trazador (Área), con un coeficiente de correlación $> 0,9999$ y un intercepto que pasa por el origen (Intercepto = 0), de acuerdo con el análisis de varianza mostrado en la tabla 3 (p value = 0,1376).

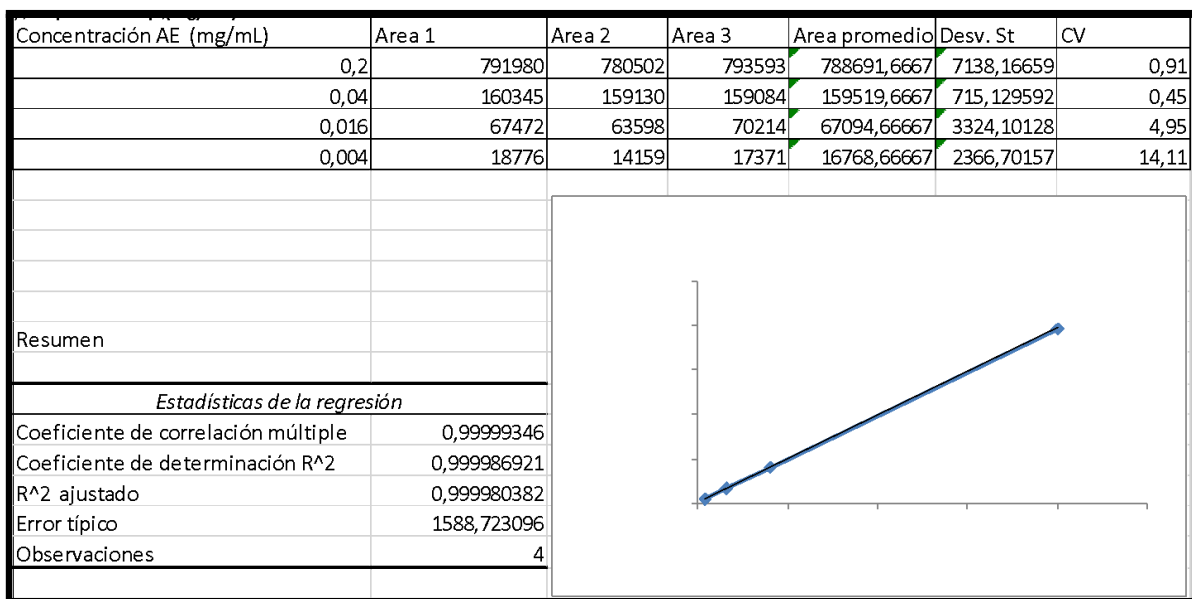


Fig. 3 Relación entre el área del pico con tiempo de retención aproximado de 12 min y la concentración del AE (Diámetro pequeño)

Cabe mencionar, que el último punto presento un CV mayor que las demás concentraciones, sin embargo, es menor de un 20%, que es lo recomendado en el límite de cuantificación de un método cromatográfico. Debido a esto, las siguientes curvas de calibración fueron realizadas a una concentración mayor. Como se puede apreciar en la figura 4 y 5, ambos aceites se ajustaron a un modelo lineal con un buen coeficiente de correlación ($R > 0,999$) y el intercepto de sus curvas no fue significativo (resultados no mostrados).

Tabla 3: Análisis de varianza curva de calibración AE

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	3,8596E+11	3,8596E+11	152915,2508	6,53951E-06	
Residuos	2	5048082,15	2524041,08			
Total	3	3,8597E+11				
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	2477,835336	1028,6163	2,40890148	0,137630031	-1947,943405	6903,614076
Concentración AE (mg/mL)	3931397,405	10053,5987	391,043797	6,53951E-06	3888140,261	3974654,549

Los datos presentados anteriormente, confirman que el método desarrollado de HPLC-DAD es adecuado la cuantificación del AE, con un tiempo de corrida de 35 minutos, que es menos de la mitad de tiempo utilizado por la caracterización de GC-MS (82 minutos por muestra). Entonces, se analizaron las mismas cinco muestras de AE de ciprés de la primera etapa del proyecto, que fueron obtenidas por HD o FS.

La figura 6 muestra los perfiles superpuestos de las cinco muestras extraídas por HD, donde podemos apreciar que todos son coincidentes. Una exacta correlación entre las señales obtenidas por GC-MS y los picos detectados por HPLC, no puede ser efectuada debido a la naturaleza de ambas técnicas instrumentales, por lo que los resultados obtenidos por HPLC-DAD son un complemento a la primera caracterización del aceite de ciprés.

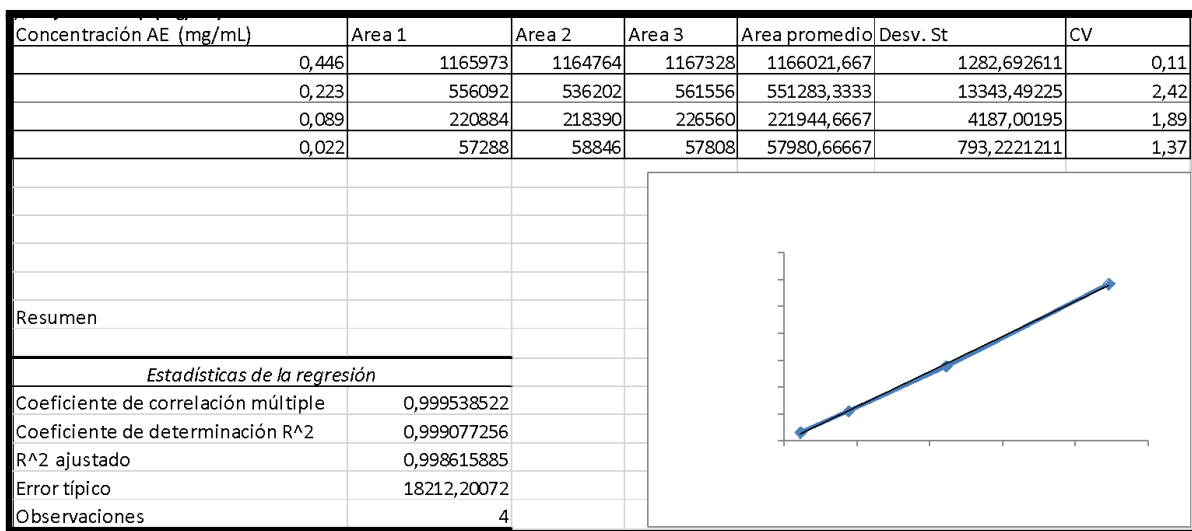


Fig. 4 Relación entre el área del pico con tiempo de ret. Aprox. 12 min y la concentración del AE (Diámetro grande)

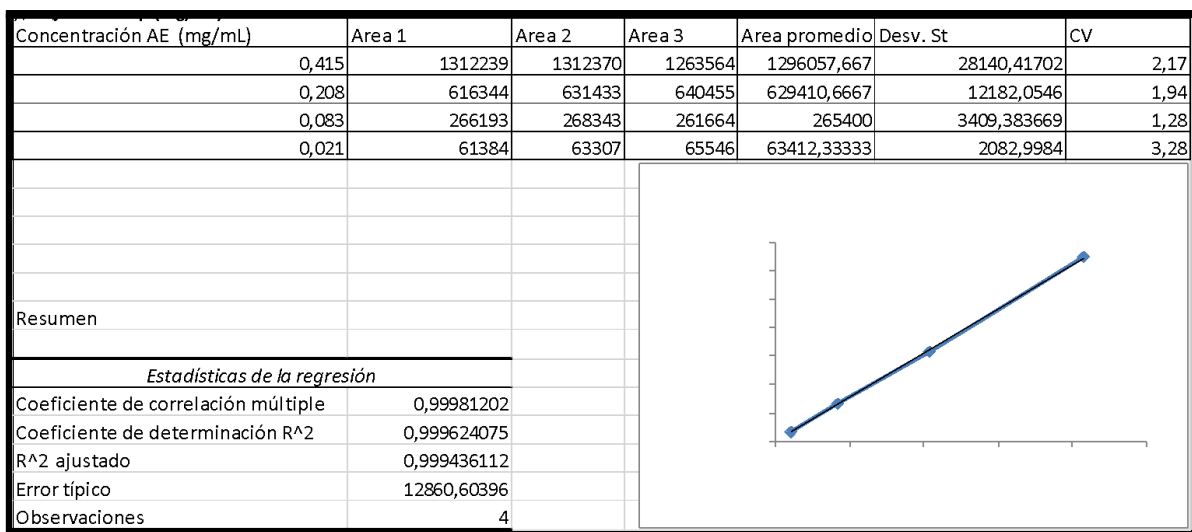
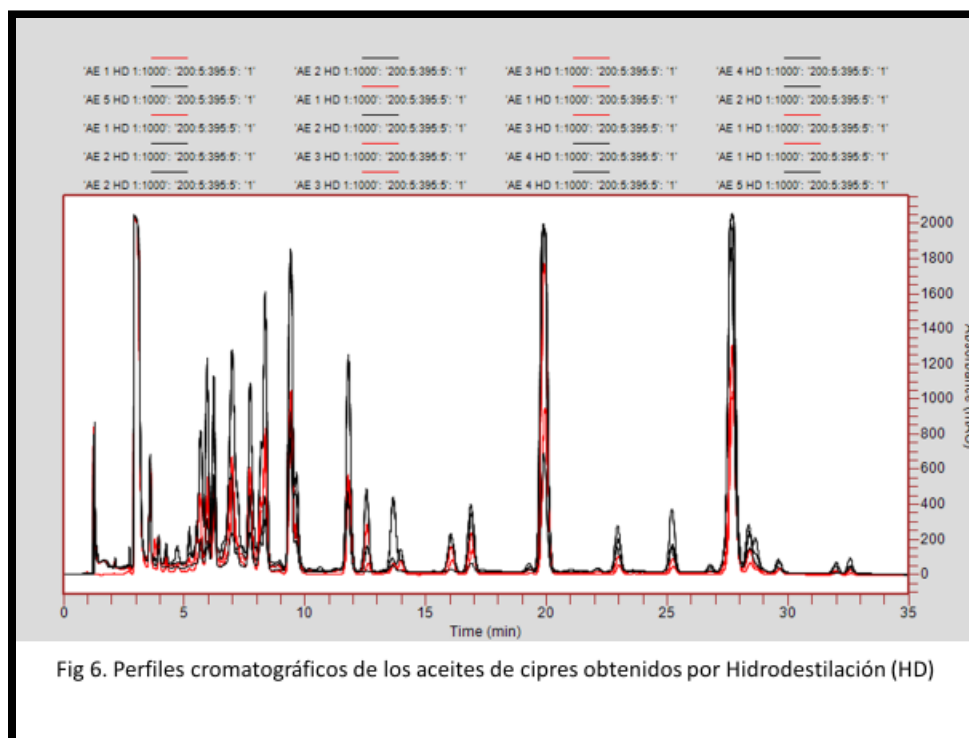


Fig. 5 Relación entre el área del pico con tiempo de ret. Aprox. 12 min y la concentración del AE (Árbol vivo)

En GC-MS la separación de los componentes del aceite obedece a dos fenómenos, por un lado, la volatilidad de las moléculas presentes y su interacción con el relleno de la columna, que en el análisis realizado correspondió a una columna Rtx-5MS, cuyo relleno es de baja polaridad. Con este procedimiento, el porcentaje de compuestos identificados en el extracto de HD fue de un 92%, lo que es bastante alto, considerando los porcentajes de otro estudio reportado para diferentes aceites, que fue entre un 47% a 64% (de Groot and Schmidt, 2016). Por su parte, en el método de HPLC-DAD de fase reversa la separación de los componentes obedece a la partición de las

moléculas en un relleno hidrofóbico de octadecilsilino (C18), por esta razón los perfiles obtenidos en GC-MS y HPLC-DAD, no son equivalentes. Adicionalmente, ciertos compuestos con baja volatilidad o peso molecular por sobre el rango del equipo GC-MS (400 m/z), podrían ser no detectados por esta metodología, pero si por cromatografía líquida y detección a una baja longitud de onda (Turek and Stintzing, 2011).



Con respecto al análisis por HPLC-DAD del aceite extraído por FS, la figura 7 muestra el perfil cromatográfico superpuesto de las 5 muestras caracterizadas previamente por GC-MS. Como se puede apreciar, son todo coincidentes, existiendo solo diferencia en la intensidad de algunas señales y con 35 minutos de corrida cromatográfica, pudieron eluir todos los componentes.

Asimismo, la figura 8 muestra dos cromatogramas representativos del aceite correspondiente a la muestra 1 (M1), donde están superpuestos los perfiles de ambas extracciones (HD y FS). Los tres analitos principales seleccionados previamente, se encuentran presente en las muestras obtenidas por ambos procedimientos de extracción y en los perfiles completos solo se observan diferencias menores en las señales presentes. Cabe destacar, que esta información es coincidente con los datos obtenidos previamente por GC-MS, sin embargo, no se puede hacer una exacta correlación de las dos técnicas, como se discutió anteriormente. Para las otras cuatro muestra de aceites, el resultado fue similar al descrito, con cromatogramas comparables entre HD y FS (no mostrado).

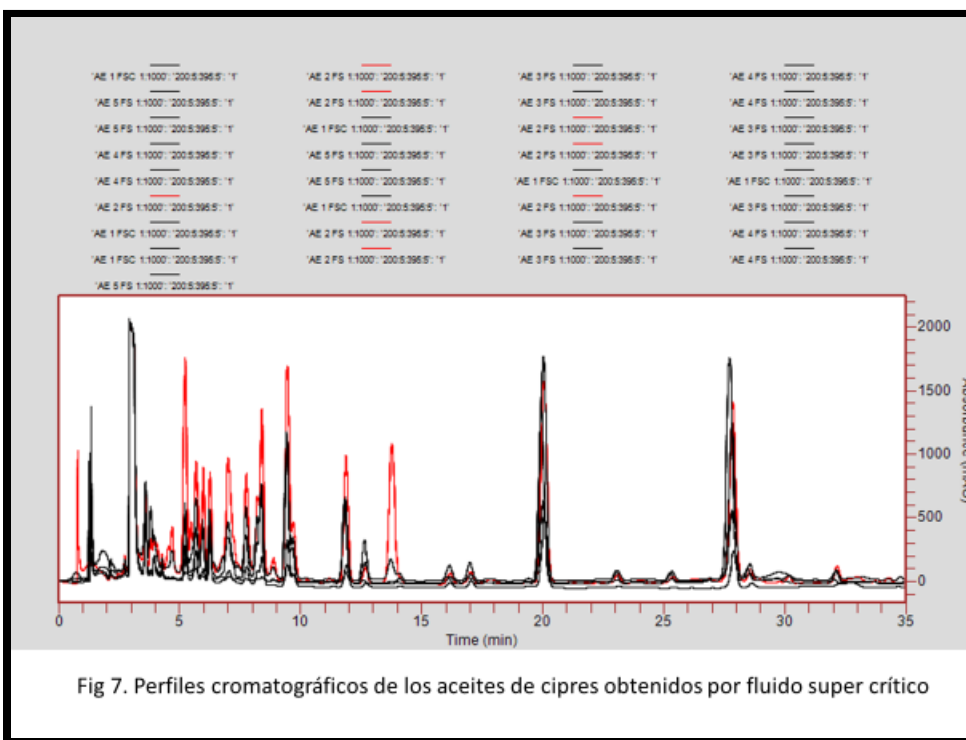


Fig 7. Perfiles cromatográficos de los aceites de cipres obtenidos por fluido super crítico

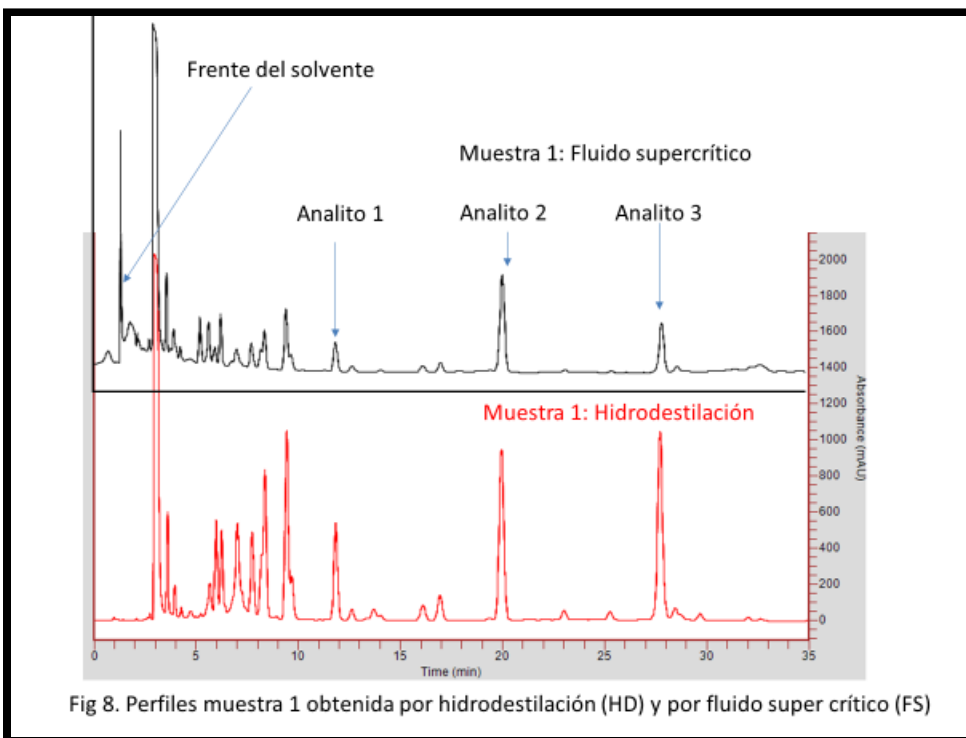


Fig 8. Perfiles muestra 1 obtenida por hidrodestilación (HD) y por fluido super crítico (FS)

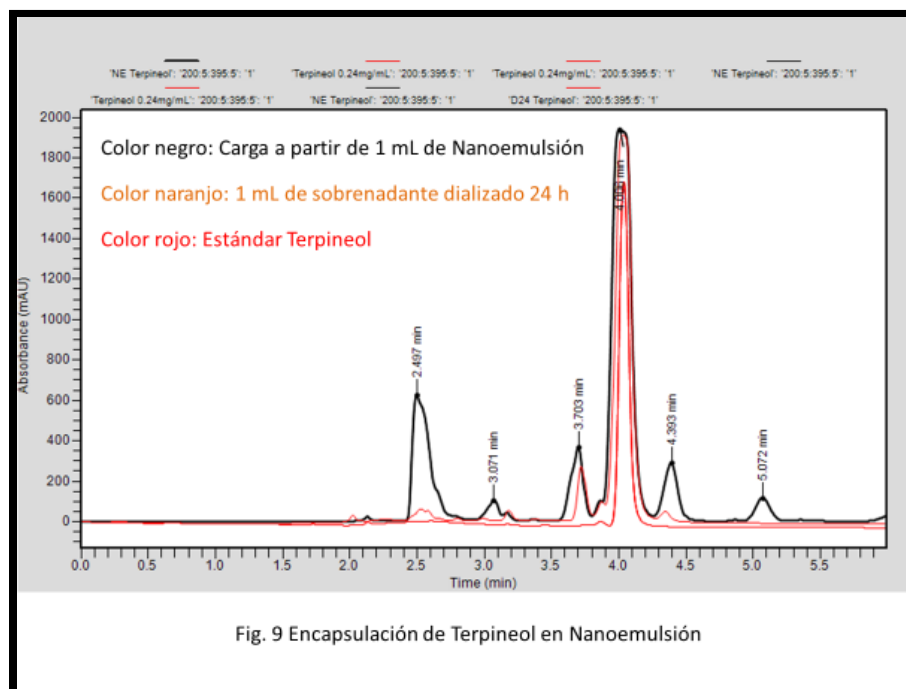
Determinación de la encapsulación de aceite en la nanoemulsión

Basado en el método HPLC-DAD desarrollado y validado, se evaluó la encapsulación del aceite en la nanoemulsión (NE). Para esto, se determinó la carga del ingrediente a encapsular y la eficiencia del proceso.

La tabla 4, presenta los resultados de encapsulación de terpineol en la nanoemulsión (NE) y la figura 9 muestra cromatogramas representativos del estándar, sobrenadante de la diálisis y muestra extraída con etanol para determinar la carga. La eficiencia de encapsulación fue de un 26,3% EE y la carga obtenida de un 0.57%), lo que es un grado de encapsulación bajo. Estos resultados están en conformidad con las características del analito (terpineol) que presenta una polaridad media (XLogP3-AA = 1.8) y por la presencia de un porcentaje relevante, 10%, de surfactante (Tween 80) que facilita que el terpineol difunda durante la diálisis en agua. .

Tabla 4: Encapsulación de Terpineol en la NE

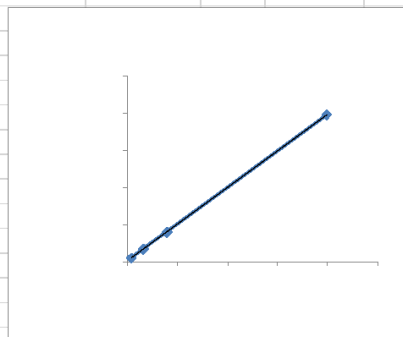
Concen. Terpineol (mg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Promedio		
0,24	8545090	8456238	8452493	8484607		
Muestras carga Nanoemulsión						
Volumen (uL=microlitro)	1000	mg de Terpineol	5,70		Eficiencia	
Peso muestra Nanoemulsión (mg)	1000	% carga exper.	0,57		% perdido	73,7
Se aproximo densidad a 1 g/mL		% carga teorica	5,63		% encapsulado	26,3
Area cromatografica	20149598					
Volumen extracción (mL)	10					
Sobrenadante dializado 24 horas						
Area cromatografica	16428324	mg de Terpineol	580,875131			
Volumen muestra (mL)	1					
Volumen total dializado (mL)	300					
Cantidad de Nanoemulsión dializada (mL)	15					
Volumen total de nanoemulsión	20					
Volumen de terpineol por lote (mL)	1,125					
Densidad Terpineol (g/mL)	0,934					
Masa de Terpineol (mg)	788,063					



La tabla 5 presenta los resultados de encapsulación del aceite de ciprés (diámetro pequeño) mediante el procedimiento de nanoemulsificación y la figura 10 muestra cromatogramas representativos del sobrenadante de la diálisis (15 min y 24 horas) y de la muestra extraída con etanol para determinar la carga. La eficiencia de encapsulación fue de un 98,6% y la carga obtenida fue de 2.17%. , Estos resultados, están de acuerdo a las características de los principales terpenoides del aceite de ciprés, que presentan una baja polaridad (XLogP3-AA entre 3,3 y 3,8). Con respecto a la carga teórica (5,63%), la carga obtenida corresponde a cerca de la mitad. Es probable que el procedimiento de extracción con etanol, no sea suficiente para sacar todo el aceite encapsulado. Esto sería concordante, con la baja cantidad que difunde después de 24 horas de diálisis. Se repetirá el procedimiento de rotura de la emulsión con más tiempo de tratamiento y/o cambiando a un solvente de menor polaridad como tetrahidrofurano.

Tabla 5: Encapsulación de AE de ciprés (Diámetro pequeño) en la NE

Concen. (mg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Promedio	Desv. St	CV		
0,2	791980	780502	793593	788691,667	7138,166595	0,91		
0,04	160345	159130	159084	159519,667	715,129592	0,45		
0,016	67472	63598	70214	67094,6667	3324,101282	4,95		
0,004	18776	14159	17371	16768,6667	2366,701573	14,11		
Muestras carga Nanoemulsión								
Volumen (uL=microlitro)	1000	mg de aceite	22,00		Eficiencia			
Peso muestra Nanoemulsión (mg)	1014,3	% carga exper.	2,17		% perdido	1,4		
densidad nanoemulsion aprox. (g/mL)	0,9859	% carga teorica	5,63		% encapsulado	98,6		
Area cromatografica	867413							
Volumen extracción (mL)	100							
Sobrenadante dializado 24 horas								
Area cromatografica	140770	mg de aceite	10,55					
Volumen muestra (mL)	1							
Volumen total dializado (mL)	300							
Cantidad de Nanoemulsión dializada (mL)	15							
Volumen total de nanoemulsión	20							
Volumen de aceite por lote (mL)	1,125							
Densidad aceite (g/mL)	0,92							
Masa de Terpineol (mg)	772,950							



Con respecto al AE de ciprés diámetro grande la eficiencia de encapsulación fue de 99.1% y se obtuvo una carga de 2,15% y para el AE de árbol vivo los parámetros fueron 99,5% y 2,32%, respectivamente (Ver tabla 6 y 7).

La figura 11 por su parte, muestra un cromatograma representativo del estándar del aceite de ciprés (diámetro pequeño) y la muestra extraída con etanol, donde podemos apreciar que los perfiles de señales en ambos cromatogramas son casi idénticos a excepción de una señal que corresponde a los excipientes de la nanoemulsión, lo que se confirmó con una fórmula no cargada (no mostrado). Esto comprueba, la eficacia de la NE para encapsular el aceite. Este resultado fue similar para el AE de diámetro grande y Árbol vivo (no mostrado).

Tabla 6: Encapsulación de AE de ciprés (Diámetro grande) en la NE

Concentración AE (mg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Area promedio	Desv. St	CV		
0,446	1165973	1164764	1167328	1166021,67	1282,692611	0,11		
0,223	556092	536202	561556	551283,333	13343,49225	2,42		
0,089	220884	218390	226560	221944,667	4187,00195	1,89		
0,022	57288	58846	57808	57980,6667	793,2221211	1,37		
Muestras carga Nanoemulsión								
Volumen (uL=microlitro)	1000	mg de aceite	21,64				Eficiencia	
Peso muestra Nanoemulsión (mg)	1008,5	% carga exper.	2,15				% perdido	0,9
densidad nanoemulsion aprox. (g/mL)	0,9916	% carga teorica	5,63				% encapsulado	99,1
Area cromatografica	555637							
Volumen extracción (mL)	100							
Sobrenadante dializado 24 horas								
Area cromatografica	49882	mg de aceite	7,03					
Volumen muestra (mL)	1							
Volumen total dializado (mL)	300							
Cantidad de Nanoemulsión dializada (mL)	15							
Volumen total de nanoemulsión	20							
Volumen de aceite por lote (mL)	1,125							
Densidad aceite (g/mL)	0,92							
Masa de aceite (mg)	772,950							

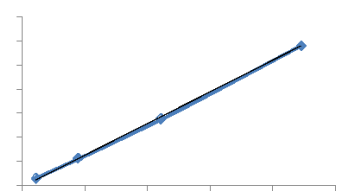


Tabla 7: Encapsulación de AE de ciprés (Árbol vivo) en la NE

Concentración AE (mg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Area promedio	Desv. St	CV		
0,415	1312239	1312370	1263564	1296057,67	28140,41702	2,17		
0,208	616344	631433	640455	629410,667	12182,0546	1,94		
0,083	266193	268343	261664	265400	3409,383669	1,28		
0,021	61384	63307	65546	63412,3333	2082,9984	3,28		
Muestras carga Nanoemulsión								
Volumen (uL=microlitro)	1000	mg de aceite	23,33				Eficiencia	
Peso muestra Nanoemulsión (mg)	1007,4	% carga exper.	2,32				% perdido	0,5
densidad nanoemulsion aprox. (g/mL)	0,9927	% carga teorica	5,63				% encapsulado	99,5
Area cromatografica	724729							
Volumen extracción (mL)	100							
Sobrenadante dializado 24 horas								
Area cromatografica	37275	mg de aceite	3,76					
Volumen muestra (mL)	1							
Volumen total dializado (mL)	300							
Cantidad de Nanoemulsión dializada (mL)	15							
Volumen total de nanoemulsión	20							
Volumen de aceite por lote (mL)	1,125							
Densidad aceite (g/mL)	0,92							
Masa de aceite (mg)	772,950							



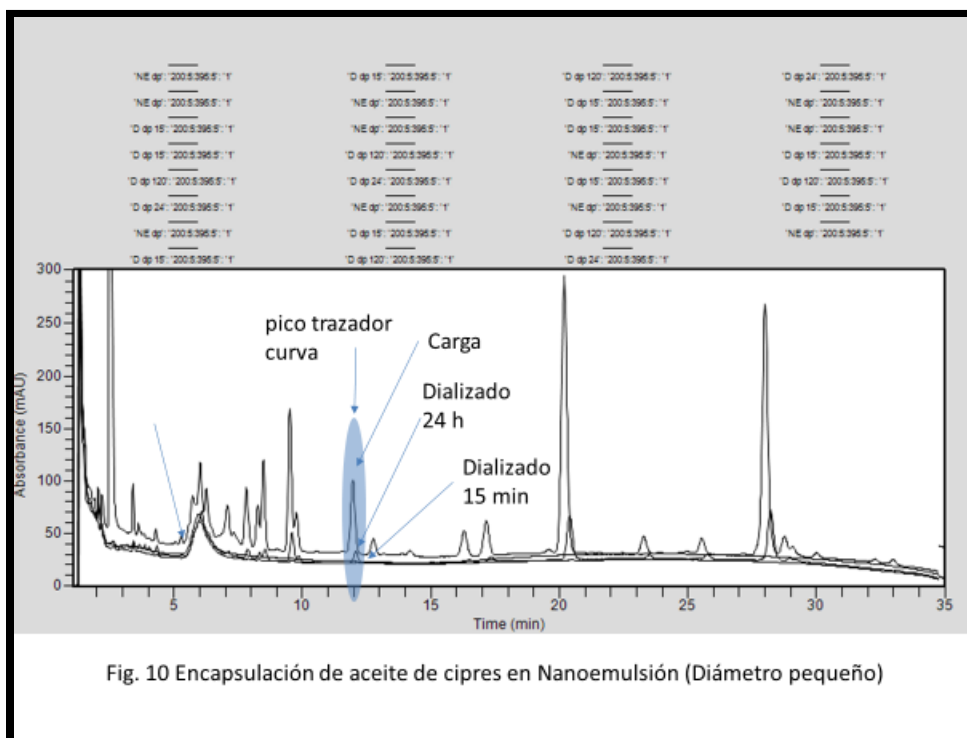


Fig. 10 Encapsulación de aceite de cipres en Nanoemulsión (Diámetro pequeño)

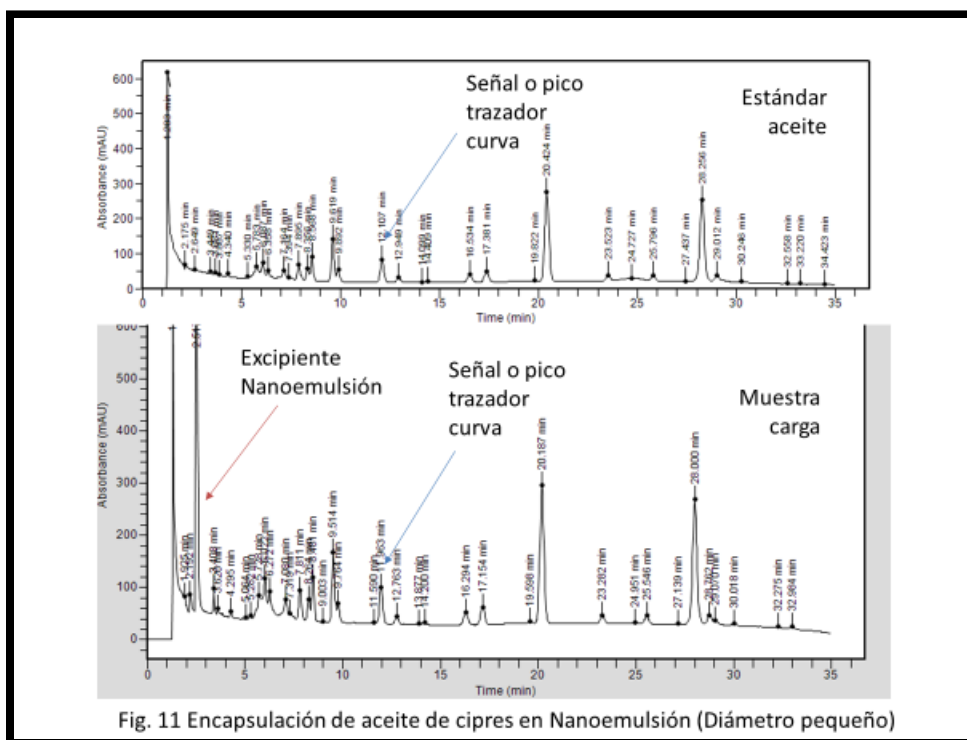


Fig. 11 Encapsulación de aceite de cipres en Nanoemulsión (Diámetro pequeño)

Determinación de la encapsulación de aceite en la nanosuspensión

En la tabla 8 se muestran los resultados de encapsulación de terpineol en Q-TPP y en la tabla 9 los resultados de encapsulación de aceite en Q-TPP

Tabla 8: Encapsulación de terpineol en Q-TPP

Concen. Terpineol (mg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Promedio
0.24	8545090	8456238	8452493	8484607

Volumen suspensión extraída (mL)	1
Volumen extracción (mL)	10

g/100 ml de
suspensión

Muestra	Area	mg de terpineol	% p/v de suspensión	% carga respecto al teorico
Qtp Tween 1:1	417861	0.118	0.012	19.0
Qtp Tween 1:5	469294	0.133	0.013	21.3
Qtp Tween 1:10	636774	0.180	0.018	28.9
Volumen suspensión dializada (mL)	5			
Sobrenadante (mL)	500			
Cantidad Terpineol agregado (mg)	28.02			
Densidad (g/mL)	0.934			

Carga Teorica de la suspension goteada de Qtp

% Teorico peso
volumen 0.06

Volumen Qo (mL)	30
Volumen tpp (mL)	15

Volumen total suspensión	45
--------------------------	----

Sobrenadante dializado 2 horas	Area	mg de terpineol	mg agregado	% eficiencia
Qtp Tween 1:1	114243	1.616	3.11	48.1
Qtp Tween 1:5	121335	1.716	3.11	44.9
Qtp Tween 1:10	124932	1.767	3.11	43.2

Tabla 9: Encapsulación de aceite en Q-TTP

Concen. (mg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Promedio	Desv. St	CV
0.2	791980	780502	793593	788691.6667	7138.166595	0.91
0.04	160345	159130	159084	159519.6667	715.129592	0.45
0.016	67472	63598	70214	67094.66667	3324.101282	4.95
0.004	18776	14159	17371	16768.66667	2366.701573	14.11

Volumen suspensión extraída (mL)	1
Volumen extracción (mL)	10

g/100 ml de
suspensión

Muestra	Area	mg de aceite	% p/v de suspensión	% carga respecto al teorico
Qtp Tween 1:1	117811	0.29	0.029	48.0

Qtp TWEEN 1:5	216706	0.54	0.054	89.2
Qtp TWEEN 1:10	222316	0.56	0.056	91.6

Volumen suspensión dializada (mL)	5
Sobrenadante (mL)	500
Cantidad aceite agregado (mg)	27.48
Densidad (g/mL)	0.92

Carga Teórica de la suspensión goteada de Qtp

% Teórico peso volumen 0.06

Volumen Qo (mL)	30
Volumen tpp (mL)	15
Volumen total suspensión	45

Sobrenadante dializado 2 horas	Area	mg de aceite	mg agregado	% eficiencia
Qtp TWEEN 1:1	No detectado	#VALOR!	3.05	100.0
Qtp TWEEN 1:5	No detectado	#VALOR!	3.05	100.0
Qtp TWEEN 1:10	No detectado	#VALOR!	3.05	100.0

Los resultados muestran que con las modificaciones introducidas al método, uso de tween 80 a distintas proporciones con aceite, se logra una elevada eficiencia de encapsulación, para el aceite en todas las proporciones cercano al 100%, ver tabla 9, y una carga creciente con el aumento de la proporción de tween, 48 al 92 % respecto al teórico. En el caso de terpineol, ver tabla 8, la eficiencia de encapsulación es menor (43 a 48%) y disminuye con el aumento de Tween 80. Con respecto a la carga también se observa un aumento con el incremento de la proporción de tween, 19 al 29 % respecto al teórico, pero la encapsulación es bastante menor respecto al aceite.

Efecto del aumento de la carga de aceite sobre la eficiencia de encapsulación

Con el objeto de aumentar la carga de aceite en el nanosistema se aumento la carga original 0,1 ml aceite /100 ml solución de Qo a 0,2-0,3-0,4 y 0.5. El efecto sobre el tamaño, PDI y potencial Zeta se muestra se muestra en el anexo nanosuspensión QTPP. De acuerdo a esos resultados, vemos que es posible realizar una carga de aceite de hasta 0,4%, sobre este valor el PDI es >1.0.

Tabla 10: Carga de NQtp con distintas relaciones de aceite

Muestra	% p/v de suspensión	% Teorico	% carga respecto al teorico
Qtp Tween 1:5 0,2	0,067	0,12	54,6
Qtp Tween 1:5 0,3	0,112	0,18	61,1
Qtp Tween 1:5 0,4	0,156	0,24	63,7
Qtp Tween 1:5 0,5	0,189	0,31	61,8

En relación con la carga, también se observa que la formulación que presenta mayor eficiencia de encapsulación de aceite es la de 0,4 ml aceite/100 ml solución de Qo

Referencias

- de Groot, A.C., Schmidt, E., 2016. Essential Oils, Part III: Chemical Composition. *Dermatitis* 27, 161–169. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000193>
- Strack, D., Proksch, P., Gülz, P.-G., 1980. Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography of Essential Oils. *Zeitschrift für Naturforschung C* 35, 675–681. <https://doi.org/10.1515/znc-1980-9-1001>
- Turek, C., Stintzing, F.C., 2011. Application of high-performance liquid chromatography diode array detection and mass spectrometry to the analysis of characteristic compounds in various essential oils. *Anal Bioanal Chem* 400, 3109–3123. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4976-5>

Actividad Antimicrobiana de aceites esenciales y sus diversas formulaciones: Nanoemulsiones, nanoencapsulados Q-TPP y geles.

Preparado por Nelson Caro

Revisado y editado por Cristian Tapia

1.- Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los aceites esenciales y sus formulaciones.

Metodología

Las CIM y CBM de los activos contra las cepas ensayadas fue determinadas siguiendo el protocolo del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (Limbago, 2011). Para el ensayo de la CIM, cada cepa bacteriana fue inoculada en medios de cultivos y disponibilidad de oxígeno (aerobiosis o anaerobiosis) selectivos para su crecimiento hasta alcanzar una OD_{600} de 1.745 ± 0.122 , equivalente a 1×10^5 UFC/mL. Posteriormente, cada cultivo fue diluido hasta obtener una OD_{600} de 0.05 nm en donde fueron cultivados en un volumen final de 400 μ L utilizando placas de poliestireno de 96 pocillos en donde las cepas ensayadas fueron enfrentadas a concentraciones crecientes de cada activo y en ausencia del activo (control). Luego de 24 h de incubación, la OD fue medida utilizando el lector de placas TECAN Infinite PRO m200. La CIM fue determinada por cuantificación de la OD_{600} luego de la incubación con los activos y se estableció como la concentración más baja de los activos que evidencio OD_{600} similar al caldo de cultivo sin inóculo bacteriano (no turbiedad).

La CBM fue determinada mediante recuento de células viables (colonias) en placas de agar (UFC/mL) utilizando la misma metodología de incubación que la CIM. Brevemente, un volumen de 1000 μ L expuesto a los activos fue inoculado en 9,0 mL de suero fisiológico (NaCl 0,9% p/v) estéril en donde diluciones seriadas fueron realizadas hasta 100000 veces (10^{-5}). 1 mL de cultivos fueron sembrados en placas de agar TSA y fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Luego de la incubación, se realizó el recuento de colonias de cada cepa expuesta a los activos. Los resultados fueron expresados como UFC/mL. La CBM fue determinada como la concentración que es capaz de eliminar el 99.9% respecto al inóculo inicial (control de viabilidad) (Orellano y cols., 2019). Cada ensayo se realizó en quintuplicado tres veces en forma independiente.

Actividad 2.- Determinación de la capacidad de inhibición de la formación de biofilm de las cepas ensayadas enfrentadas a los bioactivos.

Metodología.

La capacidad de los aceites esenciales (y las respectivas formulaciones) en la inhibición de la formación del biofilm bacteriano fue cuantificada utilizando la estrategia del método de cristal violeta (Rivera y cols., 2020). Brevemente, cada cepa ensayada fue inoculada en condiciones óptimas de crecimiento (37°C y disponibilidad de oxígeno según requerimientos metabólicos específicos de los géneros ensayados) hasta alcanzar una fase exponencial temprana (OD_{600} de $\sim 0,4$). Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, un volumen de 200 μ L de cada cepa fue inoculada en placas de poliestireno de 96 pocillos en ausencia (control) y presencia de diferentes

concentraciones de los aceites esenciales y sus diferentes formulaciones. Para la exposición de las cepas a los activos, las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. Luego de la incubación, las células en estado planctónico fueron descartadas. Para la fijación del biofilm formado, se agregó metanol seguido de la tinción con cristal violeta (0,2 % p/v). Las bacterias que fueron capaces de adherirse y formar las biopelículas en los pocillos de las placas de poliestireno, fueron lavadas 3 veces con agua destilada estéril y fueron resuspendidas en ácido acético glacial (33 % v/v) y la densidad óptica (OD₅₇₀) fue determinada en el lector de placas TECAN Infinite PRO m200, en donde la densidad óptica de las cepas control (no expuestas a los activos) se consideró como el 100 % en la capacidad de formación de biofilm y fue comparada con las OD₅₇₀ de las cepas expuestas a las diferentes concentraciones de los activos, determinado así la capacidad de inhibición del biofilm. Cada ensayo se realizó en quintuplicado tres veces en forma independiente.

Actividad 3: Determinación de la zona de inhibición del crecimiento.

El ensayo de difusión en agar fue realizado para determinar la zona de inhibición del crecimiento de todas las cepas ensayadas en este análisis con el objetivo de evaluar la eficiencia de las diferentes formulaciones, la metodología fue desarrollada según lo descrito por Hudzicki y cols., (2009) y las recomendaciones de la NCCLS (2017). Las placas de agar Müller-Hinton fueron inoculadas con una suspensión de bacteriana de 100 µL con $\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL. Discos blancos fueron cargados con concentraciones determinadas de cada formulación ensayada y dispuesto equidistantes en la superficie del agar sembrada con los inóculos bacterianos. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24h y la zona de inhibición fue estimada por medición del diámetro de las áreas en donde no se evidenció el crecimiento bacteriano. Cada experimento fue realizado en triplicado.

Resultados.

1. Actividad del aceite

Tabla 1.1: Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales D.G, A.V y D.P

Cepa	CIM Activo (mg/mL)			Capacidad de Inhibición (%) de CIM		
	D.G	A.V	D.P	D.G	A.V	D.P
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1.27	1.17	1.23	92.71 ± 0.82	90.02 ± 0.47	92.98 ± 0.81
<i>Streptococcus gordonii</i>	2.55	1.17	1.23	93.47 ± 0.35	92.78 ± 0.10	93.25 ± 0.36
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1.27	1.17	1.23	92.97 ± 0.84	90.38 ± 0.41	92.98 ± 0.81
<i>Agreggatibacter actinomycetemcomitans</i>	1.27	0.58	1.23	93.00 ± 0.81	93.03 ± 1.95	93.00 ± 0.83
<i>Propionibacterium acnes</i>	1.27	1.17	1.23	90.51 ± 0.42	90.30 ± 0.20	93.99 ± 0.12
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.55	0.58	0.61	93.04 ± 0.37	95.37 ± 0.03	91.32 ± 1.33

De los datos obtenidos de la CIM (Tabla 1.1), para los agentes etiológicos de enfermedad periodontal principales *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, el aceite con mejor desempeño corresponde a A.V, el cual requiere 1.27 y 0,58 mg/mL para reducir el 90.02 y 93.03% de la carga bacteriana ensayada, respectivamente. Con respecto a los agentes cariogenicos, iniciadores de la enfermedad periodontal, *S. gordonii* y *S. sanguinis* el extracto de AV también mostró el mejor desempeño en cuanto a la cantidad requerida para reducir sobre el 90% de la carga bacteriana, requiriendo 1.17 mg/mL para inhibir a ambos microorganismos. Estas concentraciones son superiores a los de los antibióticos descritos para el tratamiento de esta enfermedad. Gamboa y cols (2014) indican que la CIM de tetraciclina y metronidazol, antibióticos indicados para el tratamiento periodontal, es entre 0.015 a 4 ug/mL.

Con respecto a los agentes etiológicos del acné, el extracto con mejor desempeño corresponde a al extracto A.V en donde se requiere 1.17 y 0.58 mg/mL para inhibir el desarrollo de *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus aureus* respectivamente. Según los reportes de Crane y cols (2013), los antibióticos gold estándar para tratar las infecciones de *P. acnes* corresponden a Clindamicina y vancomicina en donde los CIM de estos antibióticos reportados para este microorganismo es de 8.5 y 3.25 mg/mL, por lo que la actividad del extracto de AV, DG y DP es entre 7 a 2 veces más potentes.

Tabla 1.2: Determinación de concentración bactericida mínima

Cepa	CBM Activo (mg/mL)		
	D.G	A.V	D.P
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5.17	4.97	3.70
<i>Streptococcus gordonii</i>	6.39	3.51	4.93
<i>Streptococcus sanguinis</i>	5.11	4.93	6.17
<i>Agreggatibacter actinomycetemcomitans</i>	3.83	2.34	6.17
<i>Propionibacterium acnes</i>	5.17	6.17	4.93
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.11	2.34	2.45

La tabla 1.2 muestra los resultados de la concentración bactericida mínima, que corresponde a la concentración del activo requerida para eliminar el 100% de la población bacteriana. Los resultados evidencian que el para los agentes etiológicos de la enfermedad periodontal, el extracto con mejor desempeño conrresponde al AV ya que requiere entre 2.34 a 4.97 mg/mL para inhibir completamente la proliferación de *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis* y *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*, siendo esta última las más susceptible a este extracto.

Respecto a los patógenos del acné, el con mejor desempeño para inhibir completamente la proliferación de *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus aureus* corresponde a D.P en donde es requerido entre 2.45 a 4.93 mg/mL para ejercer un efecto bactericida.

2.- Determinación de la Concentración inhibitoria de nanoemulsiones (NDG, NDP y NAV)

Fueron analizadas las nanoemulsiones formuladas a partir de los aceites esenciales DG, DP y AV, los resultados de la CIM y CBM son mostrados en la **Tabla 1**.

Se evidencia que estas nanoemulsiones (NDG, NDP y NAV), evidencian capacidad para inhibir el crecimiento de todas las cepas ensayadas, sin embargo, la actividad observada en estos análisis de estas preparaciones, resultó ser muy inferior a los resultados obtenidos y reportados en el informe anterior de la capacidad antimicrobiana que evidencian los aceites esenciales extraídos en su estado puro (DG, DP y AV). Estas nanoemulsiones requieren una concentración hasta 80 veces mayor que la concentración requerida de los aceites puros para lograr inhibir la proliferación de las cepas ensayadas. Con respecto a la CBM, estas preparaciones no evidenciaron la capacidad de matar las bacterias determinadas por la estrategia analítica descrita la metodología de la CBM, lo cual se muestra también en la **Tabla 1** y es reportado como Actividad No Encontrada (A.N.E) en las concentraciones ensayadas para estos preparados, en donde la máxima concentración ensayadas (por la técnica utilizada), de cada uno de estas nanoemulsiones fue hasta 300 mg/mL. Por otro lado, si bien las nanoemulsiones evaluadas en estos ensayos mostraron que poseen la capacidad de inhibir el desarrollo bacteriano (resultados mostrados en la CIM), esta actividad es más bien moderada respecto a los aceites en su estado puro. La capacidad de inhibición de estos 3 preparados (NDG, NDP y NAV) comprende entre el 39.55 ± 2.21 al 62.23 ± 4.15 % de actividad antimicrobiana, es por esta razón que no se evidencia una concentración capaz de ejercer un efecto bactericida.

Tabla 2.1: CIM/CBM de nanoemulsiones NDG, NDP y NAV

Cepa ensayada	CIM Activo (mg/mL)			CBM (mg/mL)		
	NDG	NDP	NAV	NDG	NDP	NAV
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	150	160	170	A.N.E	A.N.E	A.N.E
<i>Streptococcus gordonii</i>	110	110	125	A.N.E	A.N.E	A.N.E
<i>Streptococcus sanguinis</i>	100	100	110	A.N.E	A.N.E	A.N.E
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	180	190	170	A.N.E	A.N.E	A.N.E
<i>Propionibacterium acnes</i>	210	220	220	A.N.E	A.N.E	A.N.E
<i>Staphylococcus aureus</i>	120	100	110	A.N.E	A.N.E	A.N.E

A.N.E= Actividad No Encontrada

3.- Determinación de la Concentración inhibitoria de las nanoformulaciones NQo-TPP con el aceite esencial DP encapsulado (NQoDP). 0.1 ml de aceite/100ml solución de Qo

Fueron determinados los parámetros CIM y CBM para las nanopartículas fabricadas por gelificación iónica utilizando quitosano de bajo peso molecular y tripolifosfato de sodio cargadas con el aceite esencial extraído desde DP (NQoDP) y se utilizó como control y parámetro de comparación el mismo tipo de nanopartículas sin AE encapsulado (NQo), los resultados de ambos ensayos son

mostrados en la **Tabla 2**. Se evidencia que la presencia del AE DP (NQoDP) en la formulación incrementa la actividad de las NQo entre 2.2 y 2.4 frente a las especies de *Streptococcus*, de 2,2 veces para *A. actinomycetemcomitans* y de 4,3 veces la efectividad frente a *Porphyromonas gingivalis* evidenciando la potente actividad antimicrobiana frente a los agentes etiológicos de la enfermedad periodontal. Los CIM de NQoDP para el caso de los patógenos del acné varía significativamente entre 1.5 y 2.0 mg/mL, evidenciando una actividad significativamente mayor que las mostradas por NQo la cual fue de entre 2.8 a 3.6 veces mayor. **Interesante resulta lo observado en la determinación del CBM de las NQoDP, la cual que permite incrementar la actividad bactericida de forma sinérgica entre la matriz nanoparticulada del quitosano y el aceite esencial, ya que las CBM del aceite puro (DP) reportados en el informe anterior fue de 3,7 (mg/mL) para *P. gingivalis*; 4.93 (mg/mL) para *S. gordonii*; 6.17 (mg/mL) para *P. acnes*; *S. sanguinis* y *A. actinomycetemcomitans* y de 2,45 (mg/mL) para *S. aureus*.** Es evidenciado que la encapsulación incrementa la actividad antimicrobiana del activo, concordando con la literatura que ha reportado el incremento de los AE al ser encapsulado en diferentes matrices nanoparticuladas (Hadidi y cols., 2020). Los microorganismos muestran susceptibilidad similar al DP en cuanto a las concentraciones con variaciones de entre 0.5 a 1.0 mg/mL del nanoformulado. Estos resultados concuerdan con reportes previos que determinan la efectividad antimicrobiana del quitosano en su estado nanoparticulado frente a diversos tipos de bacterias (Divya y cols., 2017), cuya actividad se ve potenciada con AE tales como el timol (Caro y cols., 2016). A la fecha no ha sido reportado la actividad antimicrobiana de AE extraídos desde estas fuentes de origen, sin embargo, se ha descrito la actividad de otros tipos de terpenos extraídos desde hojas con excelentes desempeños y posibles aplicaciones en la industria alimentaria (Ambrosio y cols., 2017)

Tabla 3.1: Actividad AM de NQoTPP

Cepa	CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)	
	NQo	NQoDP	NQo	NQoDP
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	6.5	1.5	10.5	3.0
<i>Streptococcus gordonii</i>	5.5	2.5	9.5	4.0
<i>Streptococcus sanguinis</i>	6.0	2.5	8.0	4.0
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5.5	2.5	7.5	3.5
<i>Propionibacterium acnes</i>	5.5	2.0	8.0	4.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.5	1.5	6.5	2.0

4.- Zona de inhibición del Crecimiento de Nanopartículas cargadas con DP.

Las **Figuras 1 y 2**, muestran la zona de inhibición del crecimiento (ZIC) de las 2 formulaciones de nanopartículas ensayadas NQo y NQoDP, en donde para el caso de los patógenos del acné (**Fig. 1**) Se evidencia el potente efecto en la inhibición tanto en *S. aureus* y *P. acnés* de las nanopartículas que contienen en AE (NQoDP), siendo significativamente superior a la inhibición generada por las nanopartículas control (NQo), las nanoformulaciones con aceite esencial evidenciaron un incremento del 56% la capacidad de inhibir el desarrollo de *P. acnés* y de un 47% en la inhibición de *S. aureus*. En el caso de los patógenos de la enfermedad periodontal, las formulaciones analizadas (**Fig 2**) se evidencia el incremento del poder de inhibición de la formulación NQoDP en todas las

cepas *P. gingivalis*, *S. sanguinis* y *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*, resultando esta formulación entre 20 a 50% más potente que la NQo, ratificando el efecto sinérgico AE y quitosano.

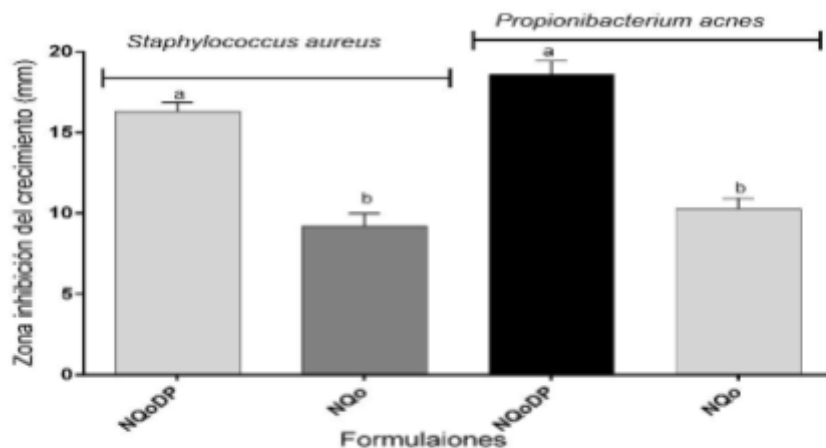


Fig 1.- Determinación de la zona de inhibición del crecimiento de bacterias responsables de la enfermedad del acné. Las cepas fueron enfrentadas a 8.0 mg de cada formulación. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

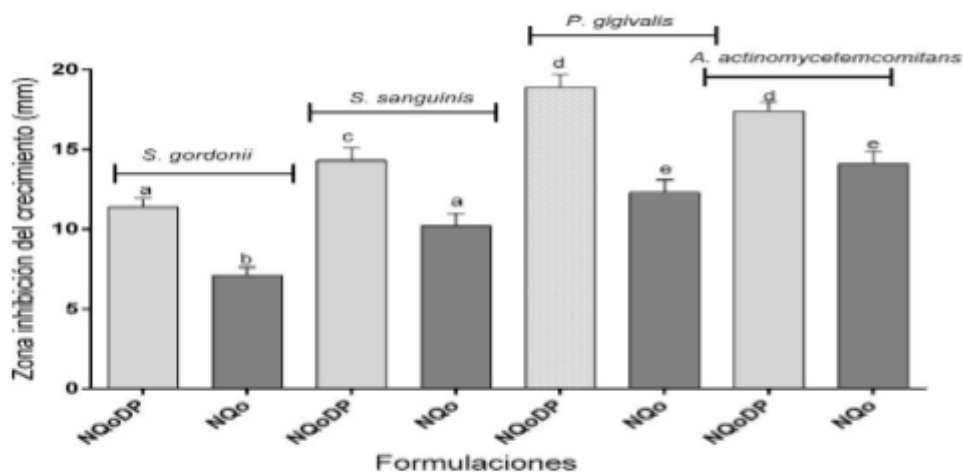


Fig 2.- Determinación de la zona de inhibición del crecimiento de bacterias responsables de la enfermedad periodontal. Las cepas fueron enfrentadas a 8.0 mg de cada formulación. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Al comparar la eficiencia del nanoformulado (NQoDP) versus el AE DP en estado puro, se evidenció en los análisis previos (informe 1), que para las cepas responsables de la enfermedad del acné, **utilizando las mismas concentraciones (8 mg) cargadas en el sensidisco** de DP y NQoDP, la actividad de las nanopartículas genera una inhibición de 16.31 ± 0.56 (mm) mientras que el AE DP en igual concentración genera una inhibición de 7.50 ± 0.44 (mm) para el caso de *S. aureus*, mientras que para el caso de *P. acnés* la inhibición de DP puro fue de 8.20 ± 0.83 (mm) y 18.60 ± 0.83 (mm), demostrando un significativo incremento de la capacidad inhibitoria del crecimiento de ~2.2 veces de esta formulación. Similar efecto se evidencia en los microorganismos de la enfermedad periodontal, en donde el aceite puro (DP) logró una inhibición de 2.40 ± 0.52 (mm) versus la inhibición de 11.40 ± 0.42 (mm) de NQoDP en *S. gordonii*; de 7.40 ± 0.74 (mm) versus los 14.30 ± 0.8 (mm) para el caso de *S. sanguinis*; los 10.02 ± 1.02 (mm) versus 18.9 ± 0.22 (mm) para el caso de *P. gigivalis*; y 6.61 ± 0.72 (mm) versus los 17.4 ± 0.24 (mm) generados sobre *A. actinomycetemcomitans*. Resultados que evidencia un poder de inhibición significativamente mayor de las NQoDP que varía entre el 45 al 65% sobre la capacidad de inhibición del DP, siendo las bacterias *P. acne* y *P. gigivalis* las más susceptibles a esta formulación.

5.- Inhibición del Biofilm de las Nanopartículas de Quitosano y nanopartículas de quitosano con AE DP encapsulado sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *P. acnés*, *Porfiromonas gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

La formación de biopelículas bacterianas sobre superficies bióticas ha sido descrita como uno de los principales gatillantes y elicitores de las enfermedades periodontal y acné (Eke y cols., 2012; Holmberg y cols., 2009). Debido a que esta estructura de exopolisacarido laxo, unido débilmente a la pared bacteriana, le permite a los microorganismos patógenos -y potencialmente patógenos- colonizar y comunicarse entre sí generando un microambiente que favorece la expresión de factores de virulencia involucrado con la enfermedad propia, enfermedades sistémicas, así como expresar múltiples genes de resistencia a los antibióticos convencionales (Paju y cols., 2007; Wei y cols., 2016). Es por ello la relevancia de evaluar este parámetro de efectividad antimicrobiana de nuevas moléculas bioactivas (Rivera y cols., 2020).

Se evaluaron tanto las nanopartículas con AE nanoencapsulado (NQoDP) así como el control NQo, estos resultados en la inhibición del biofilm son mostrados en las tablas 3A y 3B correspondiente a los patógenos de la enfermedad periodontal y acné, respectivamente.

Tabla 5A.- Efecto de nanopartículas de quitosano cargadas con (NQoDP) y sin (NQo) aceite esencial DP sobre la inhibición del biofilm de agentes etiológicos de la enfermedad periodontal.

<i>Porfiromonas gingivalis</i>				<i>A. actinomycetemcomitans</i>			
NQo (mg/mL)	Biofilm inhibición (%)	NQDP (mg/mL)	Biofilm inhibición (%)	NQo (mg/mL)	Biofilm inhibición (%)	NQDP (mg/mL)	Biofilm inhibición (%)
0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	22.21 ± 0.15	0.5	39.11 ± 0.51	0.5	10.10 ± 0.12	0.5	29.21 ± 0.11
1.0	23.28 ± 0.14	1.0	39.28 ± 0.22	1.0	10.82 ± 0.14	1.0	33.28 ± 0.13

1.5	25.25 ± 0.85	1.5	41.15 ± 0.25	1.5	14.52 ± 0.33	1.5	35.25 ± 1.08
3.0	38.44 ± 0.21	3.0	55.23 ± 0.11	3.0	30.12 ± 0.36	3.0	74.05 ± 0.12
6.0	42.33 ± 0.58	6.0	62.33 ± 0.32	6.0	51.23 ± 0.33	6.0	86.12 ± 0.58
12	65.13 ± 0.84	12	78.13 ± 0.44	12	75.10 ± 0.65	12	87.13 ± 0.44
24	81.23 ± 0.33	24	92.23 ± 0.53	24	88.96 ± 0.35	24	95.44 ± 1.12

Tabla 5B.- Efecto de nanopartículas de quitosano cargadas con (NQoDP) y sin (NQo) aceite esencial DP sobre la formación de biofilm (inhibición) del biofilm de agentes etiológicos de la enfermedad acné.

<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Propionibacterium acnes</i>			
NQo (mg/mL)	Biofilm inhibición (%)	NQDP (mg/mL)	Biofilm inhibición (%)	NQo (mg/mL)	Biofilm inhibición (%)	NQDP (mg/mL)	Biofilm inhibición (%)
0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	44.05 ± 0.83	0.5	73.28 ± 0.18	0.5	30.05 ± 0.12	0.5	47.56 ± 0.27
1.0	53.14 ± 0.84	1.0	74.05 ± 1.33	1.0	33.28 ± 0.84	1.0	53.28 ± 0.84
1.5	55.10 ± 0.65	1.5	75.00 ± 0.98	1.5	42.10 ± 0.65	1.5	55.10 ± 0.65
3.0	68.86 ± 0.35	3.0	88.16 ± 0.35	3.0	48.96 ± 0.35	3.0	68.96 ± 0.35
6.0	72.77 ± 0.58	6.0	88.36 ± 0.35	6.0	52.33 ± 0.58	6.0	82.33 ± 0.18
12	95.18 ± 0.85	12	96.89 ± 1.18	12	65.13 ± 0.85	12	95.13 ± 0.11
24	96.21 ± 0.29	24	98.96 ± 1.92	24	78.23 ± 0.29	24	95.23 ± 0.19

Respecto al biofilm de los principales patógenos de la enfermedad periodontal (*Porfiromonas gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*), los resultados evidenciaron (Tabla 3A) el potente efecto de inhibición en la formación de biofilm que presentó la formulación de nanopartículas con aceite esencial encapsulado (NQoDP), en donde 3,0 (mg/mL) es requerido para inhibir sobre el 55.23 ± 0.11 en *P. gingivalis* y un 74.05 ± 0.12 en *A. actinomycetemcomitans*, mientras que a la misma concentración las NQo inhiben la formación del biofilm en un 38.44 ± 0.21 y 30.12 ± 0.36, respectivamente de cada cepa. Al aplicar una concentración de 24 mg/mL de las NQoDP inhiben sobre el 90% la formación del exopolisacárido en ambas bacterias, siendo significativamente superior en el orden de un ~7.5% mas potente que las nanopartículas control (NQo).

Por otro lado, las cepas responsables de la enfermedad del acné, evidenciaron mayor sensibilidad y la formación del biofilm fue evidenciada en menores concentraciones de NQoDP, en donde se evidencio que 0.5 mg/mL son suficientes para inhibir el 73.28 ± 0.18 % en *Staphylococcus aureus*, mientras que para el caso de *P. acnes*, al aplicar 1.5 mg/mL de la formulación con AE encapsulado se logra una inhibición de 55.10 ± 0.65 %. Luego de la aplicación de la mayor concentración evaluada en este ensayo, ambas cepas mostraron una inhibición en la capacidad de formación de exopolisacárido superior al 95.23 ± 0.19%. Lo que evidencia que el aceite esencial genera un incremento de la actividad de las NQo por si sola.

La capacidad de inhibición del biofilm del quitosano y en su estado nanoparticulado ha sido descrita luego de la evaluación en diferentes cepas. La presencia del grupo amino protonado (NH₃⁺) de las unidades de *N*-acetilglucosamina ha sido atribuida como un disruptor en la

formación del glucocálix que forma estructuralmente el biofilm (Rivera y cols., 2020). Por otro lado, la matriz de la nanopartícula de quitosano, le permite interactuar electrostáticamente con la carga negativa del biofilm, componentes de EPS, DNA resultando en un efecto de inhibición de la formación del biofilm (Jo y cols., 2018. En este contexto, Felipe y cols., (2019), han reportado la inhibición del biofilm en bacterias de interés clínico hasta en un 92 %.

El efecto sinérgico del aceite esencial en la inhibición del biofilm de las cepas ensayadas, se puede atribuir a otro proceso descrito para el mecanismo de acción de las nanopartículas de quitosano, en el cual la estructura nanoparticulada del quitosano le permite ingresar a la matriz del glucocálix bacteriano incrementando la regulación negativa de los genes relacionados a la formación de estructuras bacterianas (Khan y cols., 2020). Por otro lado, se ha descrito la capacidad de disrupción de estructuras bacterianas por parte de aceites esenciales y terpenoides, los cuales incrementan la permeabilidad de la pared y membranas bacterianas (Orellano y cols., 2019), así como la inhibición en la síntesis de ATP, limitando la incorporación y metabolización de nutrientes, oxígeno y otros factores requeridos para la formación del biofilm (Mellegard y cols., 2011)

6.- Actividad antimicrobiana de los geles formulados con NQo-TPP

Se determinó la capacidad antimicrobiana de los geles formulados por la adición de diferentes proporciones de aceites esenciales nanoencapsulados en matrices de nanopartículas elaboradas a partir de quitosano de bajo peso molecular y tripolifosfato de sodio (NQoTPP). Fueron ensayadas concentraciones crecientes (desde 0.5 hasta 125 mg/mL) de las diferentes formulaciones elaboradas **las cuales contenían 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 % de NQoTPP en su composición**. Estos resultados se muestran en la **Tabla 3**. Se evidencia que la concentración requerida para inhibir el desarrollo de las cepas bacterianas disminuye en función a que incrementa la concentración de activos nanoencapsulados en la matriz del gel, por tanto, se evidencia una actividad antimicrobiana directamente proporcional a la presencia del nanoformulado en la matriz (% p/v). La CIM encontrada para la formulación que contiene 0.2 % (p/v) resultó ser más eficiente en la cepa *Porphyromonas gingivalis*, en donde fue requerido 13.5 mg/mL para poder inhibir en un 82.23 ± 2.25 % la carga bacteriana respecto al control de viabilidad (sin activo en el cultivo), mientras que en esta concentración que *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* requiere 19.5 mg/mL de la misma formulación para inhibir al 85.22 ± 1.15 % de la población inicial de los agentes etiológicos de la enfermedad periodontal, las cepas de *Streptococcus* son inhibidos al exponerlos entre 15.5 y 18.5 mg/mL de esta formulación, mostrando una leve tolerancia respecto a *Porphyromonas* y *Agreggatibacter*. Un comportamiento similar de efectividad antimicrobiana fue evidenciado en los agentes etiológicos del acné al ser enfrentadas a esta concentración tanto para *P. acnés* y *S. aureus* es requerido 17.5 y 16.5 mg/mL de esta formulación para inhibir sobre el 80 % de la carga bacteriana inicial. La CIM de los geles disminuye respecto incrementa la proporción del nanoformulado en todas las cepas ensayadas.

Se evidencia que la CIM del gel formulado con 0.4% (p/v) de NQo-TPP varía entre 10 a 11.5 mg/mL dependiendo de la cepa ensayada, en donde *Propionibacterium acnés* requiere 11.5 mg/mL para inhibir el crecimiento, mientras que *Porphyromonas gingivalis* solo requiere 10,0 mg/mL para inhibir el 81.23 ± 2.35 % de la carga bacteriana. Interesantemente los controles (C1 y C2) que no

contienen AE nanoencapsulados en Q-TPP también evidenciaron la capacidad de inhibir el crecimiento de todas las cepas ensayadas, lo cual se atribuye a la capacidad antimicrobiana reportada ampliamente para las matrices elaboradas a partir de quitosano utilizados para diversos propósitos y aplicaciones (Medina y cols., 2018). Sin embargo, la presencia de los AE nanoencapsulados en Q-TPP evidencian el efecto antimicrobiano sinérgico que permite la combinación de nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular y aceites esenciales (Caro y cols., 2016), ya que la CIM de estas formulaciones es entre 4 a 6 veces superior. Este efecto sinérgico de la incorporación del nanoformulado con AE a la matriz, es evidenciado por la actividad mostrada en la CBM (**Tabla 3**). Las concentraciones bactericidas requeridas para matar el 99.9 % de la población inicial de todos los cultivos bacterianos de las cepas ensayadas, tanto los agentes etiológicos de la enfermedad periodontal (*P. gingivalis*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* y *A. actinomycetemcomitans*) como los microorganismos descritos en la etiología del acné (*P. acnés* y *S. aureus*) disminuye la cantidad (mg/mL) requerida del gel en función al incremento de las proporciones de los AE nanoencapsulados en quitosano y TPP, mientras que los geles control (C1 y C2), los cuales no tienen incorporado los activos, no evidenciaron actividad bactericida en las condiciones ensayadas (A.N.E, actividad no encontrada). Al igual que en la CIM, la CBM de estos geles (con 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 %p/v) requerida para ejercer el efecto bactericida es mayor que los AE extraídos y ensayados en su estado puro frente a los microorganismos evaluados en este ensayo (datos reportados en el informe anterior), los AE puros evidenciaron que el para los agentes etiológicos de la enfermedad periodontal, el extracto con mejor desempeño corresponde al AV ya que requiere entre 2.34 a 4.97 mg/mL para inhibir completamente la proliferación de *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis* y *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, siendo esta última la más susceptible a este extracto. Mientras que para los geles fue requerido entre 55.5 a 20.5 mg/mL en función a la cepa y al tipo de formulación. Respecto a los patógenos del acné, el AE con mejor desempeño descrito en el informe anterior para inhibir completamente la proliferación de *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus aureus* corresponde a D.P en donde es requerido entre 2.45 a 4.93 mg/mL para ejercer un efecto bactericida mientras que las concentraciones requeridas de los geles para observar este mismo efecto 35.5 y 25.5 mg/mL en función al tipo de formulación. Sin embargo, estas formulaciones evidencian excelentes actividades antimicrobianas, ya que son capaces de inhibir la proliferación bacteriana (CIM) con desempeños excelentes de rendimiento entre los 11.5 y 10.0 mg/mL de la formulación fisicoquímica más estable (0.4% p/v) resultando eficiente tanto para los agentes etiológicos del acné y la enfermedad periodontal, cuyas concentraciones de CIM evidenciadas en estos ensayos son muy próximas a las CIM reportadas por los antibióticos estándar para controlar la proliferación de *P. acnés* como es clindamicina y vancomicina (Crane y cols., 2013), mientras que si bien es requerido concentraciones mayores de los que las concentraciones a los antibióticos descritos para el tratamiento de la enfermedad periodontal, en donde Gamboa y cols (2014) indican que la CIM de tetraciclina y metronidazol, antibióticos indicados para el tratamiento periodontal, es entre 0.015 a 4 µg/mL, se ha evidenciado resistencia a estos antibióticos, incluido clorhexidina de muchas de estas cepas clínicas, aisladas desde pacientes con enfermedades recurrentes y eventuales reacciones adversas de estos antibióticos e interacciones medicamentosas en pacientes con tratamientos farmacológicos con otros medicamentos para el tratamiento de la diabetes o hipertensión, en donde es requerido la investigación e innovación en nuevos productos naturales con actividad antimicrobiana y la capacidad de no gatillar mecanismos de resistencia en

diversos patógenos (Milovanova-Palmer y Pendry, 2018). En este contexto, la CDC (US Centers for Disease Control and Prevention) ha estimado que la resistencia a los antibióticos convencionales causa sobre 2 millones de enfermedades y sobre 23000 muertes anualmente, y se proyecta que estas cifras incrementen próximamente (CDC, 2019), es por ello la necesidad de contar con alternativas antimicrobianas de origen natural para el control y tratamiento de enfermedades relevantes a nivel de salud pública como la enfermedad periodontal y el acné.

Tabla 6.1: CIM y CBM de geles con AE nanoencapsulados en matrices NQ-TPP.

Cepa	Formula (%NQoTPP)	CIM gel (mg/mL)						CBM (mg/mL)					
		0.2	0.3	0.4	0.5	C1	C2	0.2	0.3	0.4	0.5	C1	C2
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		13.5	13.5	10.0	9.5	45.0	50.0	30.5	30.0	25.5	25.0	A.N.E	A.N.E
<i>Streptococcus gordonii</i>		15.5	12.5	10.5	8.5	35.5	35.0	40.5	35.5	25.0	20.5	A.N.E	A.N.E
<i>Streptococcus sanguinis</i>		18.5	13.5	10.5	9.0	35.0	35.0	40.5	30.0	20.0	15.5	A.N.E	A.N.E
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>		19.5	13.5	10.5	9.0	60.0	55.0	55.5	41.0	30.0	20.5	A.N.E	A.N.E
<i>Propionibacterium acnes</i>		17.5	15.5	11.5	9.0	40.5	45.0	55.5	45.5	35.0	30.5	A.N.E	A.N.E
<i>Staphylococcus aureus</i>		16.5	14.5	11.0	10.5	35.0	40.0	40.5	35.0	30.0	25.5	A.N.E	A.N.E

A.N.E= Actividad No Encontrada

7.- Actividad antimicrobiana de geles con 0.4% (p/v) en diferentes condiciones de almacenamiento (estabilidad)

Dado las características fisicoquímicas de la formulación y el desempeño eficiente en la capacidad antimicrobiana **de la formulación del gel con 0.4% (p/v)** de AE nanoencapsulados en NQ-TPP fue determinado la CIM y la CBM y la ZIC de los geles almacenados a 25 °C, 30°C y 40°C. Los resultados se muestran en la **Tabla 7.1** y **Tabla 7.2**, para el caso del ZIC. **Los resultados evidenciaron que no existen diferencias significativas entre las CIM y las CBM de las formulaciones almacenadas durante 4 semanas a diferentes temperaturas al comprarlas con las formulaciones frescas (Tabla 6.1).** Al igual que la preparación de los geles frescos, independiente al tiempo y temperatura de almacenamiento, esta mantiene la capacidad bacteriostática y bactericida para todas las cepas ensayadas.

Tabla 7.1.- Actividad antimicrobiana de la formulación 0.4% en diferentes temperaturas de almacenamiento. Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05).

Cepa/Temperatura almacenamiento gel	CIM Activo (mg/mL)			CBM (mg/mL)		
	25°C	30°C	40°C	25°C	30°C	40°C
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10.0 ^a	10.0 ^a	10.0 ^a	25.5 ^b	25.5 ^b	25.5 ^b
<i>Streptococcus gordonii</i>	10.5 ^a	10.5 ^a	10.5 ^a	25.0 ^b	25.0 ^b	25.0 ^b
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10.5 ^a	10.5 ^a	10.5 ^a	20.0 ^b	20.0 ^b	20.0 ^b
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10.5 ^a	10.5 ^a	10.5 ^a	30.0 ^b	30.0 ^b	30.0 ^b
<i>Propionibacterium acnes</i>	11.5 ^a	11.5 ^a	11.5 ^a	35.0 ^b	35.0 ^b	35.0 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.0 ^a	11.0 ^a	11.0 ^a	30.0 ^b	30.0 ^b	30.0 ^b

La Tabla 7.2 muestra los resultados obtenidos desde el análisis de inhibición de la zona de crecimiento, tanto de la formulación almacenada a diferentes temperaturas (25, 30 y 40°C) durante un mes, así como la ZIC de la formulación fresca. Los resultados evidencian que, al igual que los resultados obtenidos en la CIM y CBM, la capacidad inhibitoria del gel, no se ve afectada por la temperatura y el almacenamiento, todos los ensayos fueron realizados mediante la carga en sensidisco blanco de 8,0 mg sobre la superficie del agar.

Estos resultados evidencian que la cepa más susceptible al desarrollo durante la exposición directa de la formulación corresponde a *Propionibacterium acnés* seguido por *Porphyromonas gingivalis* lo que promete ser útil en el control y modulación negativa de la proliferación de estos patógenos, principales microorganismos de la enfermedad del acné y periodontal, respectivamente.

Tabla 7.2: Determinación de la Zona de Inhibición del crecimiento de la formulación 0.4% en diferentes temperaturas de almacenamiento. Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05).

	Zona de Inhibición del Crecimiento (mm)			
	Fresco	Almacenamiento (30 días)		
Cepa/Temperatura almacenamiento gel		25°C	30°C	40°C
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5.25 ± 0.12 ^a	5.18 ± 0.22 ^a	5.12 ± 0.13 ^a	5.31 ± 0.44 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	2.12 ± 0.33 ^b	2.22 ± 0.44 ^b	2.18 ± 0.52 ^b	2.17 ± 0.44 ^b
<i>Streptococcus sanguinis</i>	4.18 ± 0.16 ^c	4.13 ± 0.12 ^c	4.21 ± 0.11 ^c	4.23 ± 0.16 ^c
<i>Agreggatibacter actinomycetemcomitans</i>	3.75 ± 0.44 ^d	3.72 ± 0.26 ^d	3.80 ± 0.36 ^d	3.69 ± 0.39 ^d
<i>Propionibacterium acnes</i>	6.23 ± 0.89 ^e	6.18 ± 0.65 ^e	6.35 ± 0.32 ^e	6.44 ± 0.36 ^e
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.23 ± 0.55 ^c	4.20 ± 0.45 ^c	4.25 ± 0.21 ^c	4.23 ± 0.18 ^c

Respecto a la evaluación de la formación del biofilm de las cepas ensayadas en este estudio, la técnica de cristal violeta, ampliamente descrita como la mejor estrategia analítica *in vitro* para cuantificar el biofilm (Orellano y cols., 2019 y Rivera y cols., 2020), no fue posible determinar la capacidad de inhibición del biofilm de los geles formulados, debido a que la sensibilidad del ensayo no permite distinguir entre la señal medida (OD₅₇₀) en el equipo TECAN Infinite PRO m200, la interacción entre el exopolisacárido bacteriano (capa mucoide o *slime*) de la matriz del gel formulado. Se propone evaluar por la técnica en placa utilizando el agar rojo Congo modificado (CRA)

Conclusiones

Los resultados obtenidos en estos análisis han evidenciado.

1.- Las nanoemulsiones fabricadas con los 3 tipos de aceites DP, DG y AV poseen una actividad bactericida relativamente baja (39.55 ± 2.21 al 62.23 ± 4.15 %) utilizando concentraciones casi 10 a 20 veces superiores respecto a sus respectivos aceites en estado puro y estas nanoemulsiones carecen de actividad bactericida bajo las condiciones ensayadas.

2.- Las nanopáticulas de quitosano de bajo peso molecular fabricadas por gelificación iónica con TPP las cuales contenían el aceite DP encapsulado (NQoDP) evidencian un potente efecto bactericida y bacteriostático, incrementando la actividad del AE en estado puro, mostrando un importante efecto sinérgico tanto en la inhibición del crecimiento, proliferación y desarrollo de los principales agentes etiológicos de la enfermedad periodontal y el acné.

3.- Las nanopartículas de quitosano con DP encapsulado (NqoDP) son exhiben una excelente habilidad para inhibir sobre el 90% la formación del biofilm de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnés*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* al aplicar entre 12 y 24 mg/mL del nanoformulado, actividad determinada mediante la técnica de cristal violeta.

4.- Por la técnica de cristal violeta, ampliamente descrita como la mejor estrategia analítica *in vitro* para cuantificar el biofilm (Orellano y cols., 2019 y Rivera y cols., 2020) , no fue posible determinar la capacidad de inhibición del biofilm de los geles formulados, debido a que la sensibilidad del ensayo no permite distinguir entre la señal medida (OD_{570}) en el equipo TECAN Infinite PRO m200, la interacción entre el expololisacarido bacteriano (capa mucoide o *slime*) de la matriz del gel formulado. Se propone evaluar por la técnica en placa utilizando el agar rojo Congo modificado (CRA)

5.- Los geles formulados con 4% (p/v) del nanoformulado exhiben una excelente capacidad bacteriostática y bactericida y de inhibición del crecimiento, independiente de la temperatura de almacenamiento y el tiempo de preparación, indicando una adecuada estabilidad de los activos que permiten el control de la proliferación de los patógenos relevantes en el acné y la enfermedad periodontal.

Referencias.

Ambrosio, C., Alencar, S., de Sousa, R., Moreno, A., Da Gloria, E. (2017). Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*. 97, 128-136.

Caro, N.; Medina, E.; Díaz-Dosque, M.; López, L.; Abugoch, L.; Tapia, C. Novel active packaging based on films of chitosan and chitosan/quinoa protein printed with chitosan-tripolyphosphate-thymol nanoparticles via thermal ink-jet printing. *Food Hydrocoll.* 2016, 52, 520–532. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.07.028

Crane, J., Hohman, D., Nodzo, S., Duquin, T. (2013). Antimicrobial Susceptibility of *Propionibacterium acnes* Isolates from Shoulder Surgery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57 (7). 33424-26.

CDC. Antibiotic/Antimicrobial Resistance

https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html 2019. Google Scholar.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th ed.; CLSI supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2017.

Divya, K.; Vijayan, S.; George, T.K.; Jisha, M.S. Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity. *Fibers Polym.* **2017**, *18*, 221–230. doi:10.1007/s12221-017-6690-1.

Eke, G. Thornton-Evans, B. Dye, R. Genco. (2012). Advances in surveillance of periodontitis: the centers for disease control and prevention periodontal disease surveillance Project. *J. Periodontol.*, *83*, 1337-1342

Felipe, V.; Breser, M.L.; Bohl, L.P.; Rodrigues da Silva, E.; Morgante, C.A.; Correa, S.G.; Porporatto, C. Chitosan disrupts biofilm formation and promotes biofilm eradication in *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *126*, 60–67. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.159.

Gamboa, F., Acosta, A., Garcia, D., Vrlosa, J., Araya, N., Ledergerber, R. (2014). Occurrence of porphyromonas gingivalis and its antibacterial susceptibility to metronidazole and tetracycline in patients with chronic periodontitis. *Acta Odontol Latinoam.* *27*(3): 137-44.

Haididi. M., Pouramin, S., Adinepour, F., Jafari, S. (2020). Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. *Carbohydrate Polymer*, *236*(15). 1160-75.

Holmberg, R. Lood, M. Morgelin, B. Soderquist, E. Holst, M. Collin, B. Christensson, M. Rasmussen (2009). Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. *Clin. Microbiol. Infect.*, *15* (8), 787-795.

Hudzicki, J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. American Society for Microbiology, December 2009, pp. 1–13. Available online: <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>

Joo, S.H.; Aggarwal, S. Factors impacting the interactions of engineered nanoparticles with bacterial cells and biofilms: Mechanistic insights and state of knowledge. *J. Environ. Manag.* **2018**, *225*, 62–74. doi:10.1016/j.jenvman.2018.07.084.

Khan, F.; Pham, D.T.N.; Oloketuyi, S.F.; Manivasagan, P.; Oh, J.; Kim, Y.M. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *185*, 110627. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110627.

Liu, H.; Du, Y.; Wang, X.; Sun, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *95*, 147–155. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022.

Limbago, B. M100-S11, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Newsl.* *2001*, *23*, 49. doi:10.1016/s0196-4399(01)88009-0.

Medina E, Caro N, Abugoch L, Gamboa A, Díaz-Dosque M, Tapia C. (2018). Chitosan thymol nanoparticles improve the antimicrobial effect and the water vapour barrier of chitosan-quinoa protein films. *Journal of Food Engineering*. 240:191-198.

Mellegard, H.; Strand, S.P.; Christensen, B.E.; Granum, P.E.; Hardy, S.P. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *148*, 48–54. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.023.

Milanova-Palmer, J., Pendry, B. (2018). Is there a role for herbal medicine in the treatment and management of periodontal disease?. *Journal of Herbal Medicine*, 12. 33-48.

Orellano, M.S.; Isaac, P.; Breser, M.L.; Bohl, L.P.; Conesa, A.; Falcone, R.D.; Porporatto, C. Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of the native polymer against bovine mastitis pathogens. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *213*, 1–9. doi:10.1016/j.carbpol.2019.02.016.

Paju, F. (2007). Oral Biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis.*, 13. 508-12.

Rivera, P., Bruna, T., Alarcón, C., Cayupe, B., González-Casanova, J., Rojas-Gómez, D., Caro, N. (2020). Antimicrobial and antibiofilm capacity of chitosan nanoparticles against wild type strain of *Pseudomonas* sp. isolated from milk of cows diagnosed with bovine mastitis. *Antibiotics*. doi:10.3390/antibiotics9090551.

Wei, C.; Ni, W.; Cai, X.; Zhao, J.; Cui, J. Evaluation of trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), minocycline, tigecycline, moxifloxacin, and ceftazidime alone and in combinations for sxt susceptible and sxt-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* by in vitro time-kill experiments. *PLoS ONE* 2016, 11, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0152132.

INFORME DE AVANCE

NANOEMULSIÓN DE ACEITE ESENCIAL DEL CIPRÉS DE LAS GUAITECAS

Elaboración y Caracterización en Tamaño, Índice de Polidispersidad y Potencial Z

Proyecto: Agregación de valor al aceite esencial, obtenido a partir de residuos madereros del ciprés de las Guaitecas, aprovechando su potencial microbiano en aplicaciones del área dental y cosmética.

Código: PYT-2017-0853

Preparado por

Alan Palomino Calderón

Revisado y editado por

Cristian Tapia

Enero 2021

INDICE

1.-	
RESUMEN.....	
.....	3
2.- MATERIALES Y	
METÓDO.....	
.....	3
2.1.-	
MATERIALES.....	
.....	3
2.2.- ELABORACIÓN DE NANOEMULSIONES DE ACEITE ESENCIAL DEL CIPRÉS DE LAS	
GUAITECAS.....	
.....	3
2.2.1.- MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN	
ESPONTÁNEA.....	3
- FORMULACIÓN DE NANOEMULSIONES DE ACEITE ESENCIAL (CdG)/CATEGORÍAS: “AV”	
(ÁRBOL VIVO); “DP” (DIÁMETRO PEQUEÑO); “DG” (DIÁMETRO	
GRANDE).....	3
2.3.- CARACTERIZACIÓN DE NANOEMULSIONES DE ACEITE ESENCIAL	
CdG.....	4
2.3.1.- DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD (PDI) Y POTENCIAL Z DE	
NANOEMULSIONES DE ACEITE ESENCIAL	
CDG.....	4
3.-	
RESULTADOS.....	
.....	4
4.-	REFERENCIA
BIBLIOGRÁFICA.....	
.....	6

1.- RESUMEN

Se fabricaron nanoemulsiones de aceite esencial del ciprés de las Guaitecas (CdG) por el método de emulsificación espontánea y se caracterizaron de acuerdo a su tamaño hidrodinámico, índice de polidispersidad y potencial Z.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Materiales

- Miglyol 812
 - Agua ultra purificada Milli-Q
 - Tween 80®
 - Muestras de aceite (CdG) obtenidas por hidrodestilación, código de muestras
- M1/ troncos de diámetro pequeño/ (DP); M2/ troncos de diámetro grueso (DG); M3 troncos de árbol vivo (AV); M4/ Terpineol (estándar usado para el método mediante HPLC-DAD).

2.2.- Elaboración de nanoemulsiones de aceite esencial del ciprés de las guaitecas (CdG)

2.2.1.- Método de emulsificación espontánea.

El método descrito (Chang et al; 2013) se aplicó con algunas modificaciones.

Se preparó la fase oleosa, mezclando 1,375 mL de Miglyol 812 y 1,125 mL de aceite esencial CdG (por categoría: AV/DP/DG) con agitación constante (500 rpm por 15 min), posteriormente se incorporó 2,5 mL del agente surfactante Tween 80 por 30 minutos a 500 rpm. Luego se adicionó esta mezcla por goteo a la fase acuosa (agua ultrapura Milli-Q) a través de una bomba de infusión (modelo KDS200, KD Scientific) con un flujo de 0,5 mL/min en agitación constante (1200 rpm) y temperatura ambiente. Finalmente las muestras se dializaron y almacenaron en refrigeración a

4°C. Del mismo modo se elaboraron nanoemulsiones control (sin aceite esencial CdG) en iguales condiciones.

La razón del agente surfactante y la fase oleosa (SOR) de las formulaciones con aceite esencial CdG se ajustó a 1, obteniéndose la proporcionalidad de 10% (v/v) de fase oleosa (Miglyol 812 y Aceite esencial CdG), 10% (v/v) de surfactante (Tween 80) y 80% (v/v) de fase acuosa (agua ultrapura Milli-Q), considerándose esta por el volumen final a gotear y un volumen aproximado de pérdida de 0,4 a 0,9 mL de la fase oleosa. Las formulaciones finales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N°1. Formulaciones Nanoemulsiones de Aceite CdG por Categoría y control

Componentes	Nanoemulsión control (Ne)	Nanoemulsión AV (NAV)	Nanoemulsión DP (NDP)	Nanoemulsión DG (NDG)
Miglyol 812	1,375 mL	1,375 mL	1,375 mL	1,375 mL
Aceite CdG	0	1,125 mL	1,125 mL	1,125 mL
Tween 80	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Agua Milli-Q	13,9 mL	16 mL	16 mL	16 mL
Pérdida Aprox.	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2
Vol. Final	17,3 mL	20 mL	20 mL	20 mL

2.3.- Caracterización de nanoemulsiones de aceite esencial CdG.

2.3.1.- Determinación del tamaño hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z de nanoemulsiones de aceite esencial CdG.

Se establecieron los valores de estos parámetros mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), a través del equipo Zetasizer Nano ZS-90 (Malvern Instruments). Las muestras fueron diluidas en agua ultrapura Milli-Q a 1/10 de su concentración inicial, después fueron cargadas en celdas capilares plegadas (modelo DTS1070) de 1 mL. Se tomaron 3 mediciones por muestra en tiempos diferentes por triplicado (día 1, 15, 30). Las condiciones fueron a 25°C, dispersante: agua y longitud de onda de láser: 633 nm. Los resultados se indican en la tabla N°2.

3.- Resultados

Tabla N°2. Tamaño, índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z de nanoemulsiones de aceite esencial CdG (Por categorías) obtenidas por emulsificación espontánea.

Formulación	Día	Tamaño (Nm)	PDI	Potencial Z (mV)
Ne	1	41,68 ± 1,1*	0,27 ± 0,0*	-11,98 ± 2,5
	15	39,80 ± 0,6*	0,21 ± 0,0*	-16,67 ± 1,8
	30	43,43 ± 0,4*	0,19 ± 0,0**	-14,73 ± 2,1
NAV	1	44,63 ± 0,9	0,21 ± 0,0	-14,93 ± 0,2
	15	48,10 ± 0,6	0,16 ± 0,6	-13,53 ± 1,1
	30	51,59 ± 0,7	0,17 ± 0,7	-13,50 ± 2,5
NDP	1	39,89 ± 0,6*	0,21 ± 0,0	-17,40 ± 1,4
	15	43,73 ± 0,4*	0,18 ± 0,0	-14,17 ± 3,2
	30	46,63 ± 0,1*	0,19 ± 0,0**	-14,77 ± 0,6
NDG	1	53,98 ± 0,5	0,20 ± 0,0	-14,40 ± 1,0
	15	56,15 ± 0,9	0,17 ± 0,0	-13,20 ± 0,5
	30	60,25 ± 0,2	0,16 ± 0,0	-15,00 ± 2,0

* indica diferencias significativas intergrupos (p<0.05)

Los resultados obtenidos muestran que todas las formulaciones presentaron un tamaño hidrodinámico en el rango de 40 a 60 nm, un PDI en el rango de 0,16 a 0,27, y un potencial zeta negativo en el rango de -17 a -12 mV. De acuerdo a lo descrito en la sección 5 del informe resultados específicos (RE), OE 3 RE 2, se cumple con la meta propuesta allí descrita (Tamaño de partícula de menor a 300 nm, PDI (índice de polidispersidad) entre 0,1-0,3).

Se estudió la estabilidad de las nanoemulsiones a los días 1, 15 y 30. Existieron diferencias significativas (ANOVA) del tamaño en relación con el tiempo - intragrupos, indicando un moderado aumento de tamaño de las nanogotas con el transcurso del tiempo. Por otro lado, las nanoemulsiones control (Ne) y la nanoemulsión categoría DP (NDP) no presentaron diferencias en el tamaño de las nanogotas entre sí, y éstas fueron significativamente menores comparadas con las nanoemulsiones categorías AV (NAV) y DG (NDG).

Respecto al índice de polidispersidad (PDI), hubo diferencias significativas en relación con el tiempo, mostrando una disminución del índice con el transcurso del tiempo – intragrupos. Observándose esta tendencia en la nanoemulsión control (Ne), que presentó valores significativamente menores por día; NAV y NDG mostraron índices significativamente menores entre los días 1 a 15 y 1 a 30; NDP obtuvo valores significativamente menores del día 1 a 15. En cuanto a la comparación de los índices intergrupos, solo la nanoemulsión control (Ne) obtuvo

valores significativamente mayores respecto a las demás nanoemulsiones, exceptuando en el día 30, donde muestra similar índice con el obtenido por NDP.

No hubo diferencias significativas en referencia al potencial Z intergrupos. Del mismo modo, intragrupos, solo la nanoemulsión control (Ne) presentó valores significativamente menores del día 1 a 15.

En general se puede concluir que las nanoemulsiones tienen un tamaño y polidispersidad adecuada, si bien el valor absoluto del potencial zeta (17-12 mV) es bajo lo que puede llevar a pensar en problemas de estabilidad, el estudio de estabilidad realizado por 30 días, muestra que los cambios de tamaño, PDI y potencial zeta son moderados, y que permite un tiempo razonable (30 días), para la fabricación del producto final que corresponde a un gel de la nano suspensión.

Los resultados de los parámetros de encapsulación se describen en el anexo método de determinación de aceite de ciprés de las Guaitecas mediante HPLC-DAD, sección determinación de la encapsulación de aceite en la nanoemulsión.

Referencia Bibliográfica

1. Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ. Physicochemical Properties and Antimicrobial Efficacy of Carvacrol Nanoemulsions Formed by Spontaneous Emulsification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013; 61(37):8906-13.

Preparación y caracterización de nanosuspensión de QTPP

realizado por Leonor Salamanca

revisado y editado por Cristian Tapia

Códigos de muestras

M1/ troncos de diámetro pequeño/ (DP); M2/ troncos de diámetro grueso (DG); M3 troncos de árbol vivo (AV); M4/ Terpeneol (estándar usado para el método mediante HPLC-DAD.

Muestras de aceite obtenidas por hidrodestilación

Muestras	fecha de extracción	peso viruta (g)	volumen de aceite extraído (ml)	%
tronco diámetro grueso (M2, DG)	2-oct	925	30	3,2
tronco diámetro pequeño (M1, DP)	7-oct	1895	45	2,4
tronco árbol vivo (M3, AV)	8-oct	1570	75	4,8
tronco diámetro pequeño (M1, DP)	9-oct	400	13	3,3

Encapsulación de aceite esencial de ciprés en Q-TPP

La formación de una nanosuspensión acuosa de quitosano/TPP mediante gelificación ionotrópica ocurre por la interacción electrostática entre los grupos -NH_3^+ del quitosano y los grupos $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ y $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{-4}$ provenientes de la disociación del TPP en solución acuosa. Las nanopartículas presentan un tamaño hidrodinámico en el rango de 100 a 350 nm y una morfología esférica de acuerdo a evidencia de microscopía de transmisión electrónica y de fuerza atómica. (Goycoolea y cols., 2009., Caro, 2015, Gan y cols., 2005). Diversos compuestos han logrado ser encapsulados mediante este método, entre ellos figuran agentes antidiabéticos, drogas antiinflamatorias, antibióticos, proteínas y enzimas, probióticos, metales, antioxidantes, aceites esenciales (Racovita y cols., 2009)

Metodología

Basado en el método de Calvo y cols., (1997) con modificaciones. Se preparó una solución de quitosano de bajo peso molecular al 0,3% (p/v) en ácido acético 1% (p/v) a esta solución se le incorpora el aceite esencial luego se deja agitando durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se filtra. De forma paralela, se prepara una solución de tripolifosfato sódico al 0,1% (p/v).

Se mezcla la solución de quitosano con la de TPP en una relación de 2:1 mediante goteo (1,8 mL/min) por medio de una bomba de infusión en agitación constante. La dispersión obtenida se centrifuga a $21.000 \times g$ a 14°C por 30 min y se conserva el sobrenadante. El sobrenadante, para eliminar los componentes que no reaccionaron, fue dializado en agua a tres tiempos (1 , 2 y 24 h).

Resultados

Se evaluó el tamaño hidrodinámico, PDI y potencial Zeta de nanosuspensión QTPP, cargadas con aceite (muestras M1 a M3) y terpineol (M4), Los resultados se muestran en tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de tamaño hidrodinámico, PDI y potencial Zeta de nanosuspensión QTPP.

	Z-avera ge	PDI	Potencial Zeta
M1	361,6	0,458	47,2
	299,7	0,458	44,7
	316,9	0,354	46
promedio	326,1	0,4	46,0
DS	32,0	0,1	1,3

M2	311,3	0,499	47,6
	329,7	0,364	46,9
	306,6	0,473	48,1
promedio	315,9	0,445	47,5
DS	12,2	0,1	0,6

M3	278,2	0,444	43,7
	273,5	0,492	47,3
	271,5	0,506	48,8
	274,4	0,481	46,6
DS	3,4	0,033	2,6

M4	358	0,493	45,5
	344,2	0,579	46,6
	343,8	0,544	48,6
promedio	348,7	0,539	46,9
DS	8,1	0,043	1,6

Los resultados indican que el rango de tamaño hidrodinámico varía entre 274-349 nm, el PDI entre 0,40 y 0,54, y el potencial zeta entre +46,0 y +47,5. Dichos valores están de acuerdo a lo descrito en la literatura (Goycoolea y cols., 2009., Caro, 2015, Gan y cols., 2005). También de acuerdo a lo descrito en la sección 5 del informe resultados específicos (RE), OE 3 RE 1, se cumple con la meta propuesta allí descrita (Tamaño de partícula de alrededor de 300 nm PDI (índice de polidispersidad) entre 0,4-0,6 y potencial zeta de +30-+50 mV).

La eficiencia de encapsulación y la carga fue muy baja, cuando se agregó directamente el aceite a la solución de quitosano (resultados no mostrados). Para mejorar este resultado, se modificó el procedimiento original de la siguiente manera. Se mezcla el aceite o terpineol con Tween 80 en las siguientes relaciones 1:0.5 - 1:1 – 1:5 – 1:10 (v/), se agrega al agua destilada y se deja agitando de un día para otro, luego se le agrega ácido acético al 1% y quitosano al 0.3% p/v. En forma paralela se elabora una solución de tripolifosfato de sodio al 0.1% p/v. Las soluciones se mezclan en una relación Qo/Tpp 2:1 (v/v) mediante goteo (1,8 mL/min) por medio de una bomba de infusión en agitación constante. La dispersión obtenida se centrifugó a 21.000 x *g* a 14°C por 30 min y se conserva el sobrenadante.

Los resultados obtenidos de tamaño hidrodinámico, PDI y potencial zeta de sobrenadante sin dializar y dializado por 2 horas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2 Tamaño hidrodinámico, PDI y potencial zeta de sobrenadante sin dializar y dializado por 2 horas aceite o terpineol/tween 80 a 1/1, 1/5 y 1/10 (v/v)

**Aceite diámetro
pequeño**

Sin Dializar	Z-average	PDI	Potencial Zeta	2 hrs de dialisis	Z-average	PDI	Potencial Zeta
M1 1:1	195.4	0.326	55.1	M1 1:1	306.7	0.51	55.5
	187.2	0.406	54.9		297.8	0.52	49.3
	185.7	0.419	54.8		284.1	0.498	47.8
promedio	189.4	0.4	54.9	promedio	296.2	0.5	50.9
DS	5.2	0.1	0.2	DS	11.4	0.0	4.1

M2 1:5	209.8	0.521	46.5	M2 1:5	233.6	0.514	58.8
	195	0.581	52.5		215.4	0.572	56.3
	200.2	0.514	50		214.6	0.554	54.4
promedio	201.7	0.539	49.7	promedio	221.2	0.547	56.5
DS	7.5	0.0	3.0	DS	10.7	0.0	2.2

M3 1:10	122.2	0.678	52.6	1:10	178.4	0.646	52.8
	120	0.666	56.3		186.1	0.558	41.8
	117.1	0.661	57.3		182.3	0.552	41.2
promedio	119.8	0.668	55.4	promedio	182.3	0.585	45.3
DS	2.6	0.009	2.5	DS	3.9	0.053	6.5

Muestra de
terpineol

Sin Dializar	Z-average PDI		Potencial Zeta
1:1	288	0.506	42.6
	266.4	0.459	46.1
	261.2	0.461	43.4
promedio	271.9	0.5	44.0
DS	14.2	0.0	1.8

2 hrs de diálisis	Z-average PDI		Potencial Zeta
1:1	254.1	0.424	56.1
	271.1	0.455	52
	283.9	0.475	55.6
promedio	269.7	0.5	54.6
DS	14.9	0.0	2.2

1:5	188.2	0.534	55
	175.7	0.588	54.8
	170.1	0.577	55.7
promedio	178.0	0.566	55.2
DS	9.3	0.0	0.5

1:5	227.2	0.558	51.6
	230.3	0.493	53
	231.2	0.496	53.2
promedio	229.6	0.516	52.6
DS	2.1	0.0	0.9

1:10	140.7	0.626	50.4
	131.1	0.697	50.2
	146.1	0.654	51.1
promedio	139.3	0.659	50.6
DS	7.6	0.036	0.5

1:10	245.8	0.532	54.5
	221.7	0.549	55.7
	220.1	0.559	54.6
promedio	229.2	0.547	54.9
DS	14.4	0.014	0.7

Los resultados muestran en general que la diálisis produce un incremento del tamaño hidrodinámico en todas las muestras y a todas las proporciones aceite o terpineol/tween 80. Se recomienda dializar para eliminar el tripolifosfato que no reacciona. Este efecto se

observa en general, en el aumento positivo del potencial zeta de las muestras dializadas. Si consideramos los resultados de las muestras dializadas, vemos que para las muestras que contienen aceite el tamaño hidrodinámico medio varía entre 182 y 296 nm, el PDI entre 0,50 y 0,59, y el potencial zeta entre +45 y +57, cumpliendo con la muestra propuesta.

En el caso de las muestras con el estándar usado en el método HPLC-DAD, terpineol. Se obtuvo para las muestras dializadas. Tamaño hidrodinámico medio entre 230 y 270 nm, PDI entre 0,50 y 0,55, y potencial zeta entre +53 y +55.

Los resultados de los parámetros de encapsulación se describen en el anexo método de determinación de aceite de ciprés de las Guatecas mediante HPLC-DAD, sección determinación de la encapsulación de aceite en la nanosuspensión.

De acuerdo a los resultados de eficiencia de encapsulación se decide utilizar en la formulación una relación aceite/Tween 80 de 1/5. Con el objeto de aumentar la carga de aceite en el nanosistema se aumento la carga original 0,1 ml aceite /100 ml solución de Qo a 0,2-0,3-0,4 y 0.5. El efecto del aumento de aceite en el tamaño, PDI, y potencial Z se muestra en la tabla siguiente:

Muestra	Z-Average	PDI	Potencial Z
Qtpa aceite 0.1%	233,6	0,514	58,8
	215,4	0,572	56,3
	214,6	0,554	54,4
promedio	221,2	0,547	56,5
DS	10,7	0,030	2,2
Qtpa aceite 0.2%	187,6	0,537	54,7
	198,0	0,573	55,9
	217,7	0,533	55,8
promedio	201,1	0,548	55,5
DS	15,29	0,02	0,67
Qtpa aceite 0.3%	148,6	0,610	50,9
	152,0	0,636	50,9
	153,6	0,641	52,7
promedio	151,4	0,629	51,5
DS	2,55	0,02	1,04

Qtpp aceite 0.4%	132,9	0,721	48,2
	129,6	0,705	49,7
	130,8	0,716	51,8
promedio	131,1	0,714	49,9
DS	1,67	0,01	1,81
Qtpp aceite 0.5%	85,6	1,000	49,6
	95,4	1,000	53,9
	86,2	1,000	54,2
promedio	89,1	1,000	52,6
DS	5,49	0,00	2,57

Se puede ver claramente que con el incremento de aceite se reduce el tamaño hidrodinámico y aumenta la polidispersidad, el potencial Z no se afecta significativamente. De acuerdo a estos resultados, vemos que es posible realizar una carga de aceite de hasta 0,4%, sobre este valor el PDI es >1.0.