



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

**Estabilización de la curcumina mediante su
encapsulación en nanosistemas O/W: estudio de la
fotólisis y oxidación.**

Patrocinante

Dr. Felipe Oyarzún Ampuero

Departamento de Ciencias y
Tecnología Farmacéutica

Universidad de Chile

Director

Dr. Javier Morales Valenzuela

Departamento de Ciencias y
Tecnología Farmacéutica

Universidad de Chile

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Matías Francisco Silva Silva

Santiago de Chile

2017

Agradecimientos

Agradecer primeramente a Dios y a mi Familia, por todo el apoyo durante estos años de estudio, por su paciencia, confianza y los valores entregados, los cuales me han guiado durante este proceso. A mis padres, por su ejemplo de tenacidad y esfuerzo, por su comprensión y cariño, sin ellos esto no sería posible.

Dar las gracias a los Profesores Javier Morales Valenzuela y Felipe Oyarzún Ampuero, por darme la oportunidad de realizar mi memoria de título bajo su dirección, gracias por todo el conocimiento entregado y su muy buena disposición en ayudarme siempre que lo necesité.

A Javiera, por ser mi compañera durante casi todo este proceso, por ser mi apoyo en los momentos difíciles y también por los muchos momentos alegres. Por las horas de estudio y por estar presente siempre que lo he necesitado. Gracias por hacer este proceso mucho más fácil.

A mis amigos de la vida, mis queridos Pancho, Leo y Nacho, por la compañía, pichangas, risas y apoyo (y burlas), y por estar siempre presentes, espero que esta amistad nunca acabe.

A mis amigos de Universidad, con los que compartí tantos buenos momentos y cuya compañía hicieron que este proceso fuera inolvidable. No es posible mencionarlos a todos en este espacio, pero me siento afortunado de haberlos tenido como compañeros.

A mis compañeros de laboratorio, Memo y Pancho, por toda la ayuda prestada, por las risas, la confianza y el buen ambiente de trabajo que siempre hubo, fue una muy grata estadía. Mención para los gloriosos Pharmaceutical City y Paok, me siento orgulloso de haber llevado sus colores.

Hay muchas más personas a las que me gustaría agradecer, pero este espacio no es suficiente. Pero muchos han aportado de alguna u otra forma a que haya podido completar esta etapa. A todos ellos, gracias totales.

Índice de Contenidos

Portada.....	1
Agradecimientos.....	2
Índice de contenidos.....	3
Índice de figuras.....	5
Índice de tablas.....	6
Resumen.....	8
Summary.....	9
Introducción.....	10
Hipótesis.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos.....	21
Materiales.....	22
Metodología.....	23
Resultados y discusiones.....	28
1. Optimización de metodología analítica mediante espectrofotometría para la determinación de curcumina en solución y en los sistemas propuestos.....	28
1.1. Determinación de coeficiente de absortividad molar de curcumina en distintos solventes.....	28
1.2. Pruebas para la determinación de cantidad de curcumina a incluir en nanosistemas.....	28
2. Desarrollo y caracterización de diversas formulaciones conteniendo curcumina.....	30
2.1. Nanoemulsiones.....	30
2.2. Nanocápsulas catiónicas de Eudragit E PO.....	30

2.3 Nanocápsulas catiónicas de quitosano.....	31
2.4 Nanocápsulas aniónicas Eudragit E PO-carragenina iota.....	31
2.5 Nanocápsula aniónicas quitosano-carragenina iota.....	35
2.6. Porcentaje de encapsulación de la curcumina en las formulaciones.....	37
2.7. Eficiencia de asociación de la curcumina en los nanovehículos desarrollados.....	38
3. Determinación de la estabilidad de la curcumina en los vehículos desarrollados, sometida a estímulos degradativos como fotólisis y oxidación.....	39
3.1 Evaluación del efecto del H ₂ O ₂ sobre curcumina.....	40
3.2. Evaluación de la degradación de la curcumina en los distintos nanovehículos, cuando es sometida a estímulos fotolíticos y oxidativos.....	43
3.2.1 Evaluación de la degradación de curcumina en los distintos vehículos cuando es sometida a fotólisis.....	43
3.2.2. Evaluación de la degradación de curcumina en los distintos vehículos cuando es sometida a oxidación/fotólisis.....	47
3.2.3. Determinación del porcentaje de degradación que ejerce cada estímulo degradativo sobre la curcumina.....	49
Conclusiones.....	51
Bibliografía.....	53

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de la curcumina.....	10
Figura 2. Estructuras químicas de los productos de degradación de la curcumina en tampón fosfato pH 7,2 y 37°C.....	12
Figura 3. Procedimiento general de diferentes métodos de preparación de nanocápsulas.....	16
Figura 4. Esquema de la preparación de nanocápsulas por el método capa por capa.....	18
Figura 5. Estructura química del polímero quitosano.....	19
Figura 6. Estructura química del polímero Eudragit E PO.....	20
Figura 7. Estructura química del polímero carragenina iota.....	20
Figura 8. Absorbancia de las formulaciones conteniendo distinta cantidad añadida de curcumina.....	29
Figura 9. Formación de radical OH producto del efecto de la radiación UV sobre el H ₂ O ₂	40
Figura 10. Gráfico de concentración de peróxido de hidrógeno y su efecto en la pendiente de degradación de la curcumina.....	42
Figura 11. Comparación de las pendientes de degradación de la frente a fotólisis cuando está incluida en los distintos nanovehículos desarrollados.....	44
Figura 12. Comparación de las pendientes de degradación de la curcumina frente a radical hidroxilo y radiación UV cuando está incluida en los distintos nanovehículos desarrollados.....	47
Figura 13 Degradación del quitosano en medio ácido por el radical hidroxilo.	49

Índice de Tablas

Tabla 1. Longitud de onda de máxima absorción y coeficiente de absortividad molar experimental de la curcumina obtenido en distintos solventes.....	28
Tabla 2. Pendiente de la respuesta lineal en adiciones crecientes de curcumina contenida en las formulaciones.....	29
Tabla 3. Ensayo de solubilidad de Eudragit E PO en agua utilizando distintas concentraciones de ácido acético glacial.....	32
Tabla 4. Caracterización de nanocápsulas de Eudragit E PO utilizando concentraciones decrecientes del polímero	33
Tabla 5. Caracterización de nanocápsulas aniónicas utilizando distintas proporciones de nanocápsulas catiónicas y solución de polímero carragenina iota.....	34
Tabla 6. Estudio de la solubilidad del quitosano en agua utilizando distintas concentraciones de ácido acético glacial.....	36
Tabla 7. Caracterización de nanocápsulas aniónicas utilizando distintas proporciones de nanocápsulas catiónicas y de solución de carragenina.....	36
Tabla 8. Porcentaje de encapsulación de la curcumina en los vehículos desarrollados.....	37
Tabla 9. Cantidades de curcumina al inicio, curcumina no unida y eficiencia de asociación para cada formulación.....	38

Tabla 10. Estudio del efecto del peróxido de hidrógeno sobre la curcumina.....	40
Tabla 11. Efecto de la concentración de H ₂ O ₂ sobre la pendiente de degradación de la curcumina cuando está incluida en nanoemulsiones.....	41
Tabla 12. Comparación, en términos de protección relativa, de la protección que cada vehículo aporta a la curcumina frente a la radiación UV.....	45
Tabla 13. Comparación, en términos de protección relativa, de la protección que cada vehículo aporta a la curcumina frente al radical hidroxilo y radiación UV.....	49
Tabla 14. Porcentaje de degradación de la curcumina atribuido a cada estímulo degradativo.....	50

Resumen

Estabilización de la curcumina mediante su encapsulación en nanosistemas O/W: estudio de la fotólisis y oxidación.

La curcumina es un compuesto fenólico con una potente actividad biológica. Entre éstas destacan sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias. Esta molécula presenta además una muy baja toxicidad y buenas propiedades organolépticas. Sin embargo, todas estas propiedades se ven afectadas por inconvenientes que limitan su uso en medicina, como son su muy baja solubilidad y su baja estabilidad. Estas características de la curcumina hacen que sea muy difícil desarrollar una forma farmacéutica apropiada para su uso terapéutico.

El objetivo de este trabajo fue incorporar a la curcumina dentro de nanovehículos como nanoemulsiones y nanocápsulas, formuladas con distintos polímeros, para luego estudiar su velocidad de degradación frente a la radiación ultravioleta (UV) y al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).

Para realizar lo anterior se desarrollaron protocolos de fabricación de distintos nanovehículos conteniendo curcumina. Estos fueron caracterizados en función de su tamaño, potencial zeta, índice de polidispersión, eficiencia de encapsulación y rendimiento. Además, se optimizó una metodología analítica, por espectrofotometría UV-visible, que permitió cuantificar la curcumina presente en los nanovehículos. Finalmente se realizó un estudio de degradación de la curcumina en los distintos nanovehículos, siendo sometidos a radiación UV y agentes oxidantes. Se compararon las pendientes de degradación de la curcumina en los nanosistemas, determinando cual es la formulación que presenta una mayor protección del principio activo.

Los resultados mostraron que la curcumina, cuando está incluida en nanovehículos de núcleo oleoso, presenta una menor degradación frente a estímulos lumínicos y oxidativos. Además, se demostró que la incorporación de una cubierta polimérica en los nanosistemas (nanocápsulas) aumenta la protección del principio activo, llegando a tener una degradación por radiación UV siete veces menor que cuando está libre en una solución, y en el caso de la oxidación su degradación es cuatro veces más lenta cuando está encapsulada. Además, se obtuvieron formulaciones con porcentajes de encapsulación de 100% y eficiencias de asociación de la curcumina sobre el 80%.

Summary

Stabilization of curcumin with its encapsulation in nanosystems O/W: study of photolysis and oxidation.

Curcumin is a phenolic compound with potent biological activity, among which its antioxidant, anticancer and anti-inflammatory properties stand out. It also show very low toxicity and good organoleptic properties. However, all these properties are affected by some drawbacks, such as their very low solubility and low stability. These characteristics of curcumin make it very difficult to develop a pharmaceutical dosage form suitable for therapeutic use.

The aim of this work was to incorporate curcumin into nanovehicles such as nanoemulsions and nanocapsules, formulated with different polymers, and then to study its rate of degradation against ultraviolet (UV) radiation and the hydroxyl radical.

To carry out the above, protocols for the manufacture of different nanovehicles containing curcumin were developed, these were characterized according to their size, zeta potential, polydispersity index, encapsulation efficiency and yield. In addition, an analytical methodology was optimized by UV-visible spectrophotometry, which allowed the quantification of curcumin present in nanovehicles. Finally, a study of degradation of curcumin was carried out in the different nanovehicles, being subjected to UV radiation and oxidizing agents. The slopes of degradation of curcumin were compared in the nanosystems, determining which is the formulation that presents a larger protection of the active.

The results showed that curcumin, when included in nanovehicles of oily nucleus, show a lower degradation against light and oxidative stimuli. In addition, the incorporation of a polymer coating on these nanosystems (nanocapsules) increases the protection of the active, resulting in a seven times lower degradation by UV radiation when compared with free in a solution, and in the case of oxidation, the degradation is four times slower when it is encapsulated. In addition, formulations with 100% percentage of encapsulation and association efficiencies over 80% were obtained.

Introducción

Curcumina

La *Curcuma longa L.* es una planta de la familia de las *Zingiberáceas* cuyo rizoma de color naranja es usado comúnmente como una especia en la cultura asiática. Allí es considerada como una planta mágica, dadas sus características organolépticas y sus indudables propiedades terapéuticas y protectoras, sobre todo a nivel hepático y cutáneo.^[1]

El principal constituyente de la *Curcuma longa L.* es la curcumina (Figura 1), la cual es un compuesto fenólico (diferuloilmetano) que le confiere un color amarillo característico. Además, la curcumina es el principal componente que le otorga una potente actividad biológica, entre las que destacan sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antisépticas.^[1] La curcumina es soluble en aceites y también en solución acuosa a pH básico; sin embargo, es prácticamente insoluble en agua a pH ácido y neutro. Además es estable a altas temperaturas y en ácidos, pero inestable a pH alcalino y en presencia de luz.^[2] Este compuesto exhibe un tautomerismo ceto-enólico y su forma enólica es energéticamente más estable tanto en fase sólida como en solución.^[3]

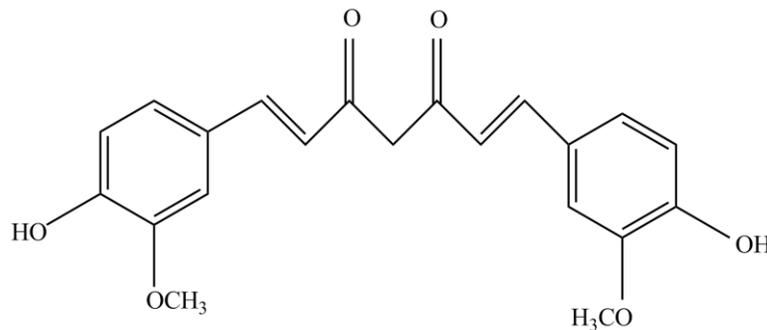


Figura 1. Estructura química de la curcumina

A nivel farmacológico, la curcumina es un compuesto de baja toxicidad (no se aprecian efectos tóxicos con dosis sobre los 5 g/Kg). Se han encontrado más de 30 proteínas que interactúan directamente con la curcumina, incluyendo la ADN polimerasa, proteína quinasa C (PKC), lipoxigenasa (LOX), el factor nuclear-kappa B (NF-kB) y la actina, entre otros.^[4] Esta molécula posee actividad anticancerígena actuando en procesos asociados a mutagénesis, expresión de oncogenes, regulación del ciclo celular, apoptosis, carcinogénesis y metástasis. Así por ejemplo, se ha demostrado que la curcumina es muy efectiva en la prevención y curación del cáncer de piel,

inhibiendo el efecto de la oxidación del ADN de la epidermis y modulando la expresión génica de protooncogenes (genes cuyo producto de expresión estimulan el crecimiento celular). Adicionalmente, está comprobado que la curcumina inhibe la producción de IL-8 inducida por el *Helicobacter pylori* la cual juega un importante papel en el desarrollo de gastritis, úlcera y posterior desarrollo de cáncer gástrico.^[1]

Uno de los mecanismos antioxidantes más conocido para la curcumina es su capacidad para desactivar especies reactivas de oxígeno (ROS), principales responsables de la peroxidación de los lípidos celulares, disminuyendo la formación de compuestos inflamatorios como prostaglandinas y leucotrienos; además inhibe la producción del radical superóxido. Se ha evidenciado que la presencia de grupos fenólicos es fundamental para explicar esta capacidad, además se sabe que los grupos metoxilo aumentan esta actividad.^[1]

En términos de estabilidad, la curcumina, incubada en tampón fosfato 0.1 M, a pH 7,1 y 37°C, se descompone sobre un 90 % en 30 minutos, por lo que es inestable en condiciones fisiológicas *in vitro*. Además, su descomposición es dependiente de pH y es más rápida en condiciones neutras y básicas. Sin embargo es más estable en cultivos celulares, en donde menos del 20 % de la curcumina se descompone en 1 hora. La degradación sigue una cinética aparente de primer orden.^[1]

La curcumina es una molécula fotosensible, siendo esta la principal causa de degradación molecular, además de la degradación química.^[5] Se ha demostrado que los productos de degradación son bioactivos y contribuyen a los efectos farmacológicos de la curcumina.^[6] El producto que más importancia tiene en este aspecto es la vainillina. Se ha demostrado que este saborizante natural inhibe la mutagénesis en células bacteriales y mamíferos. Puede actuar como antimutagénico modificando sistemas de replicación y reparación del ADN, posterior al daño del ADN celular por mutagenes. La vanilina también es un poderoso desactivador de superóxidos y radicales hidroxilos, inhibiendo la peroxidación lipídica dependiente de hierro.^[7] Es interesante destacar que la capacidad de la vanilina de inhibir la mutagénesis, la peroxidación lipídica y la producción de radicales libres ha sido ampliamente documentada, por lo que sería interesante un estudio que compare a la vanilina con la curcumina en estos aspectos.^[7]

El principal producto de degradación de la curcumina es el trans-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexenal, siendo la vanilina, el ácido ferúlico y feruloil metano los productos menores de degradación (Figura 2).

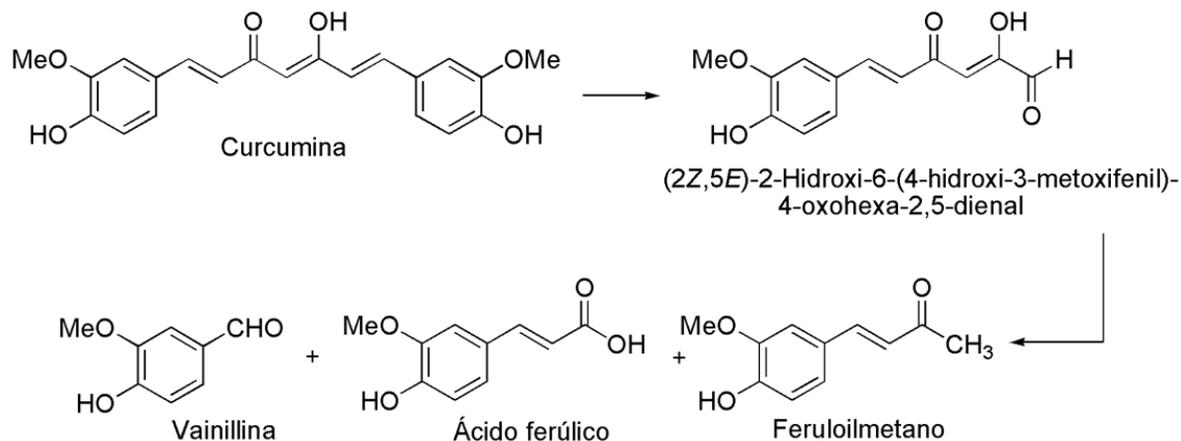


Figura 2. Estructuras químicas de los productos de degradación de la curcumina en tampón fosfato pH 7,2 y 37 °C.^[8]

Como se indicó anteriormente, la curcumina es una molécula muy hidrofóbica (log P: 3,07, hidrosolubilidad: 0,052 g/L) y muy sensible a la luz. Esto origina dos importantes inconvenientes desde el punto de vista terapéutico:

A) dificultad para ser incorporado en medios acuosos (que es principal componente de los medios biológicos).

B) una muy baja biodisponibilidad (que impide que se manifiesten sus beneficios terapéuticos a nivel sistémico).

Se ha intentado superar estos inconvenientes a través de técnicas de micro/nanoencapsulación, particularmente utilizando matrices lipídicas. Liposomas, partículas lipídicas sólidas y nanoemulsiones son algunos de los sistemas que se han utilizado para encapsular la curcumina y así mejorar su biodisponibilidad.^[9] Varios estudios indican que sistemas basados en emulsiones aceite en agua (O/W) pueden incrementar significativamente la biodisponibilidad de la curcumina, comparado con curcumina cristalina dispersa en agua, especialmente usando triacilglicerol de cadena media como medio oleoso. Además, estos sistemas disminuyen la degradación de la curcumina por efecto de la luz.^[10]

El desarrollo de medicamentos basados en sistemas que poseen núcleos lipídicos como nanoemulsiones, microemulsiones o emulsiones convencionales, es propuesto frecuentemente para encapsular componentes lipofílicos. Aquí, el componente lipofílico es solubilizado generalmente en

una fase oleosa para luego ser dispersado en una fase acuosa que contiene un surfactante. La composición del sistema y el método de dispersión utilizado determinan el tipo de emulsión (nanoemulsión, microemulsión o emulsión convencional). Las nanoemulsiones han demostrado tener mejor estabilidad frente a la agregación de partículas y separación gravitacional debido a su pequeño tamaño de gotas.^[10] La estabilidad de estos sistemas se mide en función de su tamaño, distribución de tamaño y concentración del componente lipofílico.

Por otra parte, las nanopartículas poliméricas son consideradas como promisorios sistemas de liberación de fármacos. En este caso, los polímeros seleccionados juegan un rol fundamental pues deben ser biocompatibles/biodegradables y aprobados por las agencias regulatorias (FDA, EMEA, entre otras.). El interés en estos sistemas se debe principalmente a su potencial para:

- A) encapsular diversos tipos de activos,
- B) reducir efectos adversos,
- C) vehicular moléculas de baja solubilidad,
- D) proteger contra la degradación en fluidos biológicos y durante almacenamiento y
- E) controlar la liberación de activos.

Algunos de estos nanovehículos, los cuales serán evaluados en este estudio, son las nanoemulsiones y las nanocápsulas poliméricas.

Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones aceite en agua (O/W), son sistemas compuestos por glóbulos de aceite dispersos en un medio acuoso, variando en tamaños de entre 20 y 500 nm. Para dispersar y estabilizar las nanogotas se utilizan distintos tipos de surfactantes que pueden ser iónicos y no iónicos. Las nanoemulsiones iónicas presentan una alta estabilidad debido a las repulsiones electroestáticas entre las superficies cargadas de las gotas, así pueden perdurar durante meses. Aunque las nanoemulsiones son sistemas cinéticamente estables, la estabilidad física a largo plazo es referida como una aproximación a la estabilidad termodinámica.

Los surfactantes iónicos juegan un importante rol en las características fisicoquímicas de las nanoemulsiones, como su estabilidad, tamaño, forma y tensión interfacial, afectando además la carga superficial de las nanoemulsiones. El Epikuron®, surfactante aniónico utilizado en este

estudio, es una mezcla de surfactantes que incluyen fosfolípidos zwitteriónicos, ácidos grasos aniónicos y ácido fosfatídico, entre otros.^[11]

La disposición de la carga eléctrica en la superficie de la gota es generalmente modelada como una doble capa eléctrica, según el modelo de Gouy-Chapman-Stern. El balance entre las fuerzas de atracción de Van der Waals y la repulsión eléctrica de la doble capa determina la estabilidad de la nanoemulsión. Se puede realizar una medición aproximada del potencial eléctrico de esta segunda capa midiendo el potencial zeta.^[11]

Algunas de las aplicaciones de las nanoemulsiones en medicina son solubilizar y transportar compuestos bioactivos lipofílicos para su uso en el tratamiento del cáncer, terapias oculares, vacunas y administración de fármacos antiinflamatorios. También se utilizan en cosmética, debido a su gran área superficial, lo que permite una rápida penetración en los tejidos.^[11]

En términos de liberación del activo, en sistemas controlados cinéticamente, como moléculas confinadas en cápsulas sólidas o matrices poliméricas, la liberación del activo es controlado generalmente por difusión o erosión. Por el contrario, en procesos controlados termodinámicamente, como liposomas, nanoemulsiones y vesículas, la liberación del activo es determinado por constantes de equilibrio. Así, existe una rápida cinética de intercambio de moléculas entre las diferentes fases y la distribución de las moléculas responde a la energía libre del sistema.^[11]

El método de formación de nanoemulsiones por desplazamiento de solvente es ampliamente descrito en la literatura y es comúnmente enfocado hacia la incorporación de moléculas dentro de las nanoemulsiones. Estas formulaciones son fácilmente preparadas mezclando dos fases (orgánica y acuosa), en donde la fase orgánica debe ser miscible con el agua, seguida por la evaporación del solvente orgánico. Con este método se obtienen resultados reproducibles y de alta estabilidad, obteniéndose tamaños en el rango de 120-250 nm, con una distribución de tamaño homogénea, dado por los bajos valores de polidispersidad (0,11-0,23).^[11]

Nanocápsulas

En forma general, las nanocápsulas pueden ser definidas como sistemas nanovesiculares que poseen una estructura típica de cubierta-núcleo, en donde el fármaco es confinado a un reservorio o cavidad rodeada por una membrana o revestimiento polimérico.^[12] El activo puede estar en forma sólida o líquida y puede ser lipofílico o hidrofílico según el método de preparación y

los materiales usados. Además, y dependiendo de las propiedades químicas, se pueden adherir moléculas sobre la superficie de las nanocápsulas mediante, por ejemplo, interacciones iónicas.^[13] El rango de tamaño obtenido en las nanocápsulas, por distintos métodos, es de entre 100 a 500 nm. Los sistemas de nanocápsulas son prometedores como vectores activos por su capacidad de liberar fármacos,^[14] además, su tamaño subcelular permite una mayor captación intracelular que otros sistemas particulados.^[15] Por otro lado, las nanocápsulas pueden también mejorar la estabilidad de sustancias activas^[16] y ser biocompatibles con tejidos y células cuando se sintetizan con materiales que son biocompatibles o biodegradables.^[17]

Otra ventaja de las nanocápsulas es que permiten incorporar moléculas con alta eficiencia debido a la alta afinidad de éstas por el núcleo. Es interesante destacar que estos sistemas tienen bajo contenido polimérico, comparado con otros sistemas nanoparticulados como las nanoesferas.^[18] Finalmente, proveen de protección a la molécula activa frente a factores de degradación como pH y luz, y reducen la irritación del tejido debido a su cubierta polimérica.^[19]

Hay seis métodos clásicos para la preparación de nanocápsulas (Figura 3): nanoprecipitación, emulsión-difusión, doble emulsificación, emulsión-coacervación, revestimiento polimérico y capa sobre capa (utilizado en este estudio).^[20]

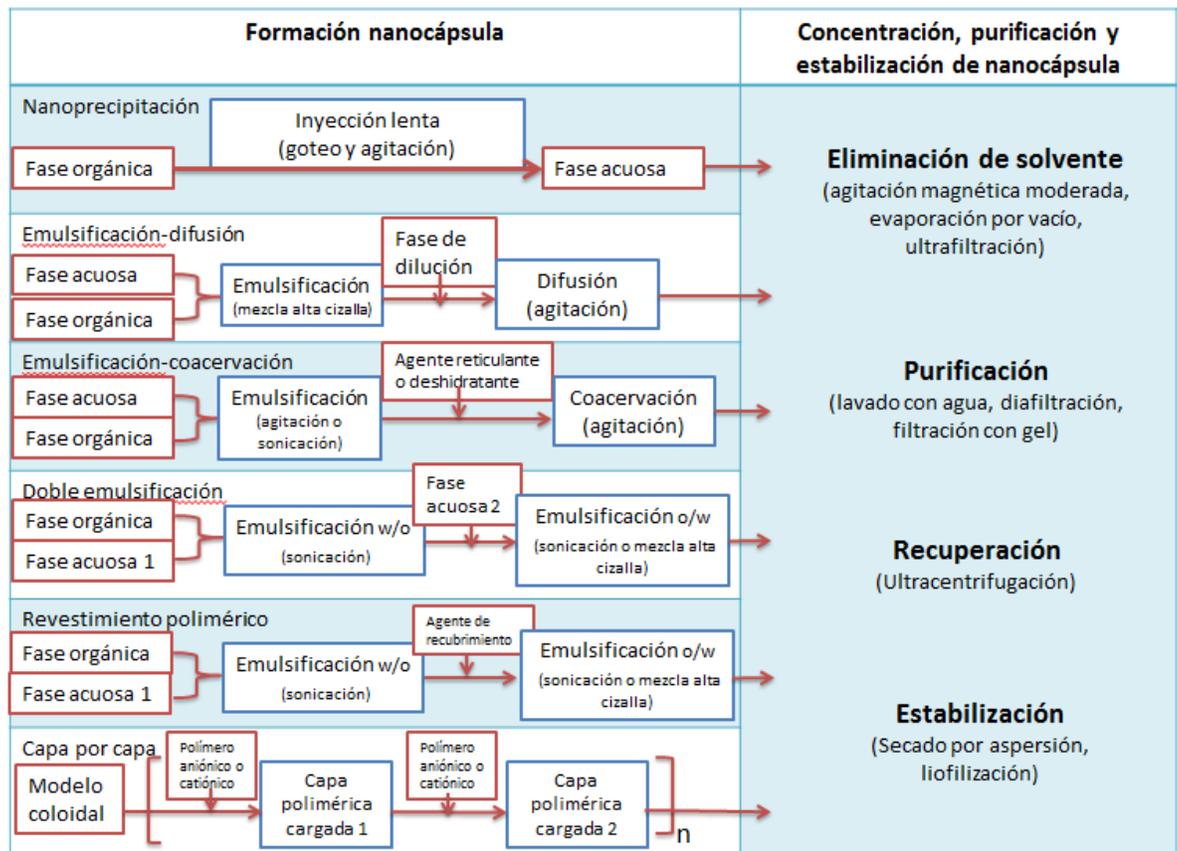


Figura 3. Procedimiento general de diferentes métodos de preparación de nanocápsulas.^[20]

Método *layer by layer* (capa sobre capa)

A través de este método es posible obtener partículas vesiculares, llamadas cápsulas polielectrolíticas, con propiedades estructurales y químicas bien definidas.

El mecanismo de formación de las nanocápsulas está basado en la atracción electrostática irreversible que lleva a la adsorción de polielectrolitos en la superficie de los nanosistemas.

Este método requiere un modelo coloidal, como las nanoemulsiones, sobre las cuales se adsorbe una capa polimérica a través de una incubación en la solución polimérica, la cual es lavada posteriormente.^[21] Este procedimiento es repetido con un segundo polímero y luego múltiples capas de polímeros pueden ser agregadas secuencialmente, una después de otra (Figura 4). En estos sistemas, las moléculas grandes no pueden difundir a través de las multicapas polielectrolíticas, mientras que los solutos pequeños como iones o fármacos pueden hacerlo fácilmente.^[22]

Siguiendo este enfoque, se han realizado estudios que demuestran las propiedades de permeabilidad de la multicapa polielectrolítica en función del pH y su comportamiento reversible de abrirse o cerrarse.^[23] Este cambio de abierto a cerrado (y viceversa) de la cubierta de la nanocápsula puede ocurrir además a través de cambios en las condiciones ambientales como temperatura o la presencia de solventes orgánicos.^[24]

La clave para la adsorción capa por capa es recargar la superficie en cada paso de adsorción. Las moléculas empleadas para el ensamblaje deberían tener suficiente número de grupos ionizados para ofrecer una adsorción estable sobre una superficie con cargas opuestas y además cargas expuestas al exterior.^[25] No obstante, teniendo en cuenta consideraciones energéticas, existe la posibilidad de que la adsorción secuencial del siguiente polielectrolito pueda remover el contrapoliión depositado en vez de adsorberse sobre él.^[26]

Además, este método tiene otras dificultades como es la formación de agregados de contraiones o la separación del polielectrolito unido a la interface del nanovehículo antes del próximo ciclo de adsorción. Por otro lado, las estrechas interacciones partícula-partícula pueden causar interacciones desfavorables con los polímeros cargados, lo que puede llevar a su destrucción y a la formación de agregados.^[26]

De los métodos de encapsulación nombrados anteriormente, el método capa sobre capa presenta una de las más altas eficiencias de encapsulación, siendo esta de 80% o más, sin embargo presenta una liberación del principio activo más lenta.^[26]

En términos de estabilidad, las nanocápsulas pueden ser sensibles a variaciones de pH, debido a la degradación del polímero. Así mismo, se ha observado que el almacenamiento en condiciones de alta temperatura (sobre 40 °C) afecta la estabilidad del sistema, probablemente debido al debilitamiento de la estructura del polímero, facilitando la migración de la sustancia activa desde el núcleo oleoso.^[20] Por otra parte, se ha demostrado la importancia del polímero en la prevención de la fotodegradación del activo, según los investigadores, causado por la cristalinidad del polímero, que puede reflejar y dispersar la radiación UV.^[16]

Por otra parte, algunas estrategias de nanoencapsulación, como la capa sobre capa, han mostrado interesantes resultados, particularmente en relación al comportamiento *in vivo* de las nanocápsulas, en donde su carga positiva reduce, por ejemplo, su degradación enzimática.^[27]

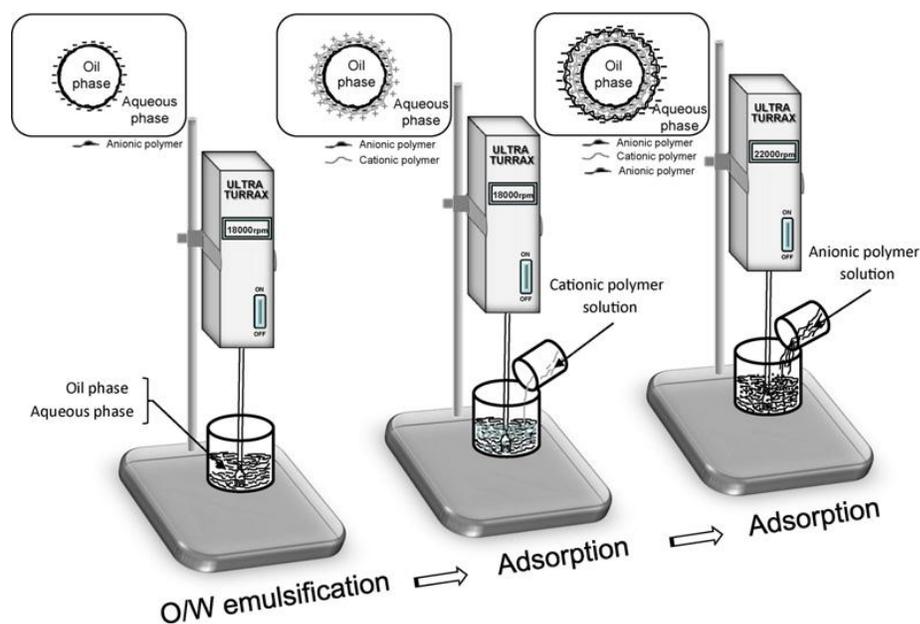


Figura 4. Esquema de la preparación de nanocápsulas por el método capa por capa. [20]

Quitosano, Eudragit E PO® y carragenina iota

Los polímeros que se van a utilizar en este estudio son los polímeros catiónicos quitosano y Eudragit E PO® y el polímero aniónico carragenina iota. Por esto, procederemos a hacer una pequeña introducción acerca de ellos.

Quitosano.

El quitosano (Figura 5), derivado de la quitina (segundo polímero natural más abundante en el mundo), es un polisacárido soluble en medio acuoso ácido y es utilizado ampliamente en diversas áreas (alimentos, cosméticos y aplicaciones biomédicas y farmacéuticas). Cuando el grado de deacetilación (aminación) de la quitina alcanza el 50 % se vuelve soluble en medio acuoso ácido y es llamado quitosano, convirtiéndose en un polielectrolito. Es utilizado en distintas aplicaciones como soluciones, geles, films y fibras. Se han descrito muchas interacciones electrostáticas entre el quitosano y otros polímeros como carboxietilcelulosa, carragenina y alginato, entre otros. El quitosano es capaz de formar complejos electrostáticos, pudiendo interaccionar con surfactantes de carga opuesta y con complejos polielectrolíticos. Algunas de las aplicaciones de estos complejos electrostáticos son su uso como material antitrombogénico, sistemas de liberación controlada, encapsulación de fármacos, inmovilización de enzimas y células, y transportadores de genes. [28]

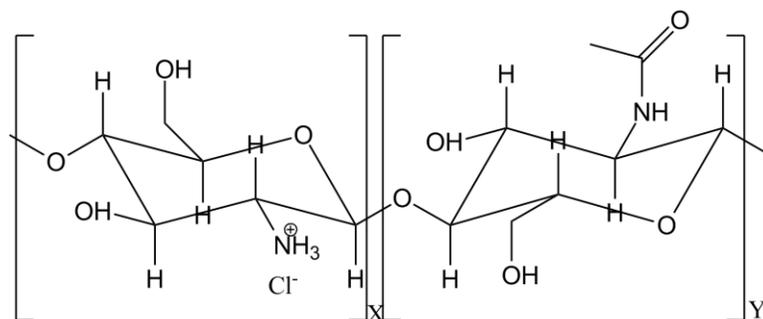


Figura 5. Estructura química del polímero quitosano.

Eudragit E PO.

El Eudragit E PO (Figura 6) es un polímero catiónico sensible al pH formado por monómeros de metil metacrilato, N,N-dimetilaminoetil metacrilato y butil metacrilato, en proporción 1:2:1. Este es un polímero gastrosoluble, que posee un grupo amino terciario que se ioniza a pH ácido y está aprobado por la FDA para entrega oral de fármacos.^[29]

Es ampliamente usado en la industria farmacéutica como un enmascarante de sabor, protector contra la humedad, modificante de la liberación, entre otros. Debido a su carga positiva, cuando se disuelve en medio acuoso puede ser utilizado para preparar dispersiones con fármacos cargados negativamente. Existen estudios en los que se une a curcumina, formando dispersiones sólidas, logrando un aumento en la solubilidad, biodisponibilidad y estabilidad contra pH básico y radiación UV.^[30]

Debido a su carga positiva, es capaz de formar complejos con otros polímeros como alginato de sodio, carragenina, caseína, etc., formando sistemas con distintas propiedades. Esta reactividad con otros polímeros se puede controlar modificando la densidad de carga mediante cambios de pH de la solución.^[31]

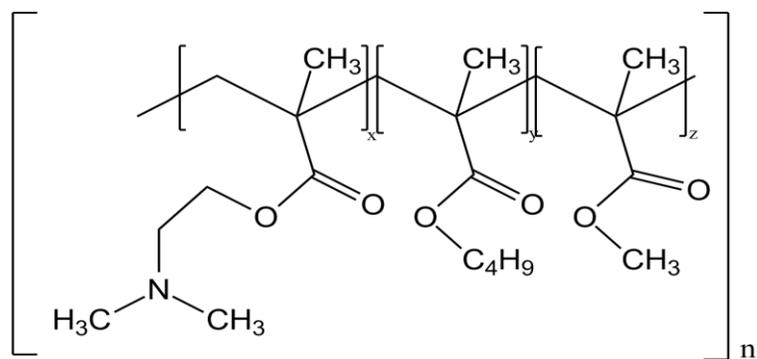


Figura 6. Estructura química del polímero Eudragit E PO®.

Carragenina iota.

La carragenina (Figura 7) es un polisacárido proveniente de ciertas algas rojas, que posee grupos sulfato en su estructura, los cuales pueden interactuar fácilmente con grupos catiónicos en un amplio rango de pH a través de interacciones iónicas, formando complejos de alta estabilidad.^[32] Este polímero es un ingrediente de gran valor funcional en alimentos y ha ganado mucho interés en la encapsulación de sustancias debido a su bajo costo, baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradación. Ha sido utilizado en varias aplicaciones en alimentos como aditivo o estabilizador de algunos productos.^[33]

Este polímero ha mostrado un gran potencial en la encapsulación de fármacos con actividades anticoagulantes, anticancerígenas, antihiperlipidémicas e inmunomoduladoras. Además se ha estudiado su uso con curcumina, en donde la utilización de nanopartículas de carragenina ha podido superar los problemas que afectan a la eficacia de la curcumina.^[34]

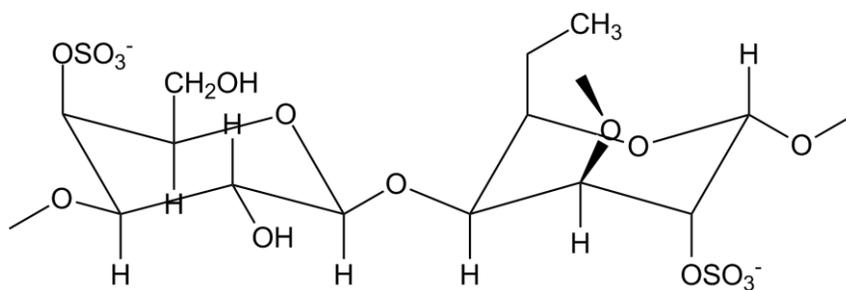


Figura 7. Estructura química del polímero carragenina iota.

Hipótesis

La incorporación de curcumina en nanovehículos de núcleo oleoso, como nanoemulsiones y nanocápsulas formadas por distintos polímeros (Eudragit E PO®, quitosano, carragenina), mejorará la estabilidad de este principio activo frente a estímulos lumínicos y oxidativos.

Objetivo general

Desarrollar y estandarizar protocolos de fabricación de nanovehículos, como nanoemulsiones y nanocápsulas con distintos polímeros, que contengan curcumina y evaluar su estabilidad frente a estímulos lumínicos y oxidativos.

Objetivos específicos

- 1.- Estandarizar una metodología analítica para la determinación de curcumina en los sistemas desarrollados y que permita evaluar su estabilidad.
- 2.- Incorporar la curcumina en nanoemulsiones de núcleo oleoso.
- 3.- Optimizar metodologías para la fabricación de nanocápsulas conteniendo los polímeros Eudragit E PO®, quitosano y carragenina.
- 4.- Incorporar la curcumina en nanocápsulas conteniendo los polímeros Eudragit E PO®, quitosano y carragenina.
- 5.- Evaluar y comparar la estabilidad, frente a oxidación y fotólisis, de la curcumina en los nanovehículos desarrollados.

Materiales

Reactivos

La curcumina fue adquirida a Sigma-Aldrich, y fue utilizada sin purificaciones previas a su uso. Los polímeros utilizados para la fabricación de los nanovehículos fueron Eudragit E PO (Evonik Industries), quitosano (Sigma-Aldrich) y carragenina iota (Gelymar), los cuales fueron utilizados tal como se recibieron. La matriz oleosa Miglyol® (Proaltec S.A.) y el tensoactivo Epikuron 145V® (Cargill) fueron utilizados sin previa modificación. El peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes fue adquirido a Merck.

Los solventes principales -acetona y etanol- fueron de grado HPLC. El agua bidestilada fue purificada mediante sistema Milli Q.

Instrumentación

La evaporación de los solventes fue realizada con equipo Rotavaporador (Cientec).

Las mediciones espectrofotométricas fueron realizadas en equipo espectrofotómetro UV-visible Agilent.

Las mediciones de tamaño, PDI y potencial zeta fueron realizadas con equipo Zetasizer Nano Z (Malvern) controlado por el programa Zetasizer software.

Los estudios de fotólisis y oxidación fueron realizados con lámpara de mercurio (Blak-Ray®, UVP) en ausencia y presencia de peróxido de hidrógeno.

Los estudios de eficiencia de encapsulación y rendimiento se realizaron utilizando tubos Vivaspin 6 (GE Healthcare) y con el uso de centrifuga (Hermle)

Todos los equipos pertenecen a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Metodología.

1. Optimización de una metodología analítica espectrofotométrica y fluorescencia para la determinación de curcumina en solución y en los sistemas propuestos.

1.1. Determinación del coeficiente de absortividad molar de curcumina en distintos solventes.

Se determinó el coeficiente de absortividad molar de la curcumina en distintos solventes con el objetivo de seleccionar el medio óptimo en el que se determinará este compuesto una vez que se extraiga de los nanovehículos. Para esto se preparó una solución patrón de curcumina en etanol a una concentración de 1mg/mL, para posteriormente realizar las curvas de calibración agregando alícuotas crecientes de 2,5 μ L de la solución patrón sobre 3 mL de distintos solventes (acetona, miglyol, vaselina, NaOH 0,05M, etanol y DMSO) de forma aditiva, determinándose la respuesta lineal de la curva a través del coeficiente de determinación lineal y de la pendiente de la curva, la cual corresponde a la sensibilidad. Las mediciones de absorbancia se realizaron a longitudes de onda de entre 419 nm y 423 nm (máximos de absorción), a excepción del NaOH que fue a 467 nm. Las pendientes obtenidas en las curvas de calibración corresponden al coeficiente de absortividad ($UA M^{-1} cm^{-1}$) para la curcumina en cada solvente, estas pendientes comenzaban desde el punto 0,0. Todas las mediciones fueron realizadas en triplicado. El solvente en el cual la curcumina presentó la mayor sensibilidad, dado por el coeficiente de absortividad molar, fue elegido como medio óptimo para la determinación de este compuesto. Se fijó que la alícuota de muestra óptima para la cuantificación de curcumina en los nanovehículos finales correspondiera a la cantidad necesaria para obtener un valor de absorbancia en la curva de calibración en acetona cercano a 0,7.

1.2. Pruebas para la determinación de cantidad de curcumina a incluir en nanosistemas.

Para determinar la cantidad de curcumina que se va a incluir en los nanosistemas se realizaron cuatro nanoemulsiones con distintas cantidades añadidas de curcumina (5 mg, 3,69 mg, 2,28 mg y 1 mg), luego se hicieron curvas de calibración a partir de las nanoemulsiones preparadas. Para esto, se tomaron alícuotas de la nanoemulsión, agregándolas de forma aditiva en 3 mL de agua. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 421 nm. La pendiente obtenida en las curvas de calibración corresponde al coeficiente de absortividad de la curcumina disuelta en el núcleo oleoso de las nanoemulsiones y posteriormente diluidas en agua. La cantidad utilizada que presentó el mayor coeficiente de absortividad molar, es decir, la mayor sensibilidad, fue la elegida para la fabricación de los nanovehículos con curcumina.

2. Incorporación de curcumina en nanosistemas de núcleo oleoso, desarrollo de nuevas formulaciones mediante el uso de polímeros y caracterización de las nuevas formulaciones.

2.1. Nanoemulsiones.

Las nanoemulsiones fueron preparadas mediante el método de desplazamiento de solvente. Para esto se pesaron de forma exacta alrededor de 3,5 mg de curcumina en un tubo de ensayo junto con 30 mg de Epikuron 145 V, luego se agregaron 500 μ L de etanol y se agitaron en un vórtex hasta disolución total. A continuación se agregó 125 μ L de Miglyol, se agitó y se le agregó 9,5 mL de acetona. Se mezclaron y rápidamente se vertió la mezcla sobre 20 mL de agua purificada. Se sometió a agitación magnética por 5 minutos formándose una suspensión lechosa. Finalmente se evaporó el solvente en el rotavaporador (40 °C) hasta un volumen final de 5 mL.

2.2 Nanocápsulas catiónicas de Eudragit E PO.

Las nanocápsulas catiónicas de Eudragit E PO fueron preparadas mediante el método de desplazamiento de solvente y recubrimiento iónico. Para esto se siguió el mismo procedimiento utilizado para las nanoemulsiones, detallado en 2.1, pero esta vez, luego de agregarle los 9,5 mL de acetona, se vertió la mezcla sobre 20 mL de una solución de Eudragit E PO al 1 %. Esta solución fue preparada pesando 1 g de Eudragit E PO y disolviendo a un volumen final de 100 mL con agua purificada, agregando previamente 1 mL de ácido acético glacial. La mezcla orgánico/acuosa se agitó durante 5 minutos y luego se evaporó el solvente mediante un rotavaporador hasta un volumen final de 5 mL.

2.3 Nanocápsulas catiónicas de quitosano.

Las nanocápsulas catiónicas de quitosano también fueron preparadas mediante el método de desplazamiento de solvente y recubrimiento iónico. Para esto se siguió el mismo procedimiento utilizado en la preparación de las nanoemulsiones, detallado en 2.1, pero esta vez, luego de agregarle los 9,5 mL de acetona, se vertió la mezcla sobre 20 mL de una solución de quitosano al 0,05% p/v. Esta solución fue preparada pesando 10 mg de quitosano y disolviendo a un volumen final de 20 mL en agua purificada, previa adición de 200 μ L de ácido acético glacial. La mezcla orgánico/acuosa se agitó durante 5 minutos y luego se evaporó el solvente utilizando un rotavaporador, llegando a un volumen final de 5 mL.

2.4 Recubrimiento de las nanocápsulas catiónicas con contraíón carragenina iota.

Se desarrolló un protocolo de fabricación de nanocápsulas aniónicas mediante el recubrimiento de las nanocápsulas catiónicas de Eudragit E PO y nanocápsulas catiónicas de quitosano, utilizando un polímero de carga negativa como la carragenina iota. Para el desarrollo de la formulación, se ajustaron parámetros como la concentración de ácido acético, la concentración de polímero y la proporción de los polímeros en la formulación.

2.5. Caracterización del tamaño y potencial zeta de las formulaciones desarrolladas.

Todas las formulaciones desarrolladas fueron caracterizadas en términos de su tamaño, PDI y potencial zeta, utilizando el equipo Zetasizer Nano Z.

2.6. Porcentaje de encapsulación de la curcumina en las formulaciones desarrolladas.

Para los ensayos de porcentaje de encapsulación se utilizaron tubos Vivaspin 6 de 3 kDA, a los cuales se les agregó 4 mL de cada formulación y luego fueron sometidos a centrifugación a 3000 x g durante 15 minutos. Luego se tomó el filtrado, el cual contendría la curcumina no encapsulada en los nanovehículos, el que se diluyó en acetona (500 µL de filtrado en 2,5 mL de acetona) y se midió la absorbancia a 419 nm. La cantidad de curcumina no encapsulada se obtuvo mediante la interpolación del valor de absorbancia, obtenido en el filtrado, en una curva de calibración de curcumina en acetona (concentración de curcumina vs absorbancia). De esta forma se obtuvo la concentración de curcumina en el filtrado y, mediante una relación con el volumen de la alícuota, se obtuvo la cantidad de curcumina presente en el filtrado. Finalmente se hizo una relación entre la cantidad agregada de curcumina al inicio y la cantidad de curcumina no encapsulada y se obtuvo el porcentaje de curcumina encapsulada (eficiencia de encapsulación).

2.7. Eficiencia de asociación de la curcumina en los nanovehículos desarrollados.

La eficiencia de asociación, es decir, cantidad de curcumina contenida en el nanovehículo luego del proceso de fabricación, se determinó tomando 20 µL de cada formulación de nanovehículo conteniendo curcumina, esta alícuota se diluyó en acetona (20 µL de formulación en 2,98 mL de acetona) y se midió la absorbancia a 419 nm. Luego se realizó una interpolación de este valor en una curva de calibración de curcumina en acetona y se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de curcumina presente en la formulación. Finalmente se hizo una comparación con la cantidad de curcumina pesada al inicio y se determinó el porcentaje de curcumina que se mantiene en la formulación luego de todo el proceso de fabricación.

3. Determinación de la estabilidad de la curcumina en los vehículos desarrollados, sometida a estímulos degradativos como fotólisis y oxidación.

3.1 Evaluación del efecto del H₂O₂ sobre la curcumina.

Para evaluar si hay un efecto del H₂O₂ se preparó una solución de curcumina en acetona de una concentración 0,923 mg/mL, de esta se tomaron dos alícuotas de 2 mL y a una de ellas se le agregó 350 µL de H₂O₂, luego se cubrieron ambas con papel aluminio y se dejó en oscuridad, evitando la radiación UV. Previamente se midió la absorbancia (tiempo 0) y se volvió a medir luego de 3 y 15 días. Paralelamente, se tomaron 2 mL de la misma solución de curcumina en acetona y se le agregó 350 µL de H₂O₂, luego se expuso a radiación UV con lámpara de mercurio, utilizando una longitud de onda de 254 nm para producir el radical ·OH y se midió la absorbancia de la muestra después de la exposición. Para medir absorbancia se tomaron 12,5 µL de la solución y se agregaron en acetona a un volumen de 3 mL, se midió a 419 nm.

Por otra parte, para evaluar el efecto de la concentración de H₂O₂, se prepararon nanoemulsiones conteniendo curcumina (a una concentración de 0,7 mg/ml), de las cuales se tomaron alícuotas de 2 mL, que fueron sometidas a oxidación utilizando distintas cantidades de peróxido de hidrógeno. Luego de ser agregado el H₂O₂, fueron sometidas a radiación UV para la producción del radical ·OH. Se realizaron curvas de degradación haciendo mediciones de la absorbancia de la muestra, previa dilución en acetona (20 µL de formulación en 2,98 mL de acetona), en un determinado intervalo de tiempo. Las muestras fueron medidas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 421 nm. A partir de las curvas de degradación se obtuvieron las pendientes de degradación de la curcumina para cada concentración de H₂O₂ y se hizo una relación entre la pendiente y la concentración de H₂O₂.

3.2. Evaluación de la degradación de la curcumina en los distintos nanovehículos, cuando es sometida a estímulos fotolíticos y oxidativos.

Los distintos nanosistemas desarrollados, fueron expuestos a estímulos degradativos para evaluar la estabilidad de la curcumina al estar protegida por estos nanosistemas. Para esto se cargaron estos nanosistemas con aproximadamente 3,5 mg de curcumina y fueron sometidos a fotólisis y oxidación.

Para el estudio de fotólisis, se tomaron 1,5 mL de la formulación que contiene curcumina en una cubeta de cuarzo, la cual fue puesta frente a una lámpara de mercurio, a 10 cm de distancia. La

cubeta fue colocada en un termorregulador que permite el paso del haz de luz y en un espacio cerrado sin filtraciones de luz. Se sometieron las muestras a irradiación UV y se hicieron mediciones de absorbancia a alícuotas tomadas de la muestra cada cierto intervalo de tiempo. Las alícuotas fueron diluidas en acetona (20 μL de formulación en 2,98 mL de acetona) y luego leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 419 nm. Se hicieron las curvas de degradación relacionando tiempo de fotólisis versus absorbancia.

Para el estudio de oxidación y fotólisis, se tomaron 1,5 mL de cada formulación en una cubeta de cuarzo y se agregó 263 μL de H_2O_2 , luego se colocó la cubeta en el mismo sistema utilizado para la fotólisis y se procedió de la misma manera para la medición de las muestras. Se hicieron las curvas de degradación relacionando tiempo de oxidación versus absorbancia.

Los datos obtenidos de absorbancia vs tiempo, fueron llevados a escala logarítmica para ser linealizados, previamente divididos por la absorbancia del primer tiempo medido, de forma de que la curva comienza de la coordenada 0.

A partir de las curvas de degradación se obtuvieron las pendientes de degradación, las cuales fueron comparadas entre cada formulación para establecer cuál es el sistema que presenta una mayor protección a la curcumina.

Resultados y discusiones

1. Optimización de una metodología analítica mediante espectrofotometría para la determinación de curcumina en solución y en los sistemas propuestos.

1.1. Determinación del coeficiente de absortividad molar de curcumina en distintos solventes.

Con el objetivo de determinar el medio óptimo para la cuantificación de curcumina, y que depende en gran medida de la solubilidad de la molécula y sensibilidad para la detección, se realizaron curvas de calibración para este compuesto en distintos solventes. Entre los solventes seleccionados podemos mencionar: etanol, hidróxido de sodio, dimetilsulfóxido, vaselina, Miglyol y acetona.

Tabla 1. Longitud de onda de máxima absorción y coeficiente de absortividad molar experimental de la curcumina obtenido en distintos solventes. (Promedio \pm d.e. n=3)

Solvente	Longitud de onda de máxima absorción (nm)	Coefficiente de absortividad molar (UA M ⁻¹ cm ⁻¹)
Etanol	424	52796 \pm 225
NaOH 0,05M	467	45831 \pm 1576
DMSO	433	48206 \pm 3458
Vaselina	413	43380 \pm 1772
Miglyol	419	56911 \pm 325
Acetona	419	61441 \pm 257

Como se observa en la Tabla 1, la curcumina mostró un mayor coeficiente de absortividad molar en acetona, siendo éste seleccionado como medio de disolución para todas las formulaciones desarrolladas. Es importante destacar que este solvente tiene, además, la capacidad de solubilizar a varios de los componentes de los nanovehículos que se utilizarán con posterioridad, permitiendo romper la estructura de los nanosistemas y facilitando así la extracción y cuantificación de la curcumina.

1.2. Pruebas para la determinación de la cantidad de curcumina a incluir en los nanosistemas.

Con el propósito de seleccionar la cantidad de curcumina que van a contener las formulaciones (y como todas ellas tienen como base común las nanoemulsiones), se prepararon nanoemulsiones (ver sección 2.1) que contenían distintas proporciones de esta molécula (5, 3.69, 2.28 y 1 mg). Posteriormente, se analizó la linealidad de la respuesta por espectrofotometría y

donde la máxima respuesta en términos de absorbancia sería indicativa de una mayor presencia de curcumina en la nanoemulsión (y dispersa en el medio acuoso). Como se aprecia en la Figura 8 y en la Tabla 2, las diluciones de estas formulaciones presentan distintas pendientes, dadas las concentraciones utilizadas. Las diluciones de las formulaciones que contenían 3,69, 2,28 y 1 mg de curcumina presentan mayores absorbancias (y todas presentan similares magnitudes a las mismas concentraciones) que la que contiene 5 mg de curcumina. Considerando esto, seleccionamos la formulación que contiene 3,69 mg de curcumina para los experimentos posteriores pues contiene la cantidad más alta ensayada. Esta cantidad se estableció como carga límite, ya que agregar más curcumina no ofrecería una encapsulación eficiente. Es interesante destacar que, además, se pudo observar la presencia de un precipitado color naranja en la formulación que contenía 5 mg, lo que confirma que esta es una cantidad muy alta para ser encapsulada en la formulación.

Tabla 2. Pendiente de la respuesta lineal en adiciones crecientes de curcumina contenida en las formulaciones.

Cantidad de curcumina (mg) añadida en 5 mL de formulación	Concentración de curcumina en formulación (mg/mL)	Pendiente (UA M ⁻¹ cm ⁻¹)
5,00mg	1,000	15556
3,69mg	0,738	42890
2,28mg	0,456	34802
1,00mg	0,200	36951

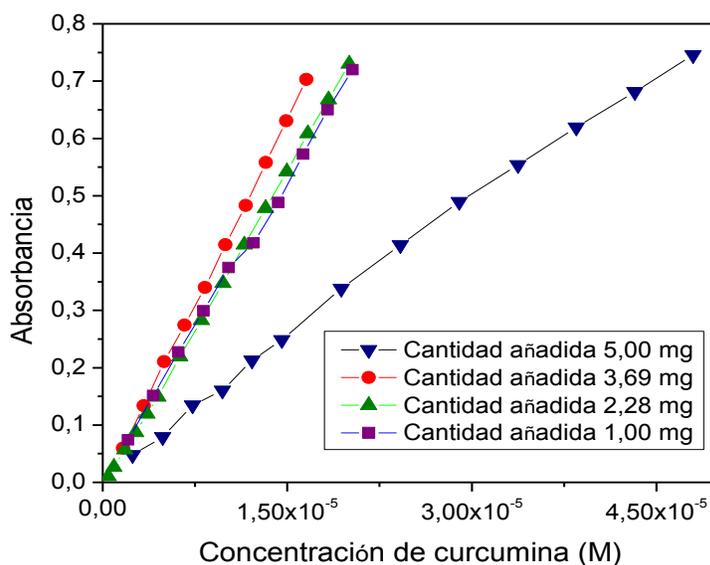


Figura 8. Absorbancia de las formulaciones conteniendo distinta cantidad añadida de curcumina (las formulaciones fueron diluidas varias veces para obtener la gráfica) (n=3)

2. Desarrollo y caracterización de diversas formulaciones conteniendo curcumina.

2.1. Nanoemulsiones.

Las nanoemulsiones desarrolladas en el punto anterior fueron caracterizadas en términos de su tamaño, mediante las técnicas de *dynamic light scattering* (DLS), y de su potencial zeta, mediante *laser Doppler Anemometry* (LDA), utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS. El tamaño promedio de estas formulaciones es de $157,8 \pm 3,2$ nm, con un índice de polidispersión (PDI) de 0,155 y un potencial zeta de $-46,5 \pm 2,1$ mV. Estos resultados se condicen con los ya descritos en la literatura cuando se utiliza una metodología similar de elaboración (desplazamiento de solvente) y encapsulando moléculas lipofílicas ^[5-7,31]. Esta carga negativa está dada debido a que el Epikuron 145 V®, tensoactivo utilizado en este estudio, es una mezcla de surfactantes que incluyen fosfolípidos, ácidos grasos aniónicos y ácido fosfatídico. Este tensoactivo, al ubicarse en la interfase entre el agua y el aceite de la formulación (recubriendo el sistema), produce que la carga superficial de la nanoemulsión sea negativa.

2.2 Nanocápsulas catiónicas de Eudragit E PO.

Con el propósito de añadir una cubierta en la superficie de las nanoemulsiones para estudiar el efecto de ésta en la estabilidad de la curcumina, se desarrollaron varios procedimientos para recubrir las nanoemulsiones con una o más capas poliméricas. Para esto se utilizaron distintos polímeros, entre ellos, el Eudragit E PO. La estrategia para el recubrimiento por parte de este polímero, está basado en la atracción electrostática de este polímero catiónico (pKa: 10) con las cargas negativas de la superficie de la nanoemulsión (dadas por el tensoactivo Epikuron 145V®).

El procedimiento para el desarrollo de estas nanocápsulas fue verter la fase orgánica (que contenía la curcumina, el Miglyol y el tensoactivo Epikuron 145V®) sobre la fase acuosa que contiene el polímero (esta fase acuosa además contenía ácido acético para asegurar la ionización del polímero), seguido de agitación magnética y evaporación del solvente. Las formulaciones obtenidas presentaron un tamaño promedio de $179,1 \pm 5,7$ nm, un PDI de 0,137 y un potencial zeta de $+77,4 \pm 3,2$ mV. Como se puede apreciar, estas formulaciones presentan un tamaño mayor (≥ 21 nm) y una inversión en el potencial zeta (de -46 a +77 mV), cuando se comparan con las nanoemulsiones, lo que confirmaría el recubrimiento por parte del polímero. Estos resultados se condicen con los descritos en la literatura para nanocápsulas compuestas por Eudragit E PO ^[8,9,12,14,15].

2.3 Nanocápsulas catiónicas de quitosano.

Con el motivo de evaluar el efecto de la composición del polímero catiónico en la estabilización de la curcumina en los nanovehículos, se optó por utilizar quitosano. El mecanismo de formación de las nanocápsulas de quitosano es el mismo que para las nanocápsulas de Eudragit E PO, en donde una fase orgánica (conteniendo curcumina, Miglyol y el tensoactivo Epikuron 145V®) es vertida en una fase acuosa que contiene al polímero (en un medio acidificado para que el polímero esté ionizado), seguido de agitación magnética y evaporación del solvente. Al igual que en las nanocápsulas de Eudragit E PO, el recubrimiento está basado en la atracción electrostática entre el polímero catiónico y la superficie de carga negativa de la nanoemulsión.

Las formulaciones de quitosano desarrolladas presentaron un tamaño promedio de $198,5 \pm 10,4$ nm, un PDI 0,302 y un potencial zeta de $70 \pm 7,3$ mV. Como se observa, se produce un aumento en el tamaño de las formulaciones (≥ 40 nm) con respecto a las nanoemulsiones. Además, también se produce la inversión de la carga superficial, lo cual confirma que el polímero se adhiere a la superficie de la nanoemulsión, formando una nanocápsula.

En el caso de las nanocápsulas compuestas por quitosano, se observó un tamaño mayor al obtenido utilizando Eudragit E PO (se produce una diferencia de 19,4 nm), un PDI mayor y un potencial zeta similar. Esta diferencia de tamaño se podría explicar por el grado de compactación de los polímeros sobre la nanoemulsión. Quizás esta compactación explique que Eudragit E PO presente mayor protección contra la degradación que el quitosano, como se va a discutir más adelante.

2.4 Nanocápsulas aniónicas de Eudragit E PO y carragenina iota.

El propósito de este estudio es desarrollar una formulación que incorpore una segunda cubierta polimérica, con la finalidad de evaluar si aumenta la protección de la curcumina dentro de la nanocápsula. Esta nueva formulación se genera a partir de las nanocápsulas catiónicas de Eudragit E PO descritas en 2.2., las cuales fueron recubiertas con un nuevo polímero de carga contraria (carragenina iota) mediante interacción iónica (método capa sobre capa). Este recubrimiento se llevó a cabo mezclando las nanocápsulas de Eudragit E PO con una solución de carragenina iota bajo agitación magnética. La atracción electrostática entre los grupos cargados de ambos polímeros facilitaría la formación de esta segunda cubierta polimérica.

Al momento de agregar la capa de carragenina sobre las nanocápsulas de Eudragit E PO, se produjo un precipitado blanco de gran tamaño y además no se evidenció la inversión de la carga superficial (dada por los valores del potencial zeta), lo que indicaría que la carragenina no se adhirió a la superficie de la nanocápsula. Se postula que la inversión de la carga superficial no se produce debido a la alta concentración de ácido acético glacial utilizada para la formación de las nanocápsulas de Eudragit E PO (1 % v/v). Se cree que la alta cantidad de ácido acético glacial provoca que el medio de la suspensión tenga una alta carga iónica, lo que dificultaría la interacción electrostática entre los grupos cargados de la carragenina y la nanocápsula de Eudragit E PO. Por otra parte, se postula que la presencia de los precipitados se debe a la alta concentración de Eudragit E PO utilizada (1 % p/v), lo cual provocaría que hubiera una gran presencia de este polímero libre en el medio. Debido a esto, al agregar la carragenina, esta interaccionaría no solo con la cubierta de las nanocápsulas, sino también con el Eudragit E PO libre en el medio, formando precipitados. Para solucionar estos inconvenientes, se ajustaron las variables correspondientes a la concentración de ácido acético glacial (1 % v/v) y a la concentración de Eudragit E PO (1 % p/v) utilizadas en las nanocápsulas catiónicas.

Con el objetivo de establecer la cantidad mínima de ácido acético que permita que el Eudragit E PO se mantenga soluble y que, a su vez, permita la interacción electrostática con la carragenina, se realizó una serie de soluciones de Eudragit E PO con distintas concentraciones de ácido acético glacial, seleccionándose la que contuviese la menor cantidad de ácido y que, a la vez, permitiese que el Eudragit E PO fuera soluble.

Tabla 3. Ensayo de solubilidad de Eudragit E PO en agua utilizando distintas concentraciones de ácido acético glacial.

Concentración ácido acético glacial (% v/v)	Solubilidad de Eudragit E PO
1	Soluble
0,5	Soluble
0,25	Soluble
0,2	Soluble
0,175	Insoluble
0,15	Insoluble

Como se observa en la Tabla 3, al utilizar concentraciones de ácido acético glacial igual o menores a 0,175 % v/v, el polímero presenta problemas de solubilidad. Sin embargo, a concentraciones igual o mayores a 0,2 % v/v, se produce una completa disolución del polímero, por lo tanto se utilizará una concentración de ácido acético de 0,2 % v/v.

Luego de haber sido corregida la cantidad de ácido acético a agregar a la solución, y luego de agregar la carragenina, se pudo observar la inversión del potencial zeta de positivo a negativo (-80 mV), lo que indica que se produjo la interacción entre este polímero y la nanocápsula de Eudragit E PO. Sin embargo, se siguió observando la presencia de precipitados.

Como se discutió anteriormente, se cree que la presencia de precipitados también podría estar dada por la alta concentración de Eudragit E PO utilizada en la elaboración de las nanocápsulas catiónicas. Para elucidar esta suposición, se elaboró una serie de nanocápsulas catiónicas con distintas concentraciones de Eudragit E PO, las cuales fueron caracterizadas en función de su tamaño, PDI y potencial zeta. El propósito de esto fue encontrar la formulación de nanocápsulas que necesitara la menor concentración de Eudragit E PO posible y que mantengan las características adecuadas de tamaño, polidispersión y potencial zeta.

Tabla 4. Caracterización de nanocápsulas de Eudragit E PO utilizando distintas concentraciones del polímero. (Promedio \pm d.e., n=3)

Concentración de Eudragit E PO (% p/v)	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
1	179,1 \pm 2,1	0,137	77,4 \pm 4,4
0,75	166,8 \pm 0,8	0,135	85,5 \pm 4,9
0,50	122 \pm 0,6	0,165	83,2 \pm 4,5
0,43	147,9 \pm 2,1	0,157	88 \pm 3,6
0,38	137,3 \pm 0,6	0,147	84,3 \pm 2,1
0,25	146,1 \pm 3,3	0,147	84,8 \pm 8,2
0,13	126,5 \pm 0,8	0,139	86,4 \pm 4,3
0,10	124,1 \pm 1,8	1,174	103 \pm 8,4
0,08	128,6 \pm 1,3	0,165	98,9 \pm 4,7
0,05	135,3 \pm 1,1	0,135	89,9 \pm 3,8
0,03	165,0 \pm 1,3	0,161	84,3 \pm 5,6
0,01	177,7 \pm 1,8	0,126	81,5 \pm 6,4

Como se observa en la Tabla 4, los parámetros se mantuvieron similares en toda la escala de concentraciones, por lo que la concentración seleccionada de Eudragit E PO para la fabricación de las nanocápsulas aniónicas fue 0,01 % p/v, ya que es la menor concentración posible y presenta similares valores de tamaño, potencial zeta y PDI que al utilizar una concentración de polímero de 1% p/v.

Finalmente, para definir la cantidad de carragenina que debía ser agregada para formar las nanocápsulas aniónicas, y sin la presencia de precipitados, se vertieron las nanocápsulas de Eudragit

E PO seleccionadas (Eudragit E PO al 0,01 % p/v y ácido acético al 0,2 % v/v) sobre soluciones de carragenina iota (de concentración $3 \times 10^{-3}M$) en distintas proporciones de ambos componentes.

Tabla 5. Caracterización de nanocápsulas aniónicas utilizando distintas proporciones de nanocápsulas catiónicas y solución del polímero carragenina iota. (Promedio \pm d.e. n=3)

Proporción Nanocápsulas Eudragit E PO : carragenina (volumen)	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
1 a 0	179,1 \pm 5,7	0,137	77,4 \pm 3,2
1 a 1	243,6 \pm 3,6	0,258	-56,5 \pm 0,5
2 a 1	236,2 \pm 2,5	0,275	-50,7 \pm 0,9
3 a 1	311,9 \pm 48,1	0,356	-51,3 \pm 0,6
4 a 1	5177 \pm 388,2	1,000	-12,5 \pm 0,5
1 a 2	243,3 \pm 4,7	0,281	-62,2 \pm 1,7
1 a 3	247,0 \pm 5,1	0,316	-68,4 \pm 2,0
1 a 4	260,5 \pm 3,8	0,329	-73,9 \pm 3,1

Como se observa en la tabla 5, a medida que aumenta la proporción añadida de nanocápsulas de Eudragit E PO (con respecto a la proporción de carragenina), el tamaño aumenta significativamente, así como el PDI, causado probablemente por la agregación entre las nanocápsulas. Se cree que al no haber la cantidad suficiente de carragenina para la gran cantidad de nanocápsulas de Eudragit E PO añadida (al utilizar mayores proporciones de las nanocápsulas), el recubrimiento no se logra completamente y se llega a valores de potencial zeta muy bajos (-12,5 mV). Este valor de potencial zeta indicaría que no hay fuerzas de repulsión suficientes para que estas nanocápsulas sean estables, sino que se atraen formando agregados. Por otra parte, el aumento en la proporción de la carragenina iota, no provoca la formación de agregados de gran tamaño, probablemente porque las menores cantidades añadidas serían suficientes para recubrir significativamente la superficie de las nanoestructuras. Por lo tanto, la proporción de nanocápsulas Eudragit E PO : carragenina seleccionada fue la proporción 1 : 1, ya que posee la menor cantidad de carragenina, con resultados similares a las formulaciones que poseen mayor proporción de este polímero. Finalmente, cuando se compara estas nanocápsulas aniónicas con respecto a las nanocápsulas de Eudragit E PO descritas en 2.2, se evidencia un aumento en el tamaño de aproximadamente 64 nm. Además se observa la inversión en la carga superficial, lo que confirma que la carragenina se adhirió a la superficie de la nanocápsulas de Eudragit E PO, mediante interacciones electrostáticas, formando un segunda cubierta polimérica.

Finalmente, se definió el protocolo de fabricación de nanocápsulas aniónicas de Eudragit E PO - Carragenina. Las nanocápsulas aniónicas Eudragit E PO-Carragenina iota fueron preparadas

mediante el método de recubrimiento iónico. Para esto se fabricaron las nanocápsulas catiónicas de Eudragit E PO según la metodología detallada en 2.2, pero con algunas modificaciones. En vez de una solución de Eudragit E PO al 1 %, se utilizó una solución de Eudragit E PO al 0,01 %, y en lugar de evaporar el solvente hasta un volumen final de 5 mL, se llevó a un volumen final de 2,5 mL, debido a que al agregar la carragenina (2,5 mL) la concentración de curcumina se diluye a la mitad. Además, la concentración de ácido acético utilizada fue de 0,2 % v/v, en vez de 1 % v/v, para disminuir la carga iónica del sistema. Luego, en un tubo de ensayo, se vertió la suspensión de nanocápsulas sobre una solución de carragenina iota a una concentración de 3×10^{-3} M, bajo agitación durante 10 minutos, en una proporción de volumen de 1 : 1. La solución de carragenina se preparó pesando 19,125 mg de carragenina iota y disolviendo a 25 mL de agua purificada.

2.5 Nanocápsula aniónicas quitosano-carragenina iota.

Al igual que en el caso de las nanocápsulas de Eudragit E PO - carragenina, la finalidad de este estudio es evaluar el uso de una segunda capa polimérica (utilizando distintos polímeros) y su efecto en la estabilidad de la curcumina dentro de los nanovehículos. Tal como ocurrió con las nanocápsulas aniónicas descritas en 2.4, al momento de mezclar las nanocápsulas de quitosano con la solución de carragenina, no se evidenció la inversión en la carga superficial. Se postula que la alta cantidad de ácido acético utilizada para la elaboración de las nanocápsulas catiónicas genera una carga iónica en el medio que no permite la interacción entre la carragenina y la superficie cargada de la nanocápsula. Para comprobar esta hipótesis, fue necesario disminuir la cantidad de ácido acético hasta el mínimo posible que permitiera que el quitosano fuera soluble. Para esto, se realizó una serie de soluciones de quitosano con distintas concentraciones de ácido acético, con el objetivo de determinar la cantidad de ácido a agregar.

Tabla 6. Estudio de la solubilidad del quitosano en agua utilizando distintas concentraciones de ácido acético glacial.

Concentración ácido acético glacial (% v/v)	Solubilidad de quitosano
1	Soluble
0,5	Soluble
0,25	Soluble
0,125	Soluble
0,1	Soluble
0,05	Soluble
0,025	Insoluble
0,01	Insoluble

Como se observa en la Tabla 6, al utilizar concentraciones de ácido acético igual o menores a 0,025 % v/v, el quitosano no se disuelve completamente. Por el contrario, al utilizar concentraciones igual o mayores a 0,05 % v/v, se produce la disolución del polímero. Por lo tanto, la menor concentración posible, en donde el quitosano fue soluble, fue de 0,05 % v/v, la cual será utilizada para la fabricación de las nanocápsulas aniónicas.

Al ajustar la cantidad de ácido acético (0,05 % v/v) a agregar en la formulación para desarrollar las nanocápsulas de quitosano, se pudo apreciar que estas formulaciones se formaban de manera adecuada (ver tabla 7). Posteriormente, al mezclar estas formulaciones con la carragenina en una concentración inicial de 3×10^{-3} M (proporción en volumen 1 : 3 de nanocápsulas : carragenina), se pudo obtener las nanocápsulas aniónicas. Con el fin de optimizar la proporción de ambos componentes (en volumen) que debía contener la formulación para desarrollar nanocápsulas aniónicas, se evaluaron varias proporciones de ambos componentes.

Tabla 7. Caracterización de nanocápsulas aniónicas utilizando distintas proporciones de nanocápsulas catiónicas y de solución de carragenina (3×10^{-3} M). (Promedio \pm d.e, n=3)

Proporción nanocápsulas de quitosano : carragenina	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
1 a 0	198,5 \pm 10,4	0,302	70 \pm 7,3
1 a 1	263,9 \pm 12,3	0,308	41,3 \pm 3,2
2 a 1	236,2 \pm 25,6	0,476	50,7 \pm 6,3
3 a 1	303,2 \pm 30,1	0,675	62,1 \pm 9,7
1 a 2	268,4 \pm 11,2	0,375	-38,2 \pm 4,1
1 a 3	276,3 \pm 21,0	0,465	-40,2 \pm 8,5

Como se observa en la Tabla 7, al utilizar una proporción de 1 : 1 (proporción en volumen de nanocápsulas : carragenina), si bien hay una disminución del potencial zeta, no se produce la

inversión en el signo, lo que indica que no se estaría produciendo el recubrimiento por parte de la carragenina iota, probablemente debido a que no hay una cantidad suficiente de este polímero. Lo mismo ocurre al aumentar la proporción de las nanocápsulas de quitosano, en donde además ocurre un aumento en el tamaño y en el valor del PDI. Por otra parte, al utilizar una proporción en volumen de nanocápsulas de quitosano : carragenina de 1 : 2, se aprecia la inversión del potencial zeta de positivo a negativo, debido al posicionamiento de las moléculas de carragenina sobre la superficie de la nanocápsula de quitosano mediante interacciones iónicas. Esto mismo ocurre al utilizar proporciones mayores de carragenina. Por lo tanto la proporción seleccionada de ambos componentes es la de 1 : 2 (nanocápsulas de quitosano : carragenina). Adicionalmente, se observa un aumento en el tamaño de estas nanocápsulas con respecto a las nanocápsulas de quitosano descritas en 2.3, produciéndose un aumento de aproximadamente 69 nm.

2.6. Porcentaje de encapsulación de la curcumina en las formulaciones.

Con el fin de determinar el porcentaje de curcumina que se encuentra dentro de los nanovehículos, se determinó el porcentaje de encapsulación. Este ensayo consistió en una centrifugación y filtración de las formulaciones, utilizando tubos Vivaspin 6, en donde la curcumina que no está encapsulada en los nanosistemas, si existe, es separada del resto de la formulación. El filtrado, que contendría la curcumina que no fue encapsulada por los nanovehículos, es diluido en acetona (500 µL de filtrado en 2,5 mL de acetona) y medido en espectrofotómetro a una longitud de onda de 419 nm.

Tabla 8. Porcentaje de encapsulación de la curcumina en los vehículos desarrollados.

Formulación	Absorbancia	% encapsulación
Nanoemulsiones	< 0,01	99,99
Nanocápsulas Eudragit E PO	no	100
Nanocápsulas quitosano	no	100
Nanocápsulas Eudragit E PO -carragenina	no	100
Nanocápsulas quitosano - carragenina	no	100

Como se observa en la Tabla 8, y también según lo observado visualmente (pues si hubiera algo de curcumina disuelta se apreciaría coloración), no hay presencia de curcumina (disuelta o precipitada) en el medio acuoso externo, sino que toda la curcumina estaría encapsulada dentro de los nanosistemas. Se postula que esto es provocado por la alta hidrofobia de la curcumina (log P=3,07), la cual hace que no se encuentre en el medio acuoso y que se favorezca su presencia en el núcleo oleoso de los nanosistemas.

2.7. Eficiencia de asociación de la curcumina en los nanovehículos desarrollados.

Durante la elaboración de los nanovehículos podría ocurrir una pérdida del principio activo en las distintas etapas del proceso, ya sea por pérdida en el trasvasiado o por degradación del activo, entre otros fenómenos. En las distintas etapas del proceso de elaboración de los nanovehículos, se observa la presencia de curcumina que queda pegada en las paredes de los recipientes, principalmente en el balón utilizado al evaporar los solventes. Por lo tanto, con el objetivo de determinar la cantidad de curcumina que permanece en la formulación al final del proceso de fabricación (y compararla con la cantidad añadida inicialmente), se determinó la eficiencia de asociación. La eficiencia de asociación se expresa de la siguiente forma:

$$\text{Eficiencia de asociación} = \frac{\text{mg totales de fármaco} - \text{mg de fármaco no unido}}{\text{mg totales de fármaco}} \times 100$$

En donde los mg totales de fármaco corresponden a la cantidad de curcumina pesada al inicio del proceso de fabricación y los mg de fármaco no unido corresponde a la cantidad de curcumina que se perdió en el proceso de fabricación.^[35]

La cantidad de curcumina presente en los nanovehículos al final del proceso de fabricación se evaluó a través de la cuantificación de esta molécula en un volumen exacto de la formulación final (la que se rompió y donde la curcumina se solubilizó por la presencia de acetona), a través de espectrofotometría, midiendo a una longitud de onda de 419 nm. Esta cantidad de curcumina se comparó con la añadida antes del proceso de fabricación y, de esta forma, se pudo establecer la cantidad de curcumina que se pierde en el proceso de fabricación.

Tabla 9. Cantidades de curcumina al inicio, curcumina no unida y eficiencia de asociación para cada formulación. (Promedio \pm d.e, n=3)

Formulación	Curcumina al inicio (mg)	Curcumina no unida (mg)	Eficiencia de asociación (%)
Nanoemulsión	3,26	0,05	98,5
Nanocápsulas Eudragit E PO	3,24	0,21	93,5
Nanocápsulas quitosano	3,19	0,28	91,2
Nanocápsulas Eudragit E PO-carragenina	3,11	0,31	90,0
Nanocápsulas quitosano – carragenina	3,28	0,57	82,6

Como se observa en la tabla 9, la eficiencia de asociación del proceso de fabricación en todas las formulaciones está afectada por la pérdida de curcumina en algunas de las etapas de

fabricación. Dado esto, las formulaciones que presentan menor eficiencia de asociación son las que tienen mayor cantidad de pasos en la elaboración, lo que provoca mayor pérdida del fármaco. En cualquier caso, se obtienen rendimientos sobre el 80 % en todas las formulaciones, esto se condice con lo descrito en la literatura.^[14.16] Además, según lo obtenido anteriormente (ver 2.6), se puede afirmar que toda la curcumina presente en la formulación se encuentra dentro de los nanovehículos.

3. Determinación de la estabilidad de la curcumina en los vehículos desarrollados, sometida a estímulos degradativos como fotólisis y oxidación.

El principal objetivo de este estudio es evaluar los cambios en la estabilidad de la curcumina al encapsularla en los nanovehículos desarrollados, cuando es sometida a distintos estímulos degradativos. Los estímulos utilizados en este estudio fueron la radiación UV (estímulo fotolítico) y el radical $\cdot\text{OH}$ (estímulo oxidativo).

Es conocido que la curcumina posee grupos cromóforos, lo que la hace fotosensible. La degradación fotoquímica se produce independientemente del entorno químico y tiene lugar incluso en estado sólido. Sin embargo, la composición, la cinética de degradación y la abundancia relativa de los productos de degradación difieren dependiendo del estado físico del compuesto y de las condiciones de la degradación.^[36] La degradación fotoquímica a través de luz visible ocurre mediante especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas por la curcumina a través del estado triplete de ésta. Este efecto se da a través de la llamada transferencia fotogenerada al oxígeno molecular y transferencia energética a ROS.^[36] Para evaluar la degradación fotoquímica de la curcumina, se generó un estímulo fotolítico a través de irradiación de una muestra por una lámpara de mercurio, bajo condiciones controladas de temperatura y sin filtraciones de luz ambiental.

Por otra parte, la degradación química/oxidativa de la curcumina se produce por oxidación mediante especies reactivas del oxígeno, fundamentalmente por radical hidroxilo y radical superóxido.^[37] El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), agente oxidante utilizado en este estudio, es generado a partir del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cuando este es sometido a radiación UV (Figura 9). Es importante destacar que, para producir el estímulo oxidativo ($\cdot\text{OH}$), es inevitable que se produzca también el estímulo fotolítico, ya que el radical $\cdot\text{OH}$ se produce al someter a fotólisis (con lámpara de mercurio) la muestra que contiene el H_2O_2 . Por lo tanto, cuando se estudie el proceso de oxidación, también se estará observando al mismo tiempo el proceso de fotólisis, ya que la muestra estará sometida a ambos fenómenos y la velocidad de degradación estará influenciada por ambos factores. Dado esto, es interesante separar estos fenómenos para determinar cuánto influye cada uno en la degradación de la curcumina.

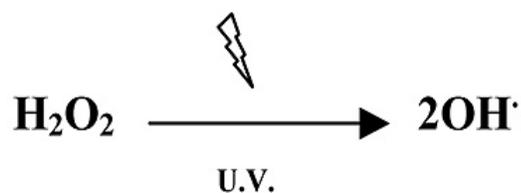


Figura 9. Formación de radical $\cdot\text{OH}$ producto del efecto de la radiación UV sobre el H_2O_2 .

3.1 Evaluación del efecto del H_2O_2 sobre la curcumina.

Como se mencionó anteriormente, el agente oxidante utilizado en este estudio es el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Es sabido que este se genera a partir del H_2O_2 , a través de la radiación UV, y que tiene un efecto degradativo sobre la curcumina. Sin embargo, fue necesario determinar si el H_2O_2 por si solo tiene un efecto degradativo sobre esta molécula, o si la degradación está dada solamente por la generación del radical $\cdot\text{OH}$. Para evaluar este fenómeno, se hicieron tres soluciones de curcumina en acetona; posteriormente, a una se le agregó H_2O_2 y se dejó en oscuridad, a la segunda se le agregó H_2O_2 y fue expuesta a radiación UV para la formación del radical $\cdot\text{OH}$, mientras que a la tercera no se le agregó H_2O_2 y fue puesta en oscuridad (control). Además, se hizo una cuarta solución de curcumina, la cual fue sometida solo a fotólisis, sin agregar H_2O_2 , para evaluar el efecto de la radiación UV. A todas las muestras se les midió la absorbancia (a una longitud de onda de 419 nm) a tiempo cero (antes de ser sometidas a los estímulos), a los 3 días y a los 15 días.

Tabla 10. Estudio del efecto del peróxido de hidrógeno sobre la curcumina. El tiempo inicial corresponde al momento antes de aplicar cualquier estímulo.

Tiempo	Absorbancia de curcumina en ausencia de H_2O_2	Absorbancia de curcumina en presencia de H_2O_2	Absorbancia de curcumina con H_2O_2 y radiación UV	Absorbancia de curcumina solo con radiación UV
Inicial	0,59982	0,59983	0,59975	0,59954
3 días	0,62929	0,61988	0,0001	0
15 días	0,63309	0,61724	0	0

Como se observa en la Tabla 10, al comparar las muestras que no fueron irradiadas, tanto con H_2O_2 como sin éste, se estima que mantuvieron su magnitud de absorbancia en el tiempo, lo cual indicaría que no disminuyó la concentración de curcumina en la solución por efecto del H_2O_2 . Por el contrario, las muestras que fueron sometidas a radiación, tanto con H_2O_2 como sin este, mostraron una disminución total en su absorbancia, lo que indicaría la degradación completa de la curcumina. Esto demostró, bajo las condiciones de trabajo, que el peróxido de hidrógeno no tiene

un efecto oxidativo directo sobre la molécula de curcumina, sino que el efecto deletéreo podría ser causado por la radiación UV y por el radical $\cdot\text{OH}$, formado a partir del H_2O_2 .

Por otra parte, y con el fin de determinar el efecto que tiene la concentración de H_2O_2 en la velocidad de degradación de la curcumina, se realizó un estudio de la degradación de ésta cuando es sometida a distintas concentraciones de H_2O_2 (y expuesta a radiación UV). Es importante destacar que, como se determinó anteriormente, la degradación está dada por el radical $\cdot\text{OH}$ y no por el H_2O_2 . Sin embargo, este estudio fue hecho en base a la concentración de H_2O_2 , debido a la dificultad para cuantificar el radical hidroxilo generado en la formulación. Para llevar a cabo este estudio, se elaboraron varias formulaciones de nanoemulsiones conteniendo curcumina, a las que se les agregó H_2O_2 en distintas concentraciones. Posteriormente, estas fueron sometidas a radiación UV y se realizaron curvas de degradación de la curcumina en estas formulaciones. A través de la comparación entre las pendientes de degradación, se quiso determinar si existía una relación proporcional entre la concentración de H_2O_2 y la degradación de la curcumina.

Tabla 11. Efecto de la concentración de H_2O_2 sobre la pendiente de degradación de la curcumina cuando está incluida en nanoemulsiones. La desviación estándar del promedio de las pendientes de degradación es muy bajo y no es significativo. (n=3)

Concentración H_2O_2 (% v/v)	Pendiente de degradación (min^{-1})
5	0,025
10	0,034
15	0,035
17,5	0,046
25	0,048

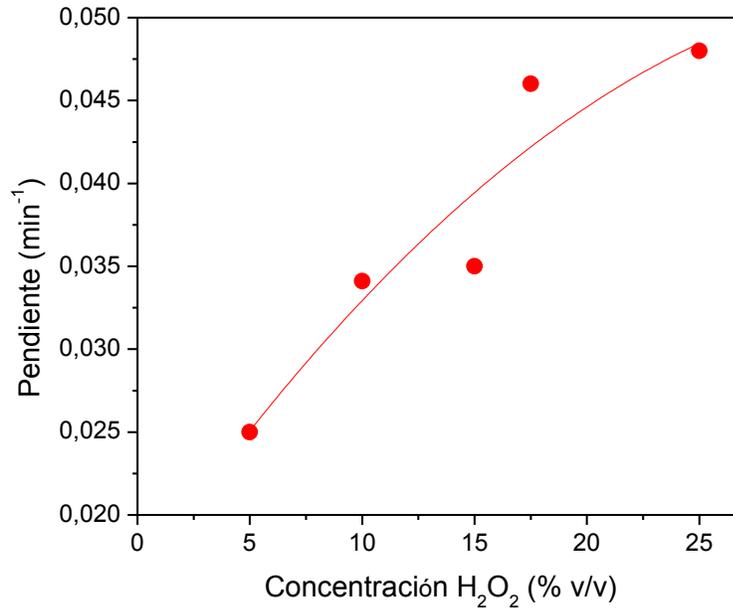


Figura 9. Gráfico de concentración de peróxido de hidrógeno y su efecto en la pendiente de degradación de la curcumina.

Como se observa en la Tabla 11, existe un aumento en la velocidad de degradación a medida que se aumenta la concentración de H₂O₂ utilizada. Sin embargo, como se observa en el gráfico de la Figura 10, si bien hay una tendencia a un aumento en la pendiente de degradación de la curcumina al aumentar la cantidad de H₂O₂, no hay linealidad entre el aumento de la concentración de H₂O₂ y el aumento en la pendiente de degradación, por lo que no se puede establecer una relación directamente proporcional entre ambos parámetros.

Por otra parte, se observó que al utilizar concentraciones mayores al 17,5 % v/v, las nanoemulsiones presentaban un deterioro en su estructura. Para confirmar esto, se midió por espectrofotometría la dispersión de la nanoemulsión sin adición de H₂O₂, observándose un espectro de absorción característico y con picos claros de absorción. Luego se agregó el H₂O₂ a las concentraciones antes observadas y se hizo una lectura del espectro de absorción. A las concentraciones inferiores a 17,5 % v/v no se observó un cambio en el espectro de absorción de las nanoemulsiones, pero al utilizar concentraciones mayores a 17,5 % v/v se observó un rompimiento de las nanoemulsiones, arrojando espectros de absorción sin forma característica y sin picos definidos. Esto indica que a altas concentraciones de H₂O₂, ocurre no solo un aumento en la degradación de la curcumina por efecto oxidativo, sino que también ocurre un rompimiento de la estructura del vehículo.

3.2. Evaluación de la degradación de la curcumina en los distintos nanovehículos, cuando es sometida a estímulos fotolíticos y oxidativos.

El principal objetivo de este trabajo es estudiar los cambios en la estabilidad de la curcumina cuando está incluida en los distintos nanovehículos desarrollados y determinar la formulación que otorga mayor protección a esta molécula. Para esto, se realizaron estudios de degradación de la curcumina cuando está encapsulada en los distintos nanovehículos, utilizando los estímulos degradativos de radiación UV y radical $\cdot\text{OH}$. Las formulaciones, conteniendo curcumina, fueron expuestas a estos estímulos degradativos y se desarrollaron curvas de degradación de esta molécula a través de la evaluación de la disminución de la absorbancia en el tiempo. Como se mencionó anteriormente, es interesante separar y determinar el efecto de cada estímulo utilizado, ya que no ha sido posible, en los experimentos anteriores, discriminar entre el efecto de la radiación UV y del radical $\cdot\text{OH}$. Para esto, es importante recordar que, en los estudios de fotólisis, se observa solamente el efecto de la radiación UV. Por otra parte, en los estudios en donde se agrega H_2O_2 para la generación del radical $\cdot\text{OH}$ (a través de la radiación UV), se estarán observando al mismo tiempo los fenómenos de oxidación y de fotólisis. A través del cálculo de la diferencia entre las pendientes obtenidas por el proceso de fotólisis y por el proceso de oxidación/fotólisis, se podrá estimar el efecto que cada estímulo provoca en la degradación de la curcumina.

3.2.1 Evaluación de la degradación de curcumina en los distintos vehículos cuando es sometida a fotólisis.

Para poder establecer una comparación entre la protección a la curcumina que otorga cada una de las formulaciones desarrolladas cuando son sometidas a estímulos fotolíticos, se realizaron los estudios de degradación de la curcumina para cada nanovehículo. Para esto se prepararon las distintas formulaciones (curcumina en matriz oleosa, nanoemulsiones, nanocápsulas de Eudragit E PO, nanocápsulas de quitosano y nanocápsulas aniónicas de Eudragit E PO – carragenina) y fueron sometidas a radiación UV a través de la exposición a una lámpara de mercurio, controlando la temperatura a 30 °C. Posteriormente se midió la degradación de la curcumina en el tiempo a través de espectrofotometría, diluyendo alícuotas de la formulación en acetona y midiendo a una longitud de onda de 419 nm. Todas las formulaciones fueron preparadas con una concentración de curcumina de 0,07 % p/v. Finalmente, se obtuvieron las pendientes de degradación de la curcumina para cada nanovehículo y se compararon para determinar la formulación que presentó una mayor protección a la curcumina.

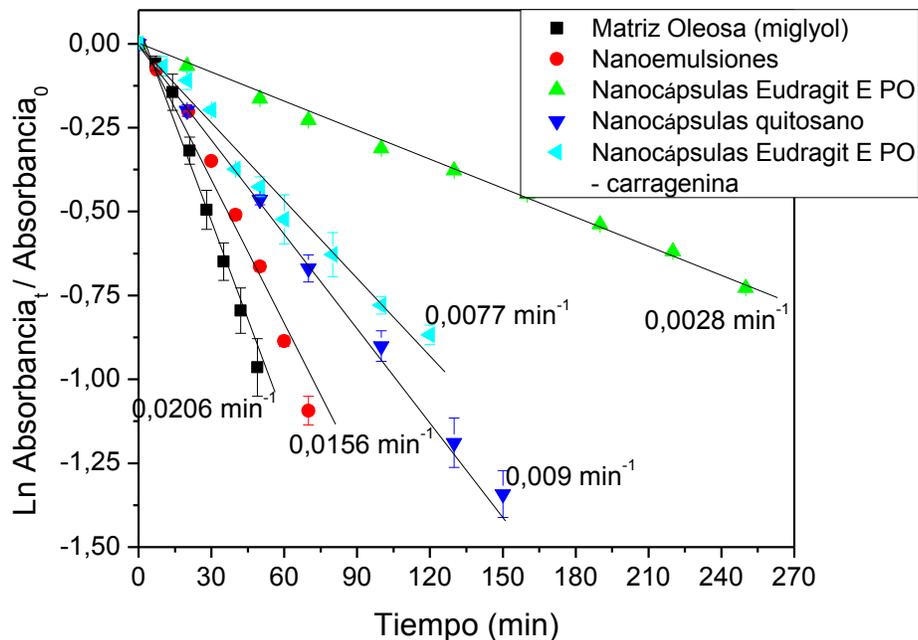


Figura 11. Comparación de las pendientes de degradación de la curcumina frente a fotólisis cuando está incluida en los distintos nanovehículos desarrollados. Al final de cada línea se indica el valor de la pendiente de degradación de la curcumina en cada nanovehículo. (n=3)

Como se observa en la figura 11, la formulación que presentó una mayor pendiente de degradación y, por consiguiente, una menor protección a la curcumina frente a la radiación UV, fue la solución de curcumina en Miglyol (matriz oleosa). Por lo tanto, y tomando en cuenta que el Miglyol es el aceite que contienen todas las formulaciones en su núcleo (y que solubilizaría a la curcumina), se seleccionó este medio como base de comparación con el resto de nanovehículos. Además, se observa que al incluir a la curcumina en nanovehículos (nanoemulsiones y nanocápsulas), hay una disminución en la pendiente de degradación de esta molécula, lo que indicaría que estos nanosistemas protegen a la curcumina del efecto degradativo de la radiación UV. Se observa que la formulación que mostró una menor degradación de la curcumina fue la de nanocápsulas de Eudragit E PO.

Por otra parte, con el fin de asignar un valor de estabilidad frente a la fotólisis, para facilitar la comparación, se estableció un valor de protección relativa para cada vehículo utilizado. Para esto, se hizo una relación entre las pendientes de degradación de cada vehículo y se comparó con la pendiente de degradación de la curcumina cuando está en su vehículo más simple y de menor protección (en el caso del proceso de fotólisis fue el Miglyol), otorgándole un valor de protección relativa de 1. Por lo tanto, calculando la razón entre la pendiente de los vehículos frente a la

pendiente en Miglyol se obtiene un valor de protección relativa, indicando la cantidad de veces que aumenta la protección de la curcumina al utilizar cada nanoformulación.

Tabla 12. Comparación, en términos de protección relativa, de la estabilidad que cada vehículo aporta a la curcumina frente a la radiación UV.

Vehículo	Pendiente de degradación (min⁻¹)	Protección relativa
Matriz oleosa (Miglyol)	0,0206	1
Nanoemulsión	0,0156	1,32
Nanocápsula catiónica Eudragit E PO.	0,0028	7,36
Nanocápsula catiónica quitosano	0,009	2,29
Nanocápsulas aniónica Eudragit E PO - carragenina	0,0077	2,67

Como se observa en la Tabla 12, todas las formulaciones desarrolladas presentan un aumento en la protección de la curcumina, al ser comparadas con la curcumina en solución de Miglyol. Por lo tanto, se puede afirmar que la inclusión de la curcumina en nanosistemas de núcleo oleoso, a través de distintas metodologías, aumentaría su estabilidad frente a la fotólisis provocada por la radiación UV.

Como se mencionó anteriormente, la inclusión de la curcumina en una nanoemulsión aumenta su resistencia frente a la fotólisis, este aumento es de 1,32 veces con respecto a la matriz oleosa. Además, la adición de una cubierta polimérica sobre estas nanoemulsiones, tanto de Eudragit E PO como de quitosano, aumenta aún más la protección de la curcumina. Sin embargo, como se observa en la Tabla 12, la protección de la curcumina no aumenta en la misma magnitud al comparar ambos polímeros. Se observa que la degradación de la curcumina es 7,36 veces más lenta en las nanocápsulas de Eudragit E PO que en la solución de Miglyol, mientras que en las nanocápsulas de quitosano la degradación solo es 2,29 veces más lenta. Se postula que esta menor protección otorgada por el quitosano puede ser explicada debido a que el quitosano posee un grupo amino foto-reactivo, el cual, al ser sometido a radiación UV, forma radicales libres que pueden reaccionar con la curcumina, aumentando su degradación.^[39]

Por otra parte, también se puede apreciar el efecto de agregar una segunda capa polimérica y se puede comparar el efecto de las nanocápsulas de Eudragit E PO con las nanocápsulas de Eudragit E PO-carragenina. Como se observa en la tabla 12, la protección que otorga esta última cubierta polimérica es menor a las nanocápsulas de Eudragit E PO (2,67 de protección relativa contra 7,36 de la nanocápsulas de Eudragit E PO), pese a que presentan una doble cubierta (formada por

Eudragit E PO y carragenina). Por lo tanto, la adición de una segunda cubierta de carragenina no aumenta la estabilidad de la curcumina frente a efectos degradativos como la radiación UV. Esto podría explicarse por el hecho de que una de las desventajas del método utilizado es que la atracción entre la segunda cubierta polimérica (carragenina) y el primer polímero que recubre a la nanoemulsión (Eudragit E PO), puede provocar que disminuya la interacción entre la nanoemulsión y el primer polímero (Eudragit E PO), lo que debilitaría la estructura de la cubierta polimérica.

3.2.2 Evaluación de la degradación de curcumina en los distintos vehículos cuando es sometida a oxidación/fotólisis.

El otro estímulo degradativo aplicado a la curcumina es la oxidación causada por el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Como se mencionó anteriormente, este agente oxidante es generado *in situ* al aplicar radiación UV sobre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Por lo tanto, al igual que con el estudio de fotólisis (ver 3.2.1), las formulaciones desarrolladas fueron expuestas a radiación UV, sin embargo, esta vez fue en presencia de peróxido de hidrógeno y utilizando las mismas condiciones experimentales que en el estudio de fotólisis (control de temperatura a 30 °C, midiendo la absorción a 419 nm y diluyendo las muestras en acetona para la medición). La concentración de curcumina utilizada fue de 0,07 % p/v, mientras que el H_2O_2 se agregó en una concentración de 17,5 % v/v. Finalmente, al igual que en el estudio de la fotólisis, se obtuvieron las pendientes de degradación de la curcumina para cada nanovehículo y se compararon para determinar la formulación que presentó una mayor protección a la curcumina.

Como se mencionó anteriormente, es importante destacar que en este estudio se observan los efectos tanto de la fotólisis como de la oxidación, ya que es necesario exponer la muestra a radiación UV para la generación del radical $\cdot\text{OH}$. Por lo tanto, las pendientes de degradación obtenidas en este estudio incluirán los efectos de ambos procesos degradativos. Posteriormente se podrá separar y diferenciar el efecto de cada estímulo.

Es importante destacar que no se pudo determinar el efecto de la oxidación/fotólisis de la curcumina en una solución de Miglyol, ya que el H_2O_2 no es miscible con este aceite, produciéndose una separación de las fases y dificultando la interacción entre la curcumina y el agente oxidante.

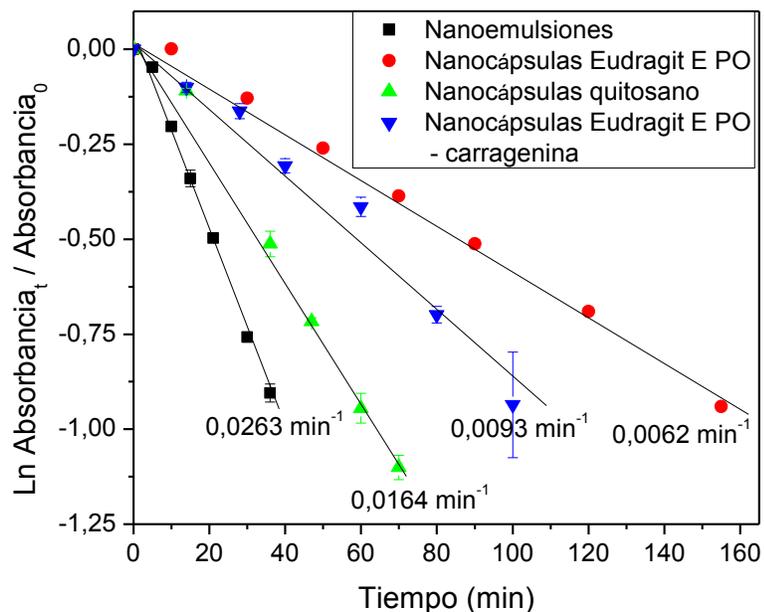


Figura 12. Comparación de las pendientes de degradación de la curcumina frente a radical $\cdot\text{OH}$ y radiación UV cuando está incluida en los distintos nanovehículos desarrollados.

Como se observa en el gráfico de la Figura 12, la formulación que presentó una mayor pendiente de degradación y, por consiguiente, una menor protección a la curcumina frente a la oxidación/fotólisis, fue la nanoemulsión. Por lo tanto, este nanovehículo fue tomado como base de comparación frente a las otras formulaciones. Por otra parte, la formulación que presenta una mayor protección para la curcumina corresponde a las nanocápsulas de Eudragit E PO, al igual que lo observado en el proceso donde únicamente se estudia la fotólisis.

Al igual que en el estudio de la fotólisis, se estableció un valor de protección relativa para cada nanovehículo utilizado. Para esto se hizo una relación entre las pendientes de degradación de cada vehículo y se comparó con la pendiente de degradación de la curcumina cuando está en su vehículo de menor protección (en el caso del proceso de oxidación/fotólisis fue la nanoemulsión), otorgándole un valor de protección relativa de 1. Por lo tanto, calculando la razón entre la pendiente de los vehículos frente a la pendiente en la nanoemulsión, se obtiene un valor de protección relativa, indicando la cantidad de veces que aumenta la protección de la curcumina al utilizar cada vehículo.

Tabla 13. Comparación, en terminos de protección relativa, de la protección que cada vehículo aporta a la curcumina frente al radical $\cdot\text{OH}$ y radiación UV.

Vehículo	Pendiente de degradación (min^{-1})	Protección relativa
Nanoemulsión	0,0263	1
Nanocápsula catiónica Eudragit E PO.	0,0062	4,24
Nanocápsula catiónica quitosano	0,0164	1,60
Nanocápsulas aniónica Eudragit E PO - carragenina	0,0093	2,83

Como se observa en la tabla 13, al comparar la pendiente de degradación de la nanoemulsión frente a los otros nanovehículos, se observa que al agregar una o más cubiertas poliméricas (formando las nanocápsulas), la protección para la curcumina frente a oxidación/fotólisis aumenta. Sin embargo, se observan efectos distintos según el polímero utilizado, ya que las nanocápsulas formadas con Eudragit E PO presentan una protección relativa 4,24 veces más alta que la nanoemulsión, mientras que las nanocápsulas formadas únicamente con quitosano solo aumentan la protección de la curcumina en 1,6 veces. Esta menor protección otorgada por el quitosano frente al radical hidroxilo puede ser explicada por varios factores: el primero es que a bajas concentraciones, las cadenas de quitosano se expanden, provocando un fácil acceso a radicales libres como el $\cdot\text{OH}$, esto genera una mayor interacción entre el agente oxidante y la curcumina, aumentando la velocidad de degradación de esta. Por el contrario, un aumento de la concentración de quitosano, provoca un ensamblaje más fuerte entre las cadenas y esto dificultaría el paso del radical $\cdot\text{OH}$, pero esto trae como consecuencia la dificultad para incorporar otra cubierta polimérica.^[38]

Otro factor que influye en la mayor degradación de la curcumina cuando está incluida en nanocápsulas de quitosano, es el hecho de que el radical $\cdot\text{OH}$ provoca la degradación de la molécula de quitosano cuando esta está protonada, lo que lleva a un rompimiento de la cadena de este polímero, provocando la desestructuración de la cubierta polimérica. Adicionalmente, uno de los productos de la degradación del quitosano es un compuesto que posee un radical libre, el cual podría aportar a la degradación de la curcumina (Figura 13).^[38] La suma de todos estos factores podría explicar que el quitosano proteja menos que el Eudragit E PO.

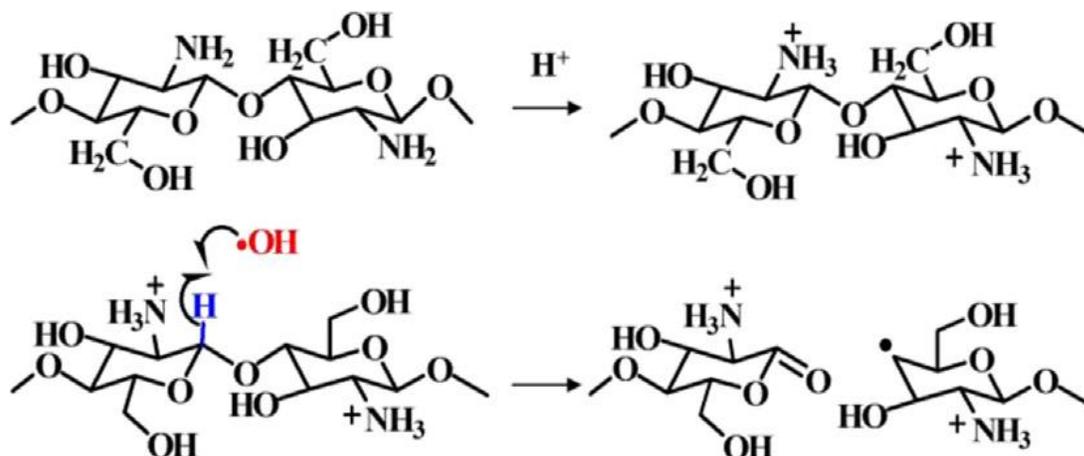


Figura 13. Degradación del quitosano en medio ácido por el radical $\cdot OH$.^[38]

Por otra parte, la adición de una cubierta de carragenina sobre las nanocápsulas de Eudragit E PO, no aumentó la protección sobre la curcumina, sino que la disminuyó. Estos mismos comportamientos se observaron en el estudio de fotólisis de la curcumina, postulando las mismas teorías explicadas en ese estudio (ver 3.2.1).

Por lo tanto, según los resultados obtenidos en ambos estudios, el nanovehículo que presentó una mayor protección para la curcumina frente a la radiación UV y al radical $\cdot OH$ y, por lo tanto, ofrece una mayor estabilidad a esta molécula, corresponde a las nanocápsulas de Eudragit E PO.

3.2.3. Determinación del porcentaje de degradación que ejerce cada estímulo degradativo sobre la curcumina.

Como se mencionó anteriormente, en el estudio del efecto del radical $\cdot OH$ sobre la curcumina, la degradación de la curcumina está dada por el efecto de ambos estímulos (radiación UV y radical $\cdot OH$). Esto es debido a se requiere del efecto de la radiación UV para la generación del agente oxidante. Por lo tanto, con el objetivo de determinar el porcentaje de degradación de la curcumina que es atribuido a cada estímulo en las distintas formulaciones, se calculó la diferencia entre las pendientes de degradación obtenidas en el proceso de fotólisis y las pendientes de degradación obtenidas en el proceso de oxidación/fotólisis. De esta forma, se pudo otorgar de forma estimada la proporción de degradación (o porcentaje de degradación) producido por cada estímulo para cada nanovehículo.

Tabla 14. Porcentaje de degradación de la curcumina atribuido a cada estímulo degradativo.

Vehículo	Porcentaje de degradación por radiación UV (%)	Porcentaje de degradación por radical $\cdot\text{OH}$ (%)
Nanoemulsiones	59	41
Nanocápsulas Eudragit E PO	45	55
Nanocápsulas quitosano	55	45
Nanocápsulas Eudragit E PO – carragenina	83	17

Como se observa en la tabla 14, tanto en las nanoemulsiones, como en las nanocápsulas de Eudragit E PO y en las nanocápsulas de quitosano, no hay dominio claro de uno de los dos estímulos estudiados en la degradación de la curcumina, sino que ambos ejercen un efecto degradativo de magnitud similar. Sin embargo, esto cambia al agregar una segunda cubierta polimérica (carragenina), en donde la degradación estaría provocada mayoritariamente por un efecto fotolítico (83 %). Esto, presumiblemente, podría ser provocado porque, al tener una doble capa polimérica, la interacción entre el radical $\cdot\text{OH}$ y las moléculas de curcumina estaría dificultada, haciendo que sea más difícil para el radical $\cdot\text{OH}$ acceder al núcleo de la nanocápsula (en donde se encuentra la curcumina) y ejercer su efecto degradativo. Por otra parte, otra suposición es que, al producirse el efecto de la oxidación por parte del radical hidroxilo, este se consume, lo que disminuiría su cantidad y, por lo tanto, su efecto degradativo. Por el contrario, el estímulo fotolítico no se consume, ya que es generado sin interrupciones.

Por lo tanto, como se describió anteriormente, si bien no hay un aumento en la protección de la curcumina al agregar la cubierta de carragenina, la adición de una segunda capa polimérica sobre las nanocápsulas de Eudragit E PO aumentaría la protección específicamente contra la oxidación por el radical $\cdot\text{OH}$.

Conclusiones

De entre todos los solventes en los que la curcumina es soluble, el que ofrece una mejor solubilidad y, por lo tanto, entregaría una mayor sensibilidad al momento de cuantificar mediante espectrofotometría UV-visible es la acetona. La curcumina presenta su máximo de absorción a una longitud de onda de 419 nm. La cantidad de carga de curcumina adecuada para los nanovehículos es de aproximadamente 3,5 mg, una cantidad superior provoca que no toda sea encapsulada y se produce precipitación de la curcumina en la fase acuosa.

Se desarrollaron distintos nanovehículos en donde se incorporó la curcumina, para esto fue necesario ajustar parámetros como cantidad y proporción de polímeros en la formulación, pH necesario para una correcta solubilización de los componentes, evaporación del solvente, entre otros. Basándose en técnicas tradicionales, se desarrollaron nanovehículos, específicamente nanocápsulas de Eudragit E PO, nanocápsulas de quitosano, nanocápsulas de Eudragit E PO recubiertas por carragenina y nanocápsulas de quitosano recubiertas por carragenina. Estos nanovehículos fueron caracterizados presentando tamaños de entre 160-250 nm, valores de PDI cercanos y menores al 0,3, y valores de potencial zeta cuyas magnitudes absolutas son lo suficientemente altas como para ofrecer una buena estabilidad. Además, los nanovehículos desarrollados obtuvieron una eficiencia de asociación de la curcumina mayor al 80% en todos los casos, en donde las pérdidas de curcumina ocurrieron principalmente durante la etapa de rotaevaporación del solvente, pues esta molécula se pegaba a las paredes del balón durante el proceso. Finalmente, en las formulaciones desarrolladas, se pudo elucidar que toda la curcumina presente en la formulación se encuentra en el interior del nanovehículo.

Los resultados del estudio de degradación de la curcumina en los distintos nanosistemas desarrollados demuestran que la inclusión de la curcumina en estos nanovehículos, además de solubilizar al fármaco gracias a su núcleo oleoso, ofrece una protección del principio activo frente a estímulos degradativos, lo que podría aumentar de manera sustancial su estabilidad. En comparación con una solución de curcumina en una matriz oleosa, la inclusión de la curcumina en los nanovehículos retrasa su degradación frente a fotólisis y radical hidroxilo, llegando a presentar un protección de hasta 7 veces en el caso de las nanocápsulas de Eudragit E PO, las cuales fueron las que mayor protección presentaron. Esto confirma que la inclusión de una cubierta polimérica sobre las nanoemulsiones, aumenta la protección del principio activo.

Si bien la inclusión de una segunda capa polimérica no aumenta la resistencia frente a la degradación, si aumenta la resistencia de forma específica frente a la oxidación, probablemente porque su doble capa haría que fuese más difícil para el radical $\cdot\text{OH}$ llegar a interactuar con la curcumina que está dentro del núcleo. Por esta causa se observa que en la formulación que posee dos capas poliméricas, el efecto degradativo está dado en un 83% por la radiación UV, a diferencia de las otras formulaciones en donde el efecto de la luz provoca cerca de un 50% de la degradación de la curcumina.

Bibliografía

- [1] M. Mesa, M. Ramírez-Tortosa, C. Aguilera García, A. Ramírez-Boscá, Á. Gil Hernández, Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides, *Ars Pharmaceutica*, 41:3, (2000), 307-321.
- [2] I. Stankovic, *Curcumin: Chemical and Technical Assessment (CTA)*, JECFA, Rome, 8 (2004).
- [3] M. Akram, S. Uddin, A. Ahmed, K. Usmanghani, A. Hannan, E. Mohiuddin, M. Asif, *Curcuma longa* and curcumin: a review article, *Romanian Journal of Biology - Plant Biology*, 55 (2010) 65-70.
- [4] G. Dhar, D. Chakravarty, J. Hazra, J. Dhar, A. Poddar, M. Pal, P. Chakrabarti, A. Surolia, B. Bhattacharyya, *Actin–Curcumin Interaction: Insights into the Mechanism of Actin Polymerization Inhibition*, *Biochemistry*, 54 (2015) 1132-1143.
- [5] S. Kumavat, Y. Chaudhari, P. Borole, P. Mishra, K. Shenghani, P. Duvvuri, *Degradation studies of curcumin*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3 (2013) 50-55.
- [6] L. Shen, H.-F. Ji, *The pharmacology of curcumin: is it the degradation products?*, *Trends in molecular medicine*, 18 (2012) 138-144.
- [7] Y.-J. Wang, M.-H. Pan, A.-L. Cheng, L.-I. Lin, Y.-S. Ho, C.-Y. Hsieh, J.-K. Lin, *Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products*, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 15 (1997) 1867-1876.
- [8] J. González-Albadalejo, D. Sanz, R.M. Claramunt, J.L. Lavandera, I. Alkorta, J. Elguero, *Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties*, *An Real Acad Farm*, 81 (2015) 278-310.
- [9] T.R. Borrin, E.L. Georges, I.C. Moraes, S.C. Pinho, *Curcumin-loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: an evaluation of process parameters and physico-chemical stability*, *Journal of Food Engineering*, 169 (2016) 1-9.
- [10] K. Ahmed, Y. Li, D.J. McClements, H. Xiao, *Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: encapsulation and release properties*, *Food Chemistry*, 132 (2012) 799-807.

- [11] S.L. Orellana, C. Torres-Gallegos, R. Araya-Hermosilla, F. Oyarzun-Ampuero, I. Moreno-Villoslada, Association Efficiency of Three Ionic Forms of Oxytetracycline to Cationic and Anionic Oil-In-Water Nanoemulsions Analyzed by Diafiltration, *Journal of pharmaceutical sciences*, 104 (2015) 1141-1152.
- [12] K. Letchford, H. Burt, A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 65 (2007) 259-269.
- [13] S. Khoei, M. Yaghoobian, An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion, *European journal of medicinal chemistry*, 44 (2009) 2392-2399.
- [14] L. Cruz, L.U. Soares, T. Dalla Costa, G. Mezzalana, N.P. da Silveira, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers, *International journal of pharmaceutics*, 313 (2006) 198-205.
- [15] V.C.F. Mosqueira, P. Legrand, A. Gulik, O. Bourdon, R. Gref, D. Labarre, G. Barratt, Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules, *Biomaterials*, 22 (2001) 2967-2979.
- [16] A. Ourique, A. Pohlmann, S. Guterres, R. Beck, Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study, *International journal of pharmaceutics*, 352 (2008) 1-4.
- [17] S. Guinebretiere, Nanocapsules par émulsion-diffusion de solvant: obtention, caractérisation et mécanisme de formation, in, Lyon 1, 2001.
- [18] C.P. Reis, R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, F. Veiga, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2 (2006) 8-21.
- [19] N. Anton, J.-P. Benoit, P. Saulnier, Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review, *Journal of Controlled Release*, 128 (2008) 185-199.
- [20] C. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *International journal of pharmaceutics*, 385 (2010) 113-142.

- [21] I.L. Radtchenko, G.B. Sukhorukov, H. Möhwald, Incorporation of macromolecules into polyelectrolyte micro-and nanocapsules via surface controlled precipitation on colloidal particles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 202 (2002) 127-133.
- [22] I.L. Radtchenko, G.B. Sukhorukov, H. Möhwald, A novel method for encapsulation of poorly water-soluble drugs: precipitation in polyelectrolyte multilayer shells, *International Journal of Pharmaceutics*, 242 (2002) 219-223.
- [23] A.A. Antipov, G.B. Sukhorukov, S. Leporatti, I.L. Radtchenko, E. Donath, H. Möhwald, Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 198 (2002) 535-541.
- [24] H. Ai, J. Gao, Size-controlled polyelectrolyte nanocapsules via layer-by-layer self-assembly, *Journal of materials science*, 39 (2004) 1429-1432.
- [25] I.L. Radtchenko, G.B. Sukhorukov, S. Leporatti, G.B. Khomutov, E. Donath, H. Möhwald, Assembly of alternated multivalent ion/polyelectrolyte layers on colloidal particles. Stability of the multilayers and encapsulation of macromolecules into polyelectrolyte capsules, *Journal of Colloid and Interface Science*, 230 (2000) 272-280.
- [26] G.B. Sukhorukov, E. Donath, H. Lichtenfeld, E. Knippel, M. Knippel, A. Budde, H. Möhwald, Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles, *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 137 (1998) 253-266.
- [27] P. Calvo, J.L. Vila-Jato, M.a.J. Alonso, Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers, *International Journal of Pharmaceutics*, 153 (1997) 41-50.
- [28] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in polymer science*, 31 (2006) 603-632.
- [29] P. Khachane, M.S. Nagarsenker, Eudragit EPO nanoparticles: application in improving therapeutic efficacy and reducing ulcerogenicity of meloxicam on oral administration, *Journal of biomedical nanotechnology*, 7 (2011) 590-597.
- [30] J. Li, I.W. Lee, G.H. Shin, X. Chen, H.J. Park, Curcumin-Eudragit® E PO solid dispersion: a simple and potent method to solve the problems of curcumin, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94 (2015) 322-332.

- [31] R. Moustafine, A. Bukhovets, A. Sitenkov, V. Kemenova, P. Rombaut, G. Van den Mooter, Eudragit E PO as a complementary material for designing oral drug delivery systems with controlled release properties: comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with countercharged eudragit L100 copolymers, *Molecular pharmaceuticals*, 10 (2013) 2630-2641.
- [32] G.R. Mahdavinia, A. Mosallanezhad, M. Soleymani, M. Sabzi, Magnetic-and pH-responsive κ -carrageenan/chitosan complexes for controlled release of methotrexate anticancer drug, *International journal of biological macromolecules*, 97 (2017) 209-217.
- [33] A. Dafe, H. Etemadi, H. Zarredar, G.R. Mahdavinia, Development of novel carboxymethyl cellulose/ κ -carrageenan blends as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria, *International journal of biological macromolecules*, 97 (2017) 299-307.
- [34] M. Sathuvan, R. Thangam, M. Gajendiran, R. Vivek, S. Balasubramanian, S. Nagaraj, P. Gunasekaran, B. Madhan, R. Rengasamy, κ -Carrageenan: An effective drug carrier to deliver curcumin in cancer cells and to induce apoptosis, *Carbohydrate polymers*, 160 (2017) 184-193.
- [35] F. Oyarzun-Ampuero, J. Brea, M. Loza, D. Torres, M. Alonso, Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma, *International journal of pharmaceuticals*, 381 (2009) 122-129.
- [36] G. Bai, C. Yu, C. Cheng, E. Hao, Y. Wei, X. Mu, L. Jiao, Syntheses and photophysical properties of BF₂ complexes of curcumin analogues, *Organic & biomolecular chemistry*, 12 (2014) 1618-1626.
- [37] C. Schneider, O.N. Gordon, R.L. Edwards, P.B. Luis, Degradation of curcumin: from mechanism to biological implications, *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (2015) 7606-7614.
- [38] C. Chokradjaroen, R. Rujiravanit, A. Watthanaphanit, S. Theeramunkong, N. Saito, K. Yamashita, R. Arakawa, Enhanced degradation of chitosan by applying plasma treatment in combination with oxidizing agents for potential use as an anticancer agent, *Carbohydrate Polymers*, 167 (2017) 1-11.
- [39] C. Alarcón, M. Inostroza-Riquelme, C. Torres, C. Araya, M. Miranda, I. Moreno-Villoslada, F. Oyarzún-Ampuero, Protection of astaxanthin from photodegradation by its inclusion in hierarchically assembled nano and microstructures with potential as food, *Food Hydrocolloids*, (2017), en revisión.

