

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



**Una propuesta teórica, y una aproximación
práctica, para desarrollar un nuevo
nanovehículo con potencial para la
administración oral de luteína**

Memoria para optar al título de químico farmacéutico por:

Bastían Alejandro Martínez Loyola

Patrocinante y director: Dr. Felipe Oyarzún Ampuero

Lugar: Laboratorio de *Drug Delivery* y Laboratorio de Encapsulación,

Universidad de Chile

Santiago, Chile

2022

Dedicatoria

A mis padres
Baddy y Lorena,
mi papi Iván, y a Yuuki.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres, por su apoyo incondicional durante esta parte de mi vida.

A mi hermana, por mantenerme cuerdo.

Al profesor Felipe Oyarzún por facilitarme su conocimiento, buena disposición y lugar de trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por enseñarme a utilizar los equipos y herramientas necesarios para llevar a cabo este trabajo, en especial a la Gaby, María Gabriela Villamizar, por su contribución con la parte experimental de este trabajo.

A toda la comunidad de la facultad de farmacia.

Abreviaturas

AA	Ácido ascórbico
apoB	Apolipoproteína B
apoA1	Apolipoproteína A1
AREDS	<i>Age-Related Eye Disease Study</i>
CLP	Peso chileno
COVID19	Enfermedad por coronavirus de 2019
DMO	Degeneración macular ocular
FDA	Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
IC₅₀	Mitad de la concentración inhibitoria máxima
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LUT	Luteína
MCT	Triglicéridos de cadena media
MTTP	Proteína de transporte de triglicéridos microsomales
mZEA	Mesozeaxantina
O/W	Aceite en agua
PDI	Índice de polidispersión
RPE	Epitelio pigmentario de la retina
RPE65	Isomerohidrolasa retinoide
SRB1	Receptor <i>scavenger</i> B1
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
W/O	Agua en aceite
XBPs	Proteínas ligadoras de xantofilas
ZEA	Zeaxantina

Contenido

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ABREVIATURAS	III
CONTENIDO	IV
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- DEGENERACIÓN DE LA MÁCULA OCULAR	1
1.2.- FLOR DE TAGETE (<i>TAGETE PATULA</i>).....	2
1.3.- LUTEÍNA (<i>LUT</i>)	3
1.4.- NANOFORMULACIONES <i>O/W</i>	5
1.5.- POLVOS SECOS COMO FORMA FARMACÉUTICA	6
1.6.- POLVOS SECOS DE TAMAÑO NANOMÉTRICO	8
1.7.- OBJETIVO GENERAL	10
1.8.- LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS PROPUESTOS SON:.....	10
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1.- BÚSQUEDA DE LA INFORMACIÓN	11
2.2.- MATERIALES	11
2.3.- INSTRUMENTOS Y EQUIPOS.....	12
2.4.- MÉTODOS	12
2.4.1.- <i>Hidrólisis de quitosano</i>	12
2.4.2.- <i>Preparación de la nanoformulación O/W recubiertas con quitosano por medio de emulsificación espontánea</i>	13
2.4.3.- <i>Preparación de nanocápsulas cubiertas en Eudragit® L100-55</i>	14
2.4.3.- <i>Preparación de nanopolvos a partir de las nanoemulsiones formadas anteriormente</i>	14

2.4.4.- Análisis tamaño de partículas, potencial zeta y concentración de las nanoformulaciones obtenidas	15
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.1.- ESTUDIO DE MERCADO	15
3.2.- PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS DE LA LUT	17
3.3.- BIOACTIVIDAD, ABSORCIÓN Y METABOLISMO DE LUT	21
3.4.- ENCAPSULACIÓN DE LUT	24
3.4.1.- <i>Emulsiones múltiples</i>	25
3.4.2.- <i>Nano y microcápsulas multicapa</i>	27
3.4.3.- <i>Emulsiones secadas por aspersion</i>	29
3.5.- PROPUESTA PARA EL DISEÑO DE UNA FORMULACIÓN QUE CONTENGA LUT Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR.	30
3.6.- CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE NANOPOLVOS	33
4.- CONCLUSIÓN	36
BIBLIOGRAFÍA	38
ÍNDICE DE FIGURAS	49
INDICE DE TABLAS	49

1.- Introducción

1.1.- Degeneración de la mácula ocular

La degeneración macular ocular (DMO) es una enfermedad degenerativa que afecta la estructura y el funcionamiento del ojo. Consiste en la degeneración progresiva de la región central de la retina, la mácula. La DMO suele causar visión borrosa y, una vez avanzada, puede causar pérdida de la visión. Esta enfermedad es una de las principales causas de ceguera en países desarrollados (ocupa el cuarto puesto a nivel mundial y es la causa más común de ceguera en mayores de 50 años). Es importante destacar que la prevalencia de DMO aumenta proporcionalmente con la edad, lo que resulta crítico pues la expectativa de vida está en franco aumento a nivel mundial. La DMO se divide en 2 tipos, atrófica y exudativa. El 90% de los casos corresponden a la variante atrófica, mientras que un 10-20% de estos pueden progresar a la variante exudativa (Mehta 2015). A la fecha, no existen alternativas terapéuticas para tratar la variante atrófica; mientras que para la exudativa se utilizan anticuerpos monoclonales anti-VEGF (ranibizumab, aflibercept y bevacizumab, entre otros). Además, se ha observado que la administración de suplementos minerales/vitamínicos no tienen influencia sobre la prevención de la enfermedad. Sin embargo, es importante destacar que, una vez iniciada la patología, su progresión se puede disminuir significativamente con la administración de luteína (LUT) y zeaxantina (ZEA) (Benrstein y Hobbs 2014, Krinsky, Landrum y Bone 2003, Chitchumroonchokchai, Bomser, y otros 2004, Mercadante, y otros 2017).

1.2.- Flor de Tagete (*Tagete patula*)

La familia *Asteraceae* consiste en más de 1900 géneros y más de 32000 especies de plantas conocidas, siendo una de las familias de angiospermas (plantas con flores) más grandes junto con las *Orchidaceae*, extendiéndose por todo el planeta (llegándose a encontrar especímenes fósiles pertenecientes a esta familia incluso en el continente Antártico). Es dentro de esta familia que podemos encontrar el género *Tagete*, compuesto por plantas mayoritariamente herbáceas con coloridas inflorescencias de aspecto pomposo conocidas comúnmente como caléndulas. El género *Tagete* es nativo del continente americano, apareciendo naturalmente desde el suroeste de Estados Unidos hasta Sudamérica (Barreda, y otros 2015) (Schiavinato, Gutiérrez y Bartoli 2017). La planta de *Tagete patula* (*T. patula*) consiste en una hierba anual y presenta tallos ligeramente frondosos de color verde pálido. Éstos llegan a medir entre 30-90 cm, con hojas verdes de disposición opuesta, de tipo compuesta imparipinada, forma oblonga, margen dentado y una longitud de ~5 cm. La especie posee flores vistosas de color amarillo, anaranjado, una mezcla de ambos colores o doradas (Gilman 2014).



Figura 1.- Flor de *Tagete patula* (Fir0002 2005)

A través de la historia la *T. patula* se ha utilizado de manera ritual, como colorante natural y en medicina tradicional (tanto las hojas como la flor entera y decoctos e infusiones de estos) en varias culturas alrededor del mundo. Se ha reportado en estudios *in vitro* que los extractos de esta planta presentan actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, analgésica, antihipertensiva, acaricida, insecticida y nematicida (Politi, Queiroz-Fernandes, y otros 2016, Politi, Figueira, y otros 2012, Romagnoli, y otros 2005, Hassanpouraghdam, y otros 2011, Marotti, y otros 2010). Sus principales metabolitos secundarios son tiofenos, terpenos, glucósidos (flavonoides y antocianinas), benzofuranos, y carotenoides. En esta última categoría podemos encontrar la LUT, una molécula de interés para la prevención de la DMO. (Riaz, y otros 2020).

1.3.- Luteína (LUT)

LUT es un antioxidante carotenoide sintetizado exclusivamente en las plantas. Se puede encontrar en altas concentraciones en vegetales verdes como la espinaca, lechuga, y en los pétalos de flores del género *Tropaeolum* y *Tagete*. Debido a su estructura, LUT es un compuesto cuya estabilidad se ve afectada de manera significativa por numerosos factores, por ejemplo: almacenamiento prolongado, altas temperaturas, presencia de luz y pH ácido, entre otros (Shi y Chen 1997).

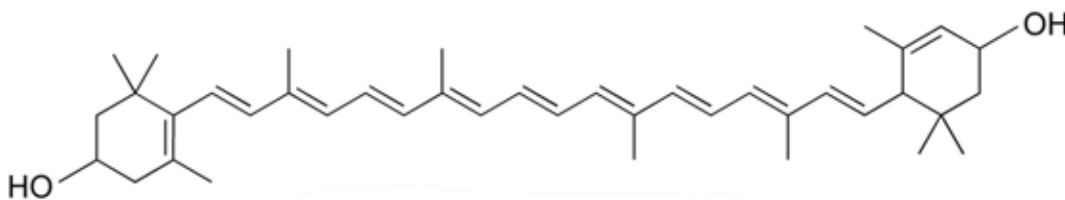


Figura 2.- Estructura química de la LUT

En el 2001 se publicó el “*Age-Related Eye Disease Study*” (AREDS), un estudio diseñado para probar si la administración de un suplemento oral de vitamina C (500 mg), vitamina E (400UI), betacaroteno (15 mg), cobre (2 mg) y zinc (80 mg) podría reducir el riesgo de progresión a DMO tardía. Los resultados de este estudio demostraron una reducción del riesgo de un 25% en un tiempo de 5 años. Posteriormente en el año 2012 se publicó el “*Age-Related Disease Study 2*” (AREDS2), cuyo objetivo era evaluar si la inclusión de LUT y ZEA a la fórmula AREDS original podría lograr una disminución aun mayor en el riesgo de progresión a DMO tardía. En un análisis secundario del estudio, se encontró que la inclusión de LUT/ZEA *versus* betacaroteno disminuía el riesgo de padecer DMO tardía, DMO neovascular y de atrofia central de la mácula. (Chew, y otros 2014).

Es interesante destacar que varios autores proponen que la presencia de LUT en la retina brinda, a dicha estructura y a la mácula, protección contra la degradación proteica y lipídica mediada por estrés oxidativo (Bodoki, y otros 2019). También se ha observado en varios estudios que para moléculas del tipo xantófilas, las formulaciones de núcleo oleoso tipo O/W pueden proveer protección contra la fotodegradación, sobre todo cuando se co-formula con α -tocoferol (Alarcón-Alarcón, y otros 2018, Liu, y otros 2016, Zhang, y otros 2016, Gomes, y otros 2019).

1.4.- Nanoformulaciones O/W

Las nanoformulaciones O/W son sistemas coloidales bifásicos del tipo líquido/líquido. Estos sistemas están compuestos por una fase hidrofílica externa (también denominada fase continua), una fase lipofílica interna (también denominada fase discontinua) y ambas estabilizadas mediante un agente tensioactivo. Es importante destacar que dichas nanoformulaciones pueden ser recubiertas con polímeros que le otorguen características deseables a la formulación, tales como: estabilidad, mucoadhesividad (e interacción con dianas específicas) y control de la liberación (Joye, Davidov-Pardo y McClements 2014).

La razón de la utilización de las nanoemulsiones O/W viene dada, principalmente, por el tamaño reducido de los vehículos, lo cual le permite atravesar mejor las barreras fisiológicas. Además, la alta superficie de contacto y la protección intrínseca al activo (está incluido en la fase interna del vehículo), son aspectos que le otorgan gran potencial a estas formulaciones en comparación con otras (Wilczewska, y otros 2012).

Es interesante destacar que la inclusión de moléculas del tipo xantófilas (similares a LUT) en nanoemulsiones O/W ha demostrado reducir significativamente la degradación de estos compuestos cuando son expuestos a radiación UV (Alarcón-Alarcón, y otros 2018). En este mismo sentido, nuestro grupo de investigación ha desarrollado y validado tecnologías para vehicular curcumina y astaxantina, mediante su inclusión en nanoemulsiones y nanocápsulas desarrolladas por el método de desplazamiento del disolvente. Entre los resultados obtenidos podemos destacar: aumento de la estabilidad, aumento en la absorción y, finalmente, la posibilidad de administrar

directamente estas formulaciones en el medio biológico acuoso (vía oral y tópica) (Alarcón-Alarcón, y otros 2018, Guerrero, y otros 2018).

Un interesante estudio llevado a cabo en 2018 demostró la eficacia terapéutica de LUT nanovehiculizada en un sistema O/W. Dicha formulación fue administrada de manera tópica ocular y por sonda oral, buscando evaluar la progresión de ceguera, en un modelo de ratón con catarata oxidativa inducida. Como conclusión del estudio, se evidenció que la aplicación tópica ocular de LUT nanovehiculizada demostró ser efectiva para el tratamiento de cataratas, no así la administración oral del compuesto. (Bodoki, y otros 2019). En otro estudio realizado en 2009, se observó que la administración de una nanoemulsión O/W conteniendo LUT (disuelta en jugo de naranja) administrada de manera oral junto con las comidas, logró un aumento de un 37% en las concentraciones séricas en comparación con la administración en comprimidos recubiertos (Vishwanathan, Wilson y Nicolosi 2009).

1.5.- Polvos secos como forma farmacéutica

Los polvos secos representan una gran alternativa tecnológica para varias formulaciones. Por ejemplo, la transformación a polvo seco de ingredientes líquidos facilita el almacenamiento y transporte de una formulación, “ya que son más estables y livianos”. Además, al no contener agua, son “más resistentes frente a la contaminación por microorganismos (bacterias y hongos)” (Esener, y otros 1981). En la literatura se describen variados métodos para desarrollar nanoestructuras que contemplan un proceso de secado, tales como *spray-drying* (secado por atomización), liofilización y recubrimiento en lecho fluido, entre otras. De estas metodologías, podemos destacar que *spray-drying* es, además, altamente escalable y donde el producto se obtiene de manera sencilla. Es

importante destacar que, al exponer la molécula activa durante muy poco tiempo a la temperatura del secado por *spray-drying*, la tecnología se hace viable para encapsular moléculas termosensibles.

Los sistemas de secado por atomización utilizan 3 operaciones unitarias esenciales (ver figura 3):

- 1) Atomización.
- 2) Secado de gotas.
- 3) Recolección de las partículas secas.

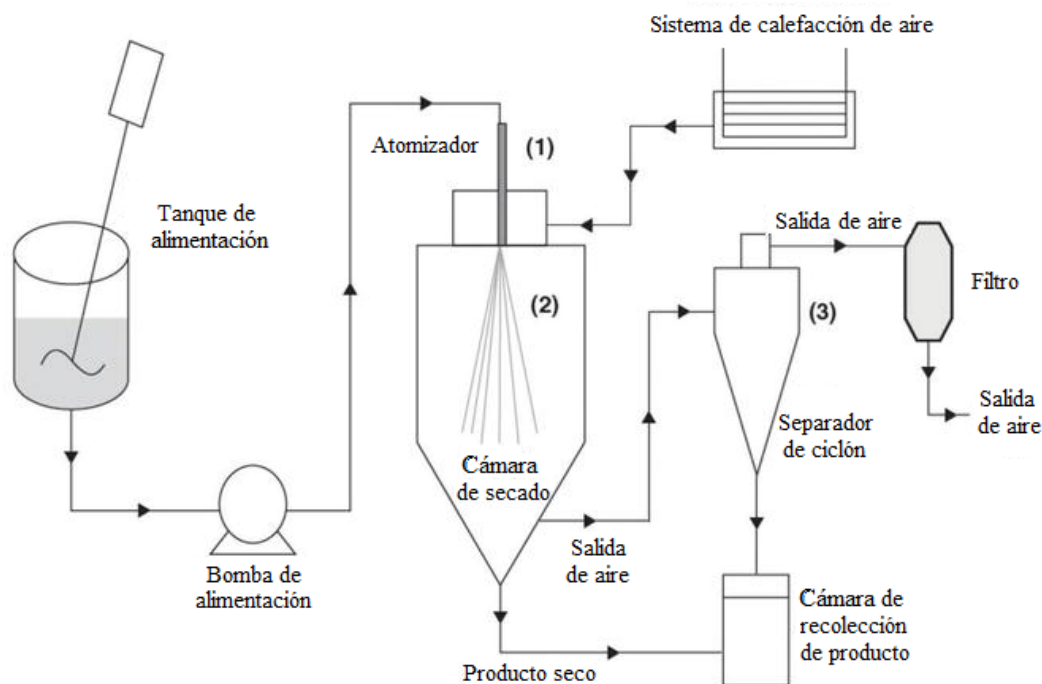


Figura 3.- Diagrama esquemático de una operación de secado por aspersión.

En un interesante estudio de 2018, Álvarez-Henao y su equipo fabricaron micropolvos por *spray drying* de microemulsiones recubiertas con mezclas de polisacáridos utilizando distintas concentraciones de 3 componentes: goma arábica, maltodextrina y almidón modificado. Estos 3 encapsulantes se utilizaron en concentraciones de 0, 33.3, 50 y 100 en %p/p. Los polvos

fabricados por este proceso alcanzaron eficiencias de encapsulación de 91,94% y aumentaron la estabilidad de LUT en almacenamiento a 40°C y 75% de humedad relativa. Al día 20, el extracto sin encapsular registró una degradación de aproximadamente el 90%, mientras que los polvos creados vieron una disminución de 65% aproximadamente respecto a su concentración inicial (Alvarez-Henao, y otros 2018).

1.6.- Polvos secos de tamaño nanométrico

Un nuevo secador por atomización, el Nano *spray-dryer* Büchi B-90[®] de Malvern (Figura 4), utiliza un tipo de atomizador basado en una rejilla con poros micrométricos que vibra verticalmente a frecuencias ultrasónicas, sobre la cual desciende el líquido a atomizar. Estas vibraciones ultrasónicas producen la expulsión del líquido a través de los poros, generando gotas de tamaño micrométrico sin aplicar altas cantidades de energía. Posterior a la generación de las gotas, la cámara de secado del B-90[®] utiliza un flujo de aire caliente laminar, lo que permite un secado uniforme para toda la muestra. Para la etapa final, el B-90[®] cuenta con un recolector de partículas electrostático que consiste en un ánodo de descarga con forma de estrella rodeado de un cátodo recolector con forma de cilindro (Heng, y otros 2011, Li, y otros 2010).

A partir del proceso de nano *spray-drying* descrito anteriormente, se pueden obtener nanopolvos al usar mezclas en solución y/o suspensión (como nanoemulsiones). Como se ha mencionado anteriormente, dichas formas coloidales potencialmente aumentan la absorción y biodisponibilidad, que, junto con la capacidad del Büchi B-90[®] de secar por aspersion principios activos sensibles a la temperatura, permitiría ampliar el espectro de terapias administrables, mejorando la aceptabilidad y el potencial comercial. El

desarrollo de nanopolvos también presentaría características tecnológicas deseables, como la fácil reconstitución de las formulaciones, dado por el aumento en la superficie de los nanovehículos que entra en contacto con el solvente. Todo lo anterior, mejoraría la calidad del producto final reconstituido y sería más conveniente para el usuario pues facilitaría la preparación del medicamento o alimento (De Cicco, y otros 2014).

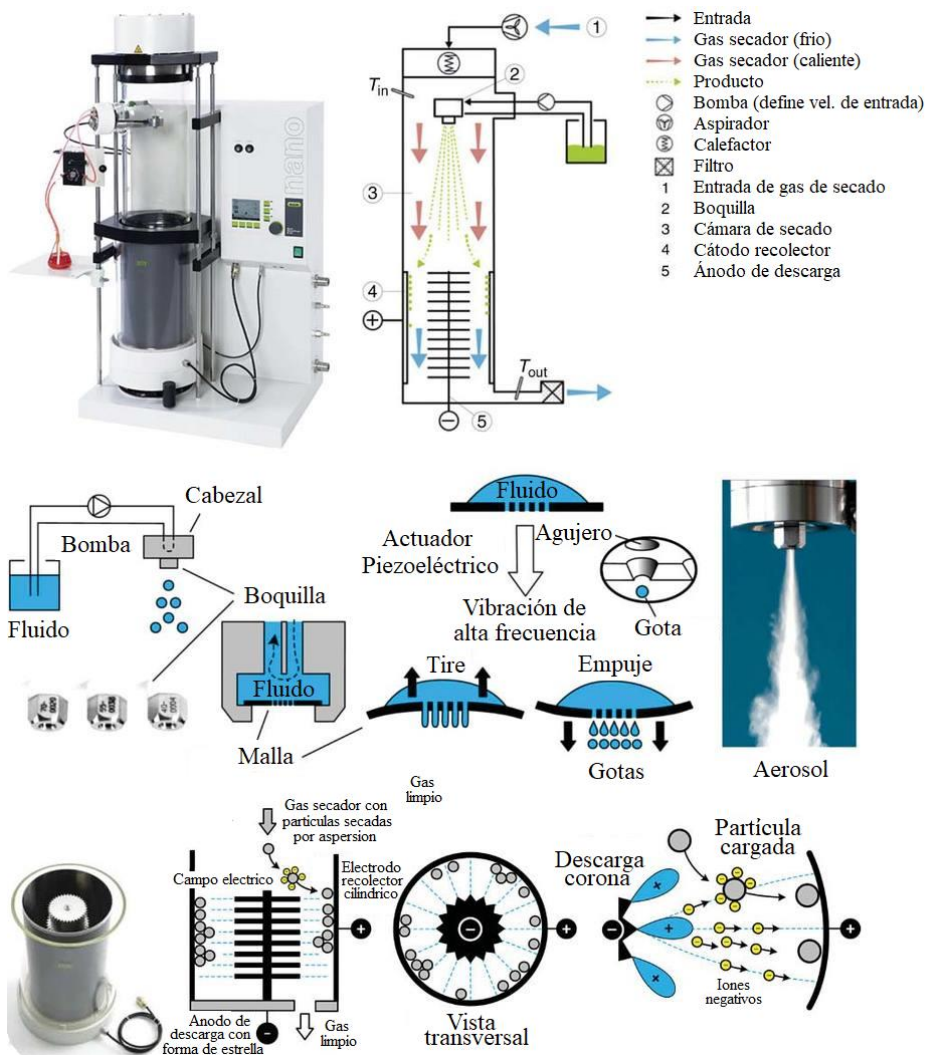


Figura 4.- Nano secador por aspersión B-90® y un diagrama esquemático de su principio funcional.

(Arpagaus, y otros 2017)

En función de todo lo presentado anteriormente, se aprecia una gran oportunidad para desarrollar un nanovehículo en polvo para la administración de LUT para luego probarlo tanto *in vitro* para analizar su absorción, como *in vivo* en modelos animales de DMO.

1.7.- Objetivo General

Considerando la información presentada anteriormente, y la circunstancia excepcional de Pandemia COVID-19, presentamos el siguiente objetivo general para el desarrollo de una tesis de grado.

“Analizar el estado del arte y proponer un nanovehículo adecuado para la administración oral de LUT”.

1.8.- Los objetivos específicos propuestos son:

- 1.-Identificar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la LUT, y su relevancia en el mercado.
- 2.-Explicar el comportamiento de la LUT desde su ingestión hasta su llegada a la retina.
- 3.-Detallar y analizar las distintas técnicas de encapsulación para bioactivos con características similares a LUT, con el fin de escoger un método capaz de vehicularla eficientemente para su administración oral.
- 4.-Diseñar y caracterizar una formulación nanométrica preliminar, a partir de la información recopilada en los objetivos anteriores.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Búsqueda de la información

Se realizó una búsqueda de información sobre el carotenoide LUT y su viabilidad para ser encapsulado. Los ámbitos de investigación fueron: estabilidad de LUT, efectos de LUT sobre la salud, mecanismo de absorción/transporte de LUT, significancia de LUT en el mercado internacional y métodos de encapsulación utilizados previamente. La información reunida y analizada se extrajo usando como base de datos: ScienceDirect, Wiley, NCBI, Annual Reviews, Oxford, Springer, T&F Online, NanoBE.org, PNAS y Magnolia Press. Las palabras claves utilizadas fueron: *lutein, xanthophylls, carotenoid, lutein stability, AMD, nanocarrier, encapsulation, spray-drying y market assessment.*

Como criterio de exclusión se descartó material bibliográfico que haya sido publicado hace más de 20 años, con la excepción de tres trabajos debido a la importancia de la información. La búsqueda bibliográfica se realizó entre enero del 2022 y junio del 2022.

2.2.- Materiales

Mezcla de surfactantes basados en lecitina (Epikuron[®] 145 V, Cargill, USA), mezcla de triglicéridos cáprico-caprílico (Mygliol[®] 812, IOI Oleochemical, Alemania), ácido esteárico, ácido oleico, polímero de metacrilato modificado Eudragit[®] L 55-100 (Evonik Industries, Alemania), hidróxido de sodio 0.12M, ácido acético 0.1%p/v, etanol absoluto (PanReac, España), acetona (PanReac, España) y agua Mili-Q (Simplicity SIMS 00001[®], Millipore, Francia).

Para el recubrimiento primario de las nanocápsulas se utilizó quitosano de bajo peso molecular, el cual se obtuvo hidrolizando parcialmente quitosano de peso molecular intermedio (Sigma Aldrich, USA). La hidrólisis parcial de quitosano se realizó a través del protocolo descrito por Muzzarelli (Muzzarelli 1977).

2.3.- Instrumentos y equipos

Para la obtención del agua miliQ se utilizó el equipo Simplicity SIMS 00001[®] (Millipore, Francia); para el secado de los pétalos de *T. patula* se utilizó una estufa de aire forzado BE 500[®] (Memmert, Alemania). La agitación magnética se hizo con un agitador MS-M-S10[®] (DLAB, China) y con un C-MAG HS 7[®] (IKA Works, Alemania); para la centrifugación del quitosano se utilizó la centrifuga Z 326 K[®] (Hermle Labortechnik, Alemania). La liofilización del quitosano se realizó en un liofilizador Alpha Plus 1-2 LD[®] (Martin Christ, Alemania). La evaporación de solventes se realizó en un *Vacuum Evaporator* R210 (Büchi, Suiza). La caracterización fisicoquímica de las nanopartículas obtenidas se hizo en un Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern, UK). El secado de las nanoemulsiones se realizó en un Nano *Spray-dryer* B-90[®] (Büchi, Suiza).

2.4.- Métodos

2.4.1.- Hidrólisis de quitosano

Se preparó una solución de quitosano 20 mg/L en ácido acético al 6 %v/v (solubilizando 1 g de quitosano de peso molecular medio en 50 mL de ácido acético al 6 %v/v con la asistencia de agitación magnética). Se agregó gota a gota una solución de 0.015 g de NaNO₂ solubilizado en 2.5 mL de agua miliQ.

La proporción quitosano/ NaNO_2 se mantuvo constante. Se agregó 25 mL de agua miliQ para bajar la viscosidad del medio y se dejó en agitación magnética por 10 minutos. Se ajustó el pH con NaOH 5M hasta llegar a pH 7. La mezcla resultante se mantuvo en suspensión por la noche a 4°C. Se separó el quitosano por centrifugación y se lavó 4 veces con agua milliQ para retirar impurezas solubles. Se almacenó el quitosano resultante a -20°C por 24 h en un recipiente cilíndrico. Posteriormente se llevó al liofilizador y se realizó la sublimación del agua a 0.02 mbar por 24 h (temperatura de condensador de -54°C)

2.4.2- Preparación de la nanoformulación O/W recubiertas con quitosano por medio de emulsificación espontánea

Se prepararon nanoemulsiones siguiendo un procedimiento similar al descrito en trabajos publicados por nuestro grupo de investigación con algunas modificaciones (Alarcón-Alarcón, y otros 2018, Oyarzun-Ampuero, y otros 2013, Orellana, y otros 2015). Se formó una fase orgánica en un tubo de ensayo disolviendo 30 mg de Epikuron® 145 V en 1 mL de etanol absoluto, agregando posteriormente 125 µL de Mygliol® 812, y mezclando con un agitador de *vortex* la solución resultante con 9 mL de acetona. Por otro lado, se formó una fase acuosa disolviendo 10 mg de quitosano hidrolizado en 2 mL de ácido acético 0.1 % p/v y llevando a 20 mL con agua miliQ. La fase orgánica fue rápidamente vertida sobre un frasco de 50 mL que contenía 20 mL de la fase acuosa, y se mantuvo bajo agitación vigorosa por 5 minutos usando un agitador magnético. La mezcla fue concentrada a 10 mL en un evaporador rotatorio (60°C, 175 mbar).

2.4.3.- Preparación de nanocápsulas cubiertas en Eudragit® L100-55

Se recubrieron las nanocápsulas de quitosano obtenidas en el punto 2.4.2, incubando 4 mL de éstas con 4 mL de una solución acuosa 0.025 % p/v de Eudragit® L100-55 bajo agitación magnética. La solución acuosa de Eudragit® L100-55 se preparó diluyendo una solución madre al 1% p/v de Eudragit® L100-55, la cual se preparó disolviendo 0.5 g del polímero en 50 mL de NaOH 0.1M bajo agitación vigorosa por 5 minutos, y dejando reposar hasta que la solución se vuelva transparente.

2.4.3.- Preparación de nanopolvos a partir de las nanoemulsiones formadas anteriormente

Para la elaboración de los nanopolvos se utilizó el secador por aspersion nano Büchi B-90®, cuyo funcionamiento fue explicado anteriormente. Se usó la rejilla con tamaño de poro de 5.5 µm, el flujo de aire fue establecido a 110 – 115 L/min y la velocidad de aspersion relativa fue fijada en 100%. La temperatura de entrada y salida de aire fueron de 112°C y 27°C respectivamente. La suspensión de nanocápsulas recubiertas en Eudragit® L100-55 fue atomizada. Las nanocápsulas secas resultantes fueron recolectadas desde el recolector electrostático utilizando un raspador de polvos y fueron almacenadas a 4°C para su análisis posterior.

2.4.4.- Análisis tamaño de partículas, potencial zeta y concentración de las nanoformulaciones obtenidas

Las mediciones de tamaño se llevaron a cabo usando el método de dispersión de luz dinámica, mientras que para el potencial zeta se usó dispersión de luz electroforética. Para ambas mediciones se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern), colocando 0.1 mL de nanoemulsiones diluidas con 0.9 mL de agua miliQ en cubetas reutilizables para mediciones de potencial zeta. Para el análisis de los polvos se suspendieron 15 mg de nanopolvos en 1 mL de ácido acético 0.1 %p/v para observar sus características fisicoquímicas en medio ácido. De esta resuspensión se tomaron 0.1 mL y se llevaron a 1 mL para su análisis.

3.- Resultados y discusión

3.1.- Estudio de mercado

En 2015 el tamaño del mercado de LUT alcanzó los 135 millones de dólares (Global Market Insights Inc. 2021) y se proyecta un crecimiento significativo hacia 2024. Entre los factores que explicarían este incremento de la demanda de LUT se encuentran: i) el envejecimiento de la población, lo que conlleva a un aumento de desórdenes oxidativos a nivel ocular; ii) la falta de una dieta equilibrada debido al estilo de vida cada vez más agitado en los países desarrollados y en vías de desarrollo; y iii) la preocupación cada vez más creciente de segmentos importantes de la población por su salud en general (desde el monitoreo continuo de signos vitales hasta preocupaciones más específicas como las relacionadas con enfermedades oculares y desórdenes

oxidativos). En general, a partir de estos factores, se puede prever un aumento en torno al 6% para el año 2024 del mercado de los nutraceuticos. Los suplementos de LUT representan una parte de este mercado. En Chile podemos encontrar suplementos alimenticios y medicamentos que contienen LUT. En los suplementos podemos encontrar LUT en los productos Vision Tabs de Laboratorios Knop y OcuVite de Bausch & Lomb, como también en numerosos suplementos alimenticios importados de distintos laboratorios (SunVit, Aura Vitalis, Swanson, etc.). En productos clasificados como medicamentos podemos encontrar Icaps[®] con 30 mg LUT/ZEA (Registro ISP F-15739/21) de Novartis y Oftavita[®] con 2 mg de LUT (registro ISP F-21932/20) de Laboratorios Saval. Además de suplementos y medicamentos, podemos encontrar alimentos nutraceuticos tales como jugos, galletas y lácteos a los cuales se les ha adicionado LUT y otros carotenoides.

El mercado de la LUT se encuentra altamente fraccionado, es decir, se presentan un alto número de empresas de las cuales ninguna tiene una participación demasiado importante en el mercado. Las empresas que participan de un mercado fraccionado no pueden aumentar sus utilidades aumentando el volumen de producción, si no que requieren diferenciar sus productos del resto e innovar en sus productos para promover su crecimiento. (Mordor Intelligence 2019)

Respecto a la fuente de origen de LUT, el mercado se encuentra dominado por LUT de origen sintético, ya que su producción incurre en menos costos que la obtención desde especies donde se producen naturalmente. Sin embargo, debido a la creciente preocupación de la población por su salud y por consumir productos de origen natural, la población está prefiriendo ingredientes naturales de alta calidad, lo que podría aumentar el crecimiento del mercado de la LUT

de este origen. Así mismo, las rigurosas normas impuestas por la Unión Europea sobre el uso de ingredientes sintéticos están aumentando la demanda de LUT de origen natural dicho continente. (MarketsandMarkets Analysis 2017)

En este trabajo, comparamos a *grosso modo* los costos de adquirir LUT sintética con los costos de extraerla desde flores de *T. patula* (flores adquiridas a baja escala, en diciembre de 2019, desde un proveedor comercial “Homecenter Sodimac”); no se considera la mano de obra, los costos energéticos o los materiales usados en la extracción del activo. Desde Sigma-Aldrich se pueden conseguir 300 mg de LUT por 760,000 CLP, lo que equivale a 253,333 CLP por cada 100 mg de LUT. En cambio, por 11,800 CLP se obtuvieron 20 flores de *T. patula* de pétalos naranja, las cuales contenían 47.5 g de pétalos, los que redujeron su peso a 6.3 g al ser secados. Se realizó una extracción con acetona de los pigmentos, pero debido a la contingencia por a nivel mundial (COVID19) no se pudo determinar analíticamente la concentración de LUT en el polvo seco de flores. Basándonos en un reciente trabajo realizado en nuestra misma zona geográfica, podemos estimar la concentración de LUT en base seca de pétalos naranjos de *T. patula* (Arellano Corral 2011). Según el trabajo de Arellano Corral, la concentración de LUT en mg LUT/g base seca para flores de pétalo naranja es de 9.98 ± 0.02 mg de LUT por gramo de base seca. Esto nos daría una cantidad estimada aproximada de 63 mg de LUT en los 6.3 g base seca obtenidos.

3.2.- Propiedades fisicoquímicas de la LUT

En estado puro y a temperatura ambiente, el polvo de LUT presenta un aspecto cristalino de color rojo-anaranjado, con una temperatura de fusión de 196°C. En solución concentrada, se presenta como un líquido oscuro y opaco

de color marrón con tonos amarillos. Tiene su máximo de absorción a 445 nm (NCBI 2021).

LUT presenta en su estructura una secuencia conjugada de 10 dobles enlaces (ver figura 2), lo que le confiere propiedades antioxidantes (y consecuentemente, alta inestabilidad medioambiental). Esta estructura conjugada también tiene la capacidad de absorber luz azul y UV, otorgándole su característico color amarillo. Debido a su naturaleza, mayoritariamente hidrocarbonada, es una molécula de carácter lipofílico con un LogP de 7.9, por lo que es insoluble en agua. La estabilidad de LUT en solución se ve afectada, en orden de influencia decreciente, por el pH, la luz y la temperatura. En 1997, Shi y Shen investigaron el efecto de la luz, la presencia de antioxidantes, el pH y la temperatura, sobre la velocidad de degradación de LUT en solución. Los autores disolvieron LUT (5 $\mu\text{g/mL}$) en una solución de metanol con un 5 % v/v de una de las siguientes: (1) ácido ascórbico 2.5 % v/v (AA); (2) ácido ascórbico 2.5 % v/v y KOH 10M (AA+KOH); (3) agua destilada (WR). Las concentraciones fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Se encontró que el pH ácido fue la variable más influyente en la degradación de LUT, ya que en las muestras con AA el compuesto LUT se degradó por completo a los 3 y 7 días, sin y con luz respectivamente. Las muestras WR perdieron un 51% de su concentración a los 75 días sin luz, pero sufrieron una degradación completa a los 45 días en presencia de luz. Finalmente, en presencia de luz, las muestras de AA+KOH presentaron su descomposición total a los 75 días, mientras que solamente un 38% sería degradado en la oscuridad (Figura 4).

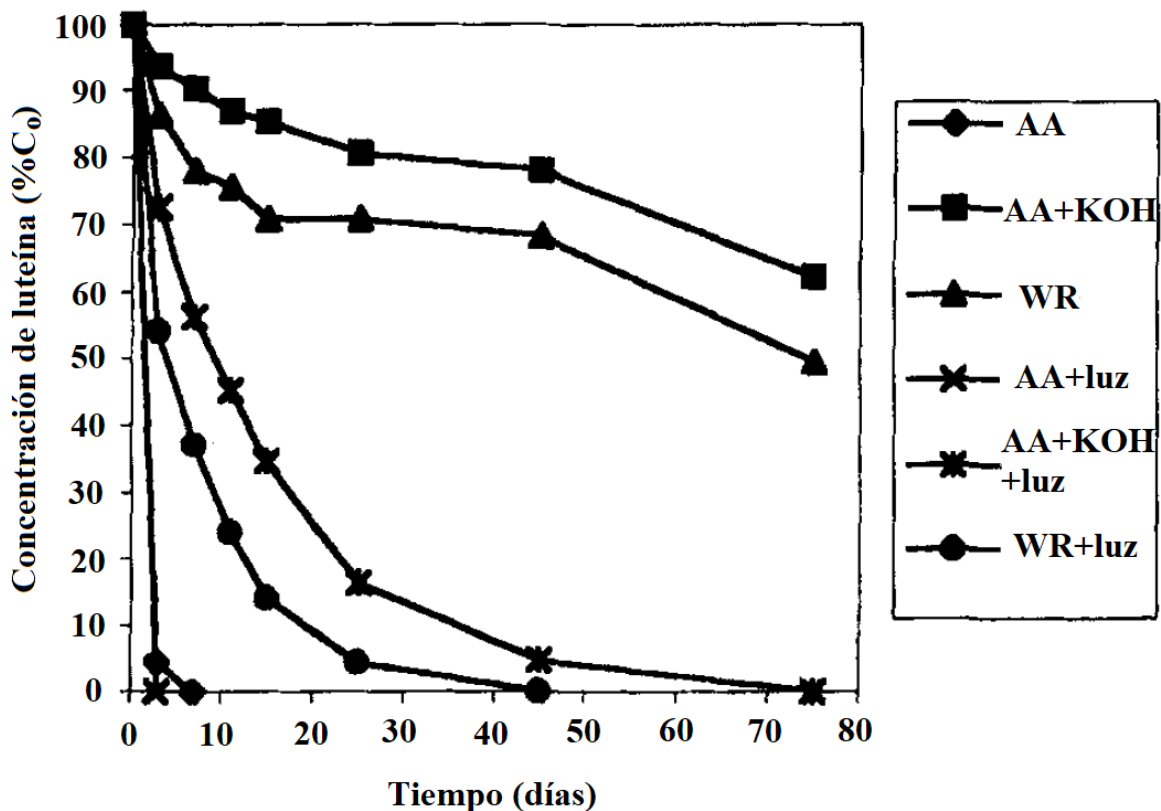


Figura 5.- Estabilidad de LUT bajo distintas condiciones de almacenamiento.
 AA: Acido ascórbico; AA+KOH: Acido ascórbico con hidróxido de potasio; WR: control
 (Shi y Chen 1997)

Es importante destacar que, en el caso de requerir solventes para las formulaciones, estos también deben cumplir con determinados requisitos. Por un lado, se deben cumplir con requisitos técnicos, como solubilidad y estabilidad de LUT en el solvente, además de una temperatura de ebullición adecuada (en caso de que se requiera evaporar para concentrar la formulación). Por otro lado, los solventes deben tener determinados requisitos sanitarios. Dentro de los requisitos sanitarios necesarios, podemos encontrar la aceptabilidad para uso en formulaciones alimentarias.

<i>Solvente</i>	<i>Solubilidad [mg/L]</i>	<i>% abs. Inicial a 10 días a λ_{max}</i>	<i>T° ebullición [°C]</i>
<i>Acetona</i>	800	95	56
<i>Acetonitrilo</i>	100	94	82
<i>Benceno</i>	600	97	80.1
<i>Cloroformo</i>	6000	90	61.2
<i>Ciclohexano</i>	50	99	80.75
<i>Ciclohexanona</i>	4000	37	155.7
<i>Diclorometano</i>	800	83	39.6
<i>Dimetilformamida</i>	1000	97	153
<i>Dimetilsulfóxido</i>	1000	99	189
<i>Etanol</i>	300	91	78.37
<i>Etilacetato</i>	800	96	77.1
<i>Etileter</i>	2000	65	34.6
<i>Hexano</i>	20	98	69
<i>2-propanol</i>	400	95	82.5
<i>Metanol</i>	200	90	64.7
<i>Metil-ter-butil éter</i>	2000	76	55.2
<i>Tetrahidrofurano</i>	8000	99	66
<i>Tolueno</i>	500	97	110.6

Tabla 1. Solubilidad y estabilidad de LUT en solventes orgánicos y sus respectivos puntos de ebullición.

En un interesante estudio, Craft y Soares determinaron la estabilidad, solubilidad, y la absortividad de LUT en 18 solventes orgánicos (Tabla 1). Los solventes más prometedores de esta lista, según los criterios anteriormente expuestos, son acetona, etanol y tetrahidrofurano. De estos 3 solventes, el uso de tetrahidrofurano no es aceptado en alimentos por la FDA, en el caso de la acetona se permiten máximo 30 ppm como solvente residual en extracciones. Por otro lado, el uso de etanol es generalmente determinado como seguro (Center for Food Safety and Applied Nutrition 2021). De los otros dos

disolventes, se preferiría acetona ya que muestra una mayor solubilidad del LUT, presenta una menor tasa de degradación del LUT en solución y posee un punto de ebullición más bajo (en comparación con el etanol), lo que lo convierte en un mejor candidato para el proceso de elaboración de formulaciones coloidales.

3.3.- Bioactividad, absorción y metabolismo de LUT

LUT ha demostrado tener capacidad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo capaz de neutralizar radicales libres superóxidos (IC₅₀: 21 µg/mL), radicales de óxido nítrico (IC₅₀: 3.8 µg/mL) y radicales hidroxilo (IC₅₀: 1.75 µg/mL). La capacidad antioxidante de LUT es superior cuando se le compara con otros antioxidantes como la vitamina C. Además de su actividad antioxidante en la mácula, el consumo de LUT mejora la capacidad antioxidante del organismo, disminuyendo la presencia de radicales libres en el torrente sanguíneo que eventualmente podrían causar daño en la mácula y otros órganos/tejidos de interés. A modo de ejemplo, en muestras de hígado provenientes de ratones a los cuales se les administró LUT (100 mg/kg y 250 mg/kg), se encontró un efecto dosis-dependiente en la expresión de enzimas antioxidantes sanguíneas y hepáticas (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa en sangre; y catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa en el hígado) (Sindhu, Korengath y Kuttan 2010).

En la dieta, LUT, al igual que otras xantófilas, se encuentra tanto de forma no esterificada como en monoésteres y diésteres de ácidos grasos. En el lumen intestinal (principal lugar de absorción de estas moléculas), LUT en cualquiera de sus formas de éster, es hidrolizada y posteriormente absorbida, como se

observó en experimentos en líneas celulares Caco-2 (Chitchumroonchokchai y Failla 2006). Una vez hidrolizadas, las moléculas derivadas de xantófilas son absorbidas en el intestino mediante transporte facilitado por receptores *scavenger*, que corresponden a proteínas insertas en la membrana plasmática, y se unen a ligandos específicos sin desatar una cascada de señalización celular. En este caso, se une a xantófilas para posteriormente propiciar su introducción al medio intracelular del epitelio pigmentario de la retina (RPE). En el citoplasma de los enterocitos, tanto las xantófilas como otros carotenoides son incorporados a quilomicrones y posteriormente pasan a la circulación sistémica al interior de lipoproteínas. A pesar de ser transportados en estas partículas lipoproteicas junto con los principales lípidos dietéticos, sus concentraciones son marcadamente bajas, alcanzando una relación de una molécula por partícula en LDL por 0.05 moléculas por partícula en HDL (es decir, 1 molécula por cada 20 partículas).

A través de la circulación sistémica, los carotenoides incluidos en partículas lipoproteicas llegan a la coroides del globo ocular donde deben atravesar el RPE para finalmente ser incorporados en la retina (Mercadante, y otros 2017, Harrison 2019).

El RPE para la retina es análogo a la barrera hematoencefálica para el sistema nervioso central; el RPE sirve de interfaz metabólica/celular entre la retina y el torrente sanguíneo desde y hacia la coroides. En el lado basolateral de las células del RPE, se expresan receptores LDLR y SRB1, que reconocen e ingresan a la célula partículas de LDL y HDL, respectivamente. Una vez dentro del RPE, LUT es parcialmente convertida a mesoZEA por la isomerohidrolasa RPE65.

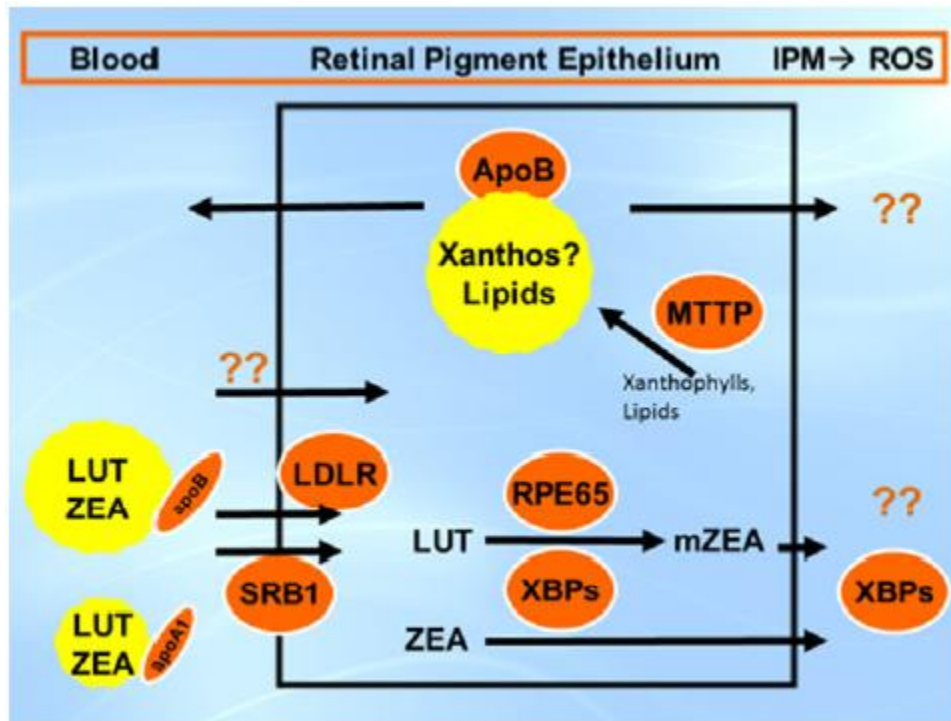


Figura 6.- Posibles mecanismos para la entrada y metabolismo de xantofilas desde la sangre hacia el RPE.

LUT: luteína; ZEA: Zeaxantina; LDLR: Receptor de LDL; SRB1: Receptor scavenger B1; RPE65: Isomerohidrolasa retinoide; MTTP: Proteína de transporte de triglicéridos microsomales; XBP: Proteínas ligadoras de xantofilas; mZEA: mesozeaxantina; apoB: Apolipoproteína B; apoA1: Apolipoproteína A1.

(Harrison 2019)

Dentro de las células del RPE, las xantófilas son asociadas a proteínas ligadoras de xantófilas (XBP), las cuales han sido propuestas como las principales involucradas en su metabolismo y tráfico celular entre el RPE y la retina (Li, Vachali y Bernstein 2010). En la figura 5 se muestra una propuesta de como LUT y ZEA atraviesan el RPE, y de las proteínas involucradas en cada proceso.

3.4.- Encapsulación de LUT

La encapsulación es una técnica en la cual un material activo, o una mezcla de ellos, son cubiertos o atrapados dentro de otro material o sistema. Al componente encapsulado se le denomina núcleo, y al componente que lo envuelve, se le denomina muralla, vehículo o encapsulante (Madene, y otros 2006).

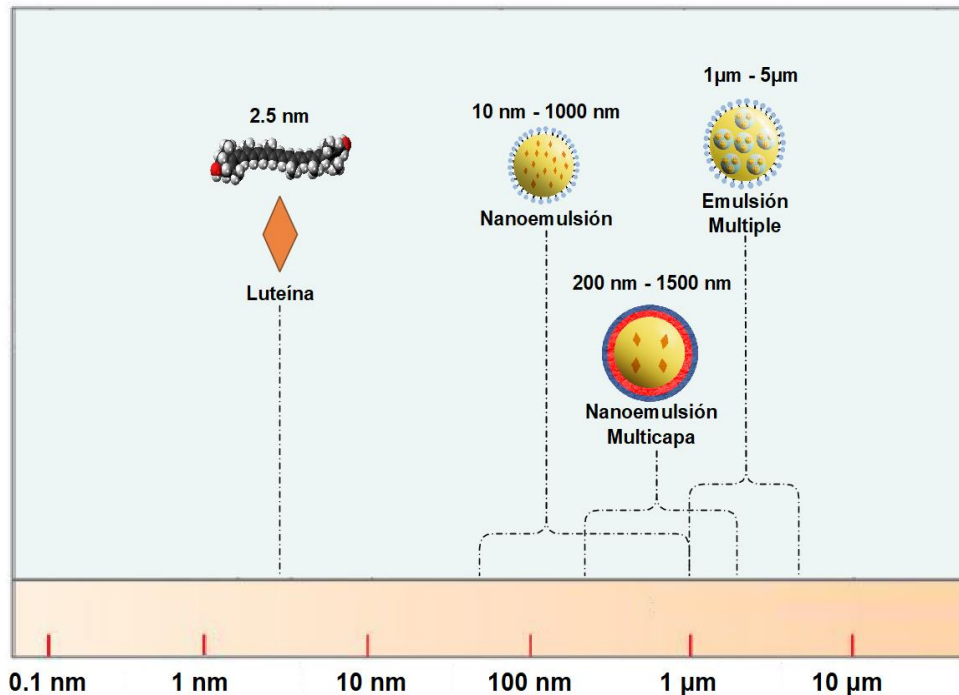


Figura 7.- Escala de tamaño de las partículas estudiadas.

El sistema resultante consiste en una suspensión de partículas micrométricas y submicrométricas que pueden contener el activo encapsulado tanto dentro del núcleo, como en la muralla. En la figura 6 se muestra una variedad de sistemas de encapsulación que pueden ser usados para transportar una molécula altamente hidrofóbica como LUT. Es de suma importancia, a la hora de elegir un proceso de encapsulación para un activo nutracéutico, tomar en cuenta las diversas condiciones que este vehículo se encontrará en su paso por la ruta biológica seleccionada. En el caso del tracto gastrointestinal, en la boca el

sistema de encapsulación es disuelto/disperso y expuesto a las secreciones salivales, conteniendo mucina, sales y amilasa, lo cual podría causar agregación, precipitación o hidrólisis de sistemas basados en almidón y/o sus derivados. En el estómago, la formulación es expuesta a los fluidos gástricos altamente ácidos, junto con proteasas y lipasas. Este ambiente impacta significativamente a los sistemas de encapsulación proteicos debido al ambiente drástico y a la actividad hidrolítica de la pepsina. En el intestino delgado, el sistema es diluido/disperso con fluidos intestinales que contienen *buffers* de pH, enzimas digestivas y sales biliares. Aquellos sistemas compuestos de proteínas o lípidos se verán impactados por la acción hidrolítica de la tripsina y las lipasas presentes. En esta etapa, idealmente LUT podría ser absorbida dentro de la formulación, y/o ser liberada desde ésta y solubilizada en micelas, las que pueden ser absorbidas por el epitelio intestinal (Steiner, McClements y Davidov-Pardo 2018).

Los criterios de elección para la estrategia de encapsulación de LUT deberían considerar críticamente: 1) estabilidad de la formulación y el principio activo, 2) promover un incremento de la biodisponibilidad, 3) costos de los reactivos/excipientes en armonía con los de la industria, y 4) el potencial de escalamiento de la técnica a utilizar, entre otros.

3.4.1.- Emulsiones múltiples

Las emulsiones múltiples corresponden a sistemas complejos en los cuales coexisten emulsiones O/W con W/O. Las emulsiones múltiples son “emulsiones de emulsiones”, en las cuales los glóbulos de la capa dispersa contienen en sí mismos, de manera dispersa, otros glóbulos aún más pequeños. Debido a que poseen fases internas con distintas polaridad, las emulsiones

múltiples son capaces de encapsular compuestos hidrofílicos y lipofílicos en una misma formulación.

Entre las emulsiones de tipo agua-aceite-agua (W/O/W) y aceite-agua-aceite (O/W/O), las primeras tienen un rango de aplicaciones más amplio debido a que se pueden dispersar/mezclar/formular directamente en medios con alto contenido acuoso, y por lo tanto han sido estudiadas en más detalle. Además, a diferencia de las emulsiones W/O y las O/W/O, las emulsiones W/O/W tienen una baja viscosidad debido a su fase acuosa externa, lo que resulta en un manejo más simple de los sistemas, especialmente para posibles administraciones parenterales. Estos sistemas son vehículos bastante versátiles, mostrando tener aplicaciones para la entrega de principios activos de manera controlada o sostenida, entrega dirigida y/o como enmascarante de sabores. También se ha observado que la inclusión de bioactivos en emulsiones múltiples mejora su biodisponibilidad (Yaqoob Khan, y otros 2006).

Al momento de analizar el estado del arte para la presente tesis, no se pudo encontrar trabajos en los cuales se encapsule solamente LUT en emulsiones múltiples. Sin embargo, estos sistemas se han utilizado para encapsular otros carotenoides, mezclas de estos, o extractos ricos en carotenoides que contienen LUT, por lo que su utilización con dicho fin sería viable.

Rodríguez-Huezo et al. (2006) secaron por aspersion una mezcla de carotenoides obtenidos desde *C. annuum* y *T. erecta* contenidos en emulsiones múltiples W/O/W, obteniendo una dispersión de microcápsulas esféricas. El polvo seco resultante alcanzó eficiencias de encapsulación de 87.5% y fue capaz de reducir la degradación de los carotenoides en almacenamiento, incluso cuando las partículas eran rehumectadas. (Rodríguez-Huezo, y otros 2006).

Las potenciales ventajas de las emulsiones múltiples incluyen un aumento en la estabilidad de los activos encapsulados, la capacidad de encapsular tanto activos lipofílicos como hidrofílicos y la posibilidad de utilizar polímeros encapsulantes funcionales. Entre las desventajas, destacan la alta complejidad en su preparación, alto índice de polidispersión resultante y, para esta propuesta en particular, que se desconoce su potencial real con LUT.

3.4.2.- Nano y microcápsulas multicapa

Las emulsiones multicapa son sistemas O/W derivados de emulsiones en distinta escala de tamaño y que presentan un recubrimiento en su interfaz; este recubrimiento puede constar de una, dos o más capas de polímeros. La formación de estos sistemas se basa, generalmente, en la técnica de deposición electrostática *Layer-by-Layer* (capa por capa), la cual utiliza la atracción electrostática de surfactantes y biopolímeros con carga opuesta para formar una cubierta en la cara externa de la interfaz de los aceites emulsionados (Bortnowska 2015). Revestir emulsiones de LUT con una cubierta polimérica mejoraría la estabilidad en almacenamiento de la emulsión y protegería a LUT en su interior de la degradación por metales. En un estudio por Xu y su equipo (2016), se utilizaron emulsiones hechas a partir de triglicéridos de cadena media (MCT) estabilizadas con aislado de proteína de suero de leche y goma de linaza, las que fueron recubiertas con quitosano por deposición electrostática. Las emulsiones resultantes presentaron un tamaño de partícula promedio de 948.2 nm. En presencia de metales oxidantes, la capa exterior de quitosano disminuye la degradación de LUT en un 51%. Para analizar su estabilidad física de los sistemas frente a la sedimentación, los autores centrifugaron alícuotas de las formulaciones a 3000 rpm y 25°C. Las emulsiones recubiertas con quitosano

vieron aumentada su estabilidad en un 56% en comparación a su forma precursora no recubierta (Xu, y otros 2016).

En 2018, nuestro equipo desarrolló nanoemulsiones de astaxantina (carotenoide similar a LUT) recubiertas, a partir de MCT, lecitina de soya alta en fosfatidilcolina y utilizando quitosano, carragenina y alginato de calcio como encapsulantes, para evaluar su potencial atractivo como alimento y su posible toxicidad *in vivo*. La metodología de elaboración consistió en desarrollar las nanoemulsiones mediante desplazamiento de solvente, el recubrimiento fue por deposición electrostática del/los polímeros. Contrariamente a lo esperado, la adición de quitosano a la formulación disminuyó la estabilidad del activo cuando fue expuesto a la luz; los autores explican que dicho fenómeno se debe a que este polímero presenta grupos amino libres los cuales son fotoreactivos, formando radicales oxidativos al ser irradiados. Por otro lado, la adición de carragenina si tuvo efectos benéficos y permitió disminuir la velocidad de degradación de astaxantina, posiblemente por las interacciones iónicas entre los polímeros, lo que limitaría la reactividad de los grupos amino libres del quitosano (Alarcón-Alarcón, y otros 2018). En términos de seguridad y apetencia para peces, los autores administraron dichas formulaciones a especies de *D. rerio* y *E. maclovinus* durante 20 días como alimento, transcurso en el cual no ocurrió la muerte de ninguno de los animales examinados.

Las ventajas de las emulsiones multicapa son un aumento de la estabilidad tanto de la formulación como del activo encapsulado, la amplia gama de polímeros funcionales disponibles, la facilidad de la preparación de las formulaciones y el alto potencial de escalamiento del método *layer-by-layer*. Entre sus desventajas encontramos la susceptibilidad a agregación de la fase interna cuando se utilizan

grandes cantidades de lípidos y la limitada cantidad de polímeros catiónicos de grado alimentario disponibles en el mercado.

3.4.3.- Emulsiones secadas por aspersión

Para atomizar una sustancia, es vital que esta se encuentre de forma líquida, idealmente en medio acuoso. Para moléculas de tipo lipofílica, como LUT, se debe incluir en un sistema de fase externa/continua acuosa. Una alternativa para esto es desarrollar previamente una emulsión O/W que contenga LUT en su fase interna/núcleo.

Wang et al. crearon nanopolvos a partir de emulsiones micronizadas recubiertas con inulina y almidón modificado usando un secador por aspersión Büchi B-290, obteniendo diferentes tamaños de partícula (desde 238.2 nm hasta 2.2 μm). Los autores observaron que las formulaciones con tamaños de partícula menor a 450 nm llegaron a tener una dispersión aparente y una velocidad de reconstitución casi 10 veces mayor con respecto a las partículas de tamaños mayores, lo que se podría atribuir a la mayor superficie de contacto de las partículas más pequeñas. En la actualidad existen secadores por aspersión que permiten obtener polvos de tamaño nanométrico con una menor dispersión en el tamaño de partícula del polvo producido.

En términos de la presente propuesta, los resultados de Wang et al. nos permitirían proyectar formulaciones de suplementos con LUT en polvo oral para reconstitución. Es importante destacar que el tamaño de la partícula en los polvos obtenidos por secado tiene un efecto importante, ya que una disminución de éste resultaría en una mejora en la bioaccesibilidad de LUT.

Las ventajas de las emulsiones secadas por aspersión son el alto potencial de escalamiento y automatización del método de secado, el bajo índice de polidispersión del producto final, y una mejora global en la estabilidad del activo. Sus desventajas consisten en la necesidad previa de desarrollar las nanoemulsiones, la baja eficiencia térmica del proceso y el costo (adquisición e instalación) de la maquinaria necesaria para la operación.

3.5.- Propuesta para el diseño de una formulación que contenga LUT y caracterización preliminar.

Debido a los beneficios mencionados anteriormente, y donde destacamos un menor tamaño, alto potencial para mejorar la biodisponibilidad y gran viabilidad industrial, la formulación escogida para una aproximación práctica fue proponer una “nanoemulsión multicapa secada por aspersión”. Es importante destacar, además, que nuestro grupo de investigación tiene amplia experiencia en la elaboración de nanoemulsiones similares a escala piloto (Cerdeira-Opazo, y otros 2021, Orellana, y otros 2015), y donde también hemos probado distintas modificaciones mediante la adición de polímeros iónicos en la superficie (Alarcón-Alarcón, y otros 2018, Guerrero, y otros 2018, Oyarzun-Ampuero, y otros 2013). Para este caso particular, los polímeros seleccionados son quitosano “por su bajo costo y propiedades mucoadhesivas” y Eudragit® L100-55 por “dotar a las nanoformulaciones de protección contra el entorno altamente ácido del estómago” (Jelvehgari, y otros 2010, Tawfeek, y otros 2017).

La mayoría de los componentes lipídicos para elaborar las nanoemulsiones ya han sido validados para estas formulaciones y consisten en Epikuron 145 V (30

mg) de disueltos en etanol (1 mL), aceite (125 μ L) y acetona (9 mL). Con el fin de evaluar distintos aceites para nuestra propuesta, proponemos:

- 1) Mygliol 812
- 2) Ácido Oleico
- 3) Ácido esteárico

De acuerdo con la metodología descrita por nuestro grupo, preparamos nanoemulsiones aniónicas a escala de laboratorio, por el método de desplazamiento de solvente, vertiendo rápidamente cada una de las fases orgánicas en agua milliQ bajo agitación vigorosa durante 5 minutos. La formación de una mezcla blanquecina opalescente y poco viscosa sería indicativo de la obtención de estructuras coloidales. Posteriormente se procedió a la extracción de los solventes orgánicos y a la concentración de la formulación mediante rotoevaporación. La caracterización de las formulaciones reflejó diámetros hidrodinámicos en el rango de 140-200 nm, con un PDI de entre 0.153 y 0.200, y presentando un potencial zeta negativo de entre los -61.5 y -70.9 mV (n=3). Estos valores están en concordancia con otras formulaciones similares desarrolladas por nuestro grupo y otros grupos (Alarcón-Alarcón, y otros 2018, Guerrero, y otros 2018)

Los resultados de las fórmulas evaluadas fueron los siguientes:

<i>Materia grasa</i>	<i>Diámetro hidrodinámico (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Potencial zeta (mV)</i>
<i>Mygliol 812[®]</i>	199.5	0.153	-65.8
<i>Ác. oleico</i>	150.4	0.187	-70.9
<i>Ác. esteárico</i>	pp.	-	-

Tabla 2.- Caracterización fisicoquímica de las emulsiones ensayadas.

De las formulaciones que permitieron obtener nanoemulsiones, solo la que contiene Mygliol 812[®] (cuyo componente oleoso es exclusivamente de triglicéridos) fue capaz de mantenerse estable en el tiempo, las demás mostraron *creaming* a los 3 días de almacenarse a 4°C, esto puede deberse a una posible incompatibilidad entre el surfactante y las materias grasas de carácter ácido graso libre. Desde aquí en adelante se utilizará el componente oleoso Mygliol 812[®] para la fase orgánica de las nanoemulsiones.

Posterior a la obtención de las nanoemulsiones, nos enfocamos en la etapa del recubrimiento con los polímeros. En el caso del polímero quitosano, el polimerización puede incluirse en una o dos etapas, ya sea incubando las nanoemulsiones formadas en una solución de quitosano, o bien, incluyendo el quitosano en la fase acuosa previo a la extracción del solvente (Alarcón-Alarcón, y otros 2018). En este caso, elaboraremos las nanocápsulas en una sola etapa pues valoramos en gran medida la rapidez del proceso y la menor cantidad de pasos, lo que incidiría en el potencial escalamiento a nivel industrial. Luego generar el recubrimiento con quitosano, el diámetro promedio de las partículas resultó en 192.9 ± 1.9 nm, con un PDI promedio de 0.110, y donde se evidencia una inversión en el potencial zeta a un valor de $+49.7 \pm 1.8$ mV. Esta inversión del potencial zeta da cuenta de interacciones electrostáticas entre las cargas negativas del surfactante de la nanoemulsión y las cargas positivas del quitosano, y la formación de una cubierta polimérica.

Concentración de Eudragit® L100-55 %p/v	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
0,005	310.4	0.172	-67.7
0,01	307.4	0.167	-72.8
0,015	275.9	0.161	-71.3
0,02	281.2	0.204	-71.3
0,025	305.8	0.180	-65.3
0,05	262.2	0.161	-72.4
0,075	280.8	0.174	-72.3
0,1	288.2	0.204	-72.3

Tabla 3.- Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones aniónicas cubiertas en Eudragit® L100-55.

Posteriormente, se evaluó la obtención de nanocápsulas aniónicas cuya segunda capa de cobertura correspondería a Eudragit® L100-55. Para ello, se ensayó la incubación de las nanocápsulas de quitosano con una solución acuosa de Eudragit® (0.005 - 0.100 % p/v). Se espera que el Eudragit® recubra las nanocápsulas de quitosano mediante interacciones electrostáticas atractivas. La caracterización de las formulaciones se presenta en la tabla 6. El diámetro hidrodinámico promedio alcanzó valores entre 275.9 y 310.4 nm con índices de polidispersión entre 0.161 y 0.204. El potencial zeta se invirtió hasta valores entre -72.8 y -65.3 mV, esto nos indica que el Eudragit® L100-55 recubrió exitosamente las nanocápsulas a través de interacciones electrostáticas con el quitosano en la superficie. De estas nanoemulsiones se escogieron para el secado por aspersion aquellas con las siguientes concentraciones de Eudragit® L100-55: 0.025, 0.050 y 0.100.

3.6.- Caracterización fisicoquímica de nanopolvos

De acuerdo con nuestra propuesta, se secó por atomización (*nano spray-dryer* Büchi B-90) las nanocápsulas desarrolladas conteniendo 0.025, 0.050 y 0.100 % p/v de Eudragit® L100-55. De éstas, solo la concentración más baja del

polímero resultó en nanopulvos con PDI menor a 0.5. El análisis de tamaño de todas las nanoformulaciones, evidencia la presencia de poblaciones de partículas de aproximadamente 50 nm y poblaciones de 250-350 nm (Ver Figura 7). De estas, las poblaciones de tamaño mayor serían deseables ya que representarían el secado individual de cada nanocápsula, mientras que aquellas partículas cuyo tamaño se acercan a los 50 nm corresponderían a gránulos de polímeros presentes en la fase continua producto del secado de gotas de la fase acuosa que no contienen nanoformulaciones. El tamaño promedio de los nanopulvos resultantes de la nanoemulsión a 0.025% fue de 257.2 ± 26.4 nm con un PDI promedio de 0.336. El potencial zeta de este fue de -106 mV, este cambio en el último parámetro puede atribuirse al pH utilizado en la solución de resuspensión. Debido a que el polímero Eudragit® presenta principalmente ácidos débiles. Debido a la importancia de la estabilidad de la formulación en el medio estomacal, los pulvos fueron resuspendidos en medio ácido (ácido acético 0.01 %p/v).

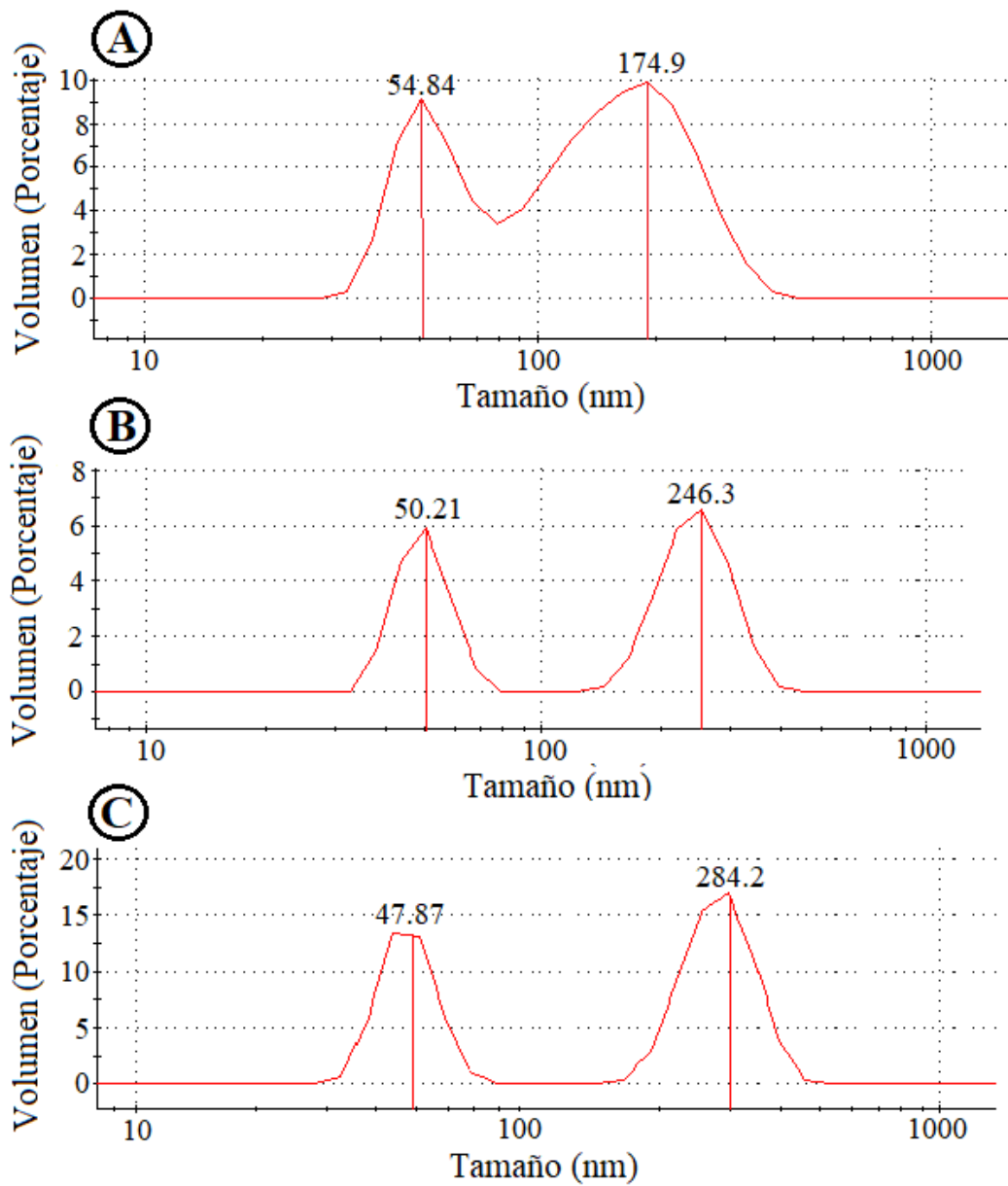


Figura 8.- Distribución de tamaño por volumen de los nanopolvos obtenidos.
 A: Quitosano 0.05% y Eudragit® L100-55 0.025%
 B: Quitosano 0.05% y Eudragit® L100-55 0.05%
 C: Quitosano 0.05% y Eudragit® L100-55 0.1%

4.- Conclusión

La luteína es una molécula de tipo carotenoide, lipofílica, con una alta susceptibilidad a la degradación ambiental y al medio biológico. En este sentido, su vehiculización y protección en vehículos de tamaño nanométrico resultaría interesante.

La luteína juega un rol importante en la salud de los seres humanos, previniendo y limitando el daño causado por los agentes oxidantes a los cuales nos enfrentamos día a día. Provee a la mácula de protección contra la oxidación tanto por radicales libres como por la exposición a la luz UV. Luteína es capaz de aumentar las concentraciones de enzimas antioxidantes presentes en el torrente sanguíneo como también en el hígado, incrementando aún más su capacidad antioxidante.

De acuerdo con los antecedentes recopilados, el mercado de la luteína es incipiente, pero de crecimiento sostenido. Parece estratégica la introducción de productos innovadores con luteína en la forma de “suplementos vitamínicos o como aditivo para alimentos funcionales” mediante el uso de tecnologías de nanoencapsulación. En la actualidad, existe una gran tendencia de los consumidores/pacientes por producto de origen natural. En este caso, la obtención de principios activos, como la luteína, desde flores de *T. patula* parece una buena alternativa a los proveedores de materias primas de origen sintético.

La luteína es absorbida en el intestino delgado a través de su inclusión en quilomicrones y posteriormente se transforma en partículas de LDL y HDL. De esta forma la luteína tiene acceso a la circulación sistémica y eventualmente a la retina atravesando el epitelio pigmentario de ésta. Al requerir su inclusión en

quilomicrones, la absorción de la luteína se ve muy favorecida por la presencia de grasa, por lo que se requiere su consumo junto a una comida principal, como el almuerzo o la cena.

El presente estudio propone el desarrollo y evaluación de un nanovehículo en suspensión acuosa que contiene luteína y que posteriormente será transformado a polvo seco reconstituible en medios acuosos. Si bien no pudimos desarrollar la formulación final, la nanoemulsión precursora demostró eficiencia para encapsular astaxantina, una molécula muy similar a luteína, brindándole protección contra la degradación mediada por luz UV.

La naturaleza bimodal de la distribución de partículas presenta la oportunidad de mejorar la formulación para evitar la formación de nanopolvos que no contienen LUT.

Las formulaciones propuestas (polvos obtenidos a partir de nanocápsulas de quitosano/Eudragit[®] L100-55), podrían ser administradas incluso con el estómago vacío, pues en núcleo oleosos de los nanosistemas proveerían de aceite necesario para promover la absorción (también podrían ser administradas con las comidas). Tanto el diseño propuesto en este estudio, como los resultados preliminares obtenidos, podrían ser utilizados para el desarrollo y evaluación de un nanopolvo que contenga LUT, y con potencial para el tratamiento de la DMO.

Bibliografía

- Alarcón-Alarcón, Carlos, y otros. «Protection of astaxanthin from photodegradation by its inclusion in hierarchically assembled nano and microstructures with potential as food.» *Food Hydrocolloids* 83 (2018): 36-44.
- Alvarez-Henao, María Victoria, Nataly Saavedra, Sonia Medina, Claudio Jiménez Cartagena, Luz Maria Alzate, y Julián Londoño-Londoño. «Microencapsulation of lutein by spray-drying: Characterization and stability analyses to promote its use as a functional ingredient.» *Food Chemistry* 256 (2018): 181-187.
- Arellano Corral, Cristián. *Extracción de luteína a partir de flores de tagete (Tagete erecta) y estabilización por microencapsulación*. Tesis de pregrado, Santiago, Chile: Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2011.
- Arpagaus, Cordin, Philipp John, Andreas Collenberg, y David Rütli. «Chapter 10. Nanocapsules Formation by Nano Spray drying.» En *Nanoencapsulation technologies for the food and Nutraceutical Industries*, de Seid Mahdi Jafari, 346-401. San Diego, CA, USA: Elsevier Science, 2017.
- Barreda, Viviana D., Luis Palazzesi, Maria C. Tellería, Eduardo B. Olivero, J. Ian Raine, y Félix Forest. «Early evolution of the angiosperm clade Asteraceae in the Cretaceous of Antarctica.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, n° 35 (2015): 10989-10994.

- Benrstein, Paul S., y Ronald P. Hobbs. «Nutrient supplementation for age-related macular degeneration, cataract, and dry eye.» *Journal of Ophthalmic and Vision Research* 9, n° 4 (2014): 487.
- Bhardwaj, D.K., M.S. Bisht, S.C. Uain, C.K. Mehta, y G.C. Sharma. «Quercetagenin 5-methyl ether from the petals of *Tagetes patula*.» *Phytochemistry* 19, n° 4 (1980): 713-714.
- Bodoki, Ede, y otros. «Topical nanodelivery system of lutein for the prevention of selenite-induced cataract.» *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 15, n° 1 (2019): 188-197.
- Bortnowska, Grażyna. «Multilayer Oil-in-Water Emulsions: Formation, characteristics and application as the carriers for Lipophilic Bioactive food components – a review.» *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 65, n° 3 (2015): 157-166.
- Buitelaar, R.M., M.T. Casário, y J. Tramper. «Elicitation of thiophene production by hairy roots of *Tagetes patula*.» *Enzyme and Microbial Technology* 14, n° 1 (Enero 1992): 2-7.
- Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Food Additive Status list*. FDA. 26 de Agosto de 2021. <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list> (último acceso: 24 de Enero de 2022).
- Cerda-Opazo, Paulina, Martin Gotteland, Felipe A. Oyarzun-Ampuero, y Lorena Garcia. «Design, development and evaluation of nanoemulsion containing avocado peel extract with anticancer potential: A novel biological active ingredient to enrich food.» *Food Hydrocolloids* 111 (2021): 106370.

- Chew, Emily Y., y otros. «Secondary analyses of the effects of lutein/zeaxanthin on age-related macular degeneration progression.» *JAMA Ophthalmology* 132, n° 2 (Noviembre 2014): 2282-2289.
- Chitchumroonchokchai, Chureeporn, Joshua A. Bomser, Jayme E. Glamm, y Mark L. Failla. «Xanthophylls and α -Tocopherol Decrease UVB-Induced Lipid Peroxidation and Stress Signaling in Human Lens Epithelial Cells.» *The Journal of Nutrition* 134, n° 12 (2004): 3225-3232.
- Chitchumroonchokchai, Chureeporn, y Mark L. Failla. «Hydrolysis of Zeaxanthin Esters by Carboxyl Ester Lipase during Digestion Facilitates Micellarization and Uptake of the Xanthophyll by Caco-2 Human Intestinal Cells.» *The Journal of Nutrition* 136, n° 3 (2006): 588-594.
- Craft, Neal E., y Joseph H. Soares. «Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and .beta.-carotene in organic solvents.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, n° 3 (1992): 431-434.
- Danielsson, Ingvar, y Björn Lindman. «The definition of microemulsion.» *Colloids and Surfaces* 3, n° 4 (1981): 391-392.
- De Cicco, Felicetta, Amalia Porta, Francesca Sansone, Rita P. Aquino, y Pasquale Del Gaudio. «Nanospray technology for an in situ gelling nanoparticulate powder as a wound dressing.» *International Journal of Pharmaceutics* 473, n° 1-2 (2014): 30-37.
- Esener, A.A., G. Bol, N.W.F. Kossen, y J.A. Roels. «Effect of water activity on microbial growth.» *Scientific and Engineering Principles*, 1981: 339-344.
- Fir0002. *French Marigold*. Wikimedia Commons.

- Garg, S.N., Reena Charles, y Sushil Kumar. «A new acyclic monoterpene glucoside from the capitula of *Tagetes patula*.» *Fitoterapia* 70, n° 5 (1999): 472-474.
- Gilman, Edward F. *Tagetes patula French Marigold*. UF/IFAS. Febrero de 2014. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FP/FP57100.pdf> (último acceso: 17 de Marzo de 2021).
- Global Market Insights Inc. *Lutein Market Size, Industry Analysis Report, Regional Outlook, Application Development, Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2022 – 2028*. Informe de mercado, Delaware: Global Market Insights Inc., 2021.
- Gomes, G. V., M. R. Sola, A. L. Rochetti, H. Fukumasu, A. A. Vicente, y S. C. Pinho. « β -carotene and α -tocopherol coencapsulated in nanostructured lipid carriers of murumuru (*Astrocaryum murumuru*) butter produced by phase inversion temperature method: characterisation, dynamic in vitro digestion and cell viability study.» *Journal of Microencapsulation* 36, n° 1 (2019): 43-52.
- Guerrero, Simón, y otros. «Curcumin-loaded nanoemulsion: A new safe and effective formulation to prevent tumor recurrence and metastasis.» *Nanoscale* 10, n° 47 (2018): 22612-22622.
- Guinot, Pauline, Annick Gargadennec, Gilles Valette, Alain Fruchier, y Claude Andary. «Primary flavonoids in marigold dye: extraction, structure and involvement in the dyeing process.» *Phytochemical Analysis* 19, n° 1 (2008): 46-51.

- Harrison, Earl H. «Mechanisms of Transport and Delivery of Vitamin A and Carotenoids to the Retinal Pigment Epithelium.» *Molecular Nutrition & Food Research* 63, n° 15 (2019): 1801046.
- Hassanpouraghdam, M. B., F. Shekari, J. Emarat-Pardaz, y M. Safi Shalamzari. «Sesquiterpene rich volatile seed oil of *Tagetes patula* L. from northwest Iran.» *Journal of Central European Agriculture* 12, n° 2 (2011): 304-311.
- Heng, Desmond, Sie Huey Lee, Wai Kiong Ng, y Reginald BH Tan. «The nano spray dryer B-90.» *Expert Opinion on Drug Delivery* 8, n° 7 (2011): 965-972.
- Ho, Nai-Hsing, Baskaran Stephen Inbaraj, y Bing-Huei Chen. «Utilization of microemulsions from *rhinacanthus nasutus* (L.) KURZ to Improve Carotenoid Bioavailability.» *Scientific Reports* 6, n° 1 (2016).
- Hudson, J.B., y G.H.N. Towers. «Therapeutic potential of plant photosensitizers.» *Pharmacology & Therapeutics* 49, n° 3 (1991): 181-222.
- Jalali-Jivan, Mehdi, Soleiman Abbasi, y Bahram Fathi-Achachlouei. «Lutein extraction BY MICROEMULSION TECHNIQUE: Evaluation of stability versus thermal processing and environmental stresses.» *LWT* 149 (2021): 111839.
- Jelvehgari, Mitra, y otros. «Development of pH-sensitive insulin nanoparticles using Eudragit L100-55 and chitosan with different molecular weights.» *AAPS PharmSciTech* 11, n° 3 (2010): 1237-1242.

- Joye, Iris J., Gabriel Davidov-Pardo, y David Julian McClements. «Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability.» *Trends in Food Science & Technology* 40, n° 2 (2014): 168-182.
- Krinsky, Norman I., John T. Landrum, y Richard A. Bone. «Biologic Mechanisms of the Protective Role of Lutein and Zeaxanthin in the Eye.» *Annual Review of Nutrition* 23, n° 1 (2003): 171-201.
- Li, Binxing, Preejith Vachali, y Paul S. Bernstein. «Human ocular carotenoid-binding proteins.» *Photochemical & Photobiological Sciences* 9, n° 11 (2010): 1418.
- Li, Xiang, Nicolas Anton, Cordin Arpagaus, Fabrice Belleteix, y Thierry F. Vandamme. «Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90.» *Journal of Controlled Release* 147, n° 2 (2010): 304-310.
- Liu, Xiaojuan, David Julian McClements, Yong Cao, y Hang Xiao. «Chemical and Physical Stability of Astaxanthin-Enriched Emulsion-Based Delivery Systems.» *Food Biophysics* 11, n° 3 (2016): 302-310.
- Loksuwan, J. «Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin.» *Food Hydrocolloids* 21, n° 5-6 (2007): 928-935.
- Madene, Atmane, Muriel Jacquot, Joël Scher, y Stéphane Desobry. «Flavour Encapsulation and Controlled Release - A Review.» *International Journal of Food Science and Technology* 41 (2006): 1-21.
- MarketsandMarkets Analysis. *Lutein Market*. Informe de mercado, Hadapsar: MarketsandMarkets Analysis, 2017.

- Marotti, Illaria, Mauro Marotti, Roberta Piccaglia, Anna Nastri, Silvia Grandi, y Giovanni Dinelli. «Thiophene occurrence in different Tagetes species: agricultural biomasses as sources of biocidal substances.» *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, n° 7 (2010): 1210-1217.
- Mehta, Sonia. «Age-Related Macular Degeneration.» *Primary Care: Clinics in Office Practice* 42, n° 3 (2015): 377-391.
- Mercadante, Adriana Zerlotti, Daniele B. Rodrigues, Fabiane C. Petry, y Lilian Regina Mariutti. «Carotenoid esters in foods - A review and practical directions on analysis and occurrence.» *Food Research International* 99, n° 1 (2017): 830-850.
- Mordor Intelligence. *Global Lutein Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2022 - 2027)*. Informe de mercado, Hyderabad, India: Mordor Intelligence, 2019.
- Mukundan, Usha, y Martin Hjortso. «Thiophene accumulation in hairy roots of Tagetes patula in response to fungal elicitors.» *Biotechnology Letters* 12, n° 8 (1990): 609-614.
- Munhoz, V.M., y otros. «Estudo farmacognóstico de flores de Tagetes patula L. (Asteraceae).» *Rev. Fitos* 7 (2012): 225-230.
- Munhoz, V.M., y otros. «Extraction of flavonoids from Tagetes patula: process optimization and screening for biological activity.» *Revista Brasileira de Farmacognosia* 24, n° 5 (2014): 576-583.
- Muzzarelli, Ricardo A. A. «Chapter 3 - Chitin Chemistry.» En *Chitin*, de Ricardo A. A. Muzzarelli, 113. Oxford, NY, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt am Main.: Pergamon Press, 1977.

- NCBI. *PubChem Compound Summary for CID 5281243, Lutein*. 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lutein> (último acceso: 24 de Marzo de 2020).
- Negi, J. S., V. K. Bisht, A. K. Bhandari, y R. C. Sundriyal. «Essential Oil Contents and Antioxidant Activity of *Tagetes patula* L.» *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 16, n° 3 (2013): 364-367.
- Orellana, Sandra L., Cesar Torres-Gallegos, Rodrigo Araya-Hermosilla, Felipe A. Oyarzun-Ampuero, y Ignacio 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, n° 3 (2015): 1141-1152.
- Oyarzun-Ampuero, Felipe A., Gustavo R. Rivera-Rodríguez, Maria J. Alonso, y Dolores Torres. «Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery.» *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 49, n° 4 (2013): 483-490.
- Politi, Flávio A.S., Geisiany M. Queiroz-Fernandes, Edvânio R. Rodrigues, Jolindo A. Freitas, y Rosemeire C.L.R. Pietro. «Antifungal, antiradical and cytotoxic activities of extractives obtained from *Tagetes patula* L. (Asteraceae), a potential acaricide plant species.» *Microbial Pathogenesis* 95 (2016): 15-20.
- Politi, Flávio A.S., y otros. «Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806).» *Parasites & Vectors* 5, n° 1 (2012): 295.

- Prakash, Om, P.K. Rout, C.S. Chanotiya, y L.N. Misra. «Composition of essential oil, concrete, absolute and SPME analysis of *Tagetes patula capitula*.» *Industrial Crops and Products* 37, n° 1 (2012): 195-199.
- Riaz, Muhammad, y otros. «Traditional uses, Phyto-chemistry and pharmacological activities of *Tagetes Patula L.*» *Journal of Ethnopharmacology* 255 (2020): 112718.
- Rodríguez-Huezo, M.E., R. Pedroza-Islas, L.A. Prado-Barragán, C.I. Beristain, y E.J. Vernon-Carter. «Microencapsulation by Spray drying of Multiple emulsions Containing Carotenoids.» *Journal of Food Science* 69, n° 7 (2006): 351-359.
- Romagnoli, C., R. Bruni, E. Andreotti, M. K. Rai, C. B. Vicentini, y D. Mares. «Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of *capitula* from wild Indian *Tagetes patula L.*» *Protoplasma* 225, n° 1-2 (2005): 57-65.
- Santos, Sara S., y otros. «Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species.» *Materials Science and Engineering: C* 33, n° 3 (2013): 1389-1394.
- Schiavinato, Dario J., Diego G. Gutiérrez, y Adriana Bartoli. «Typifications and nomenclatural clarifications in South American *Tagetes* (Asteraceae, *Tageteae*).» *Phytotaxa* 326, n° 3 (2017): 175.
- Shi, X.-M., y F. Chen. «Stability of lutein under various storage conditions.» *Food / Nahrung* 41, n° 1 (1997): 38-41.

- Sindhu, Edakkadath R., Preethi C. Korengath, y Ramadasan Kuttan. «Antioxidant activity of carotenoid lutein in vitro and in vivo.» *Indian Journal of Experimental Biology* 48 (Agosto 2010): 843-848.
- Slomkowski, Stanislaw, y otros. «Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC recommendations 2011).» *Pure and Applied Chemistry* 83, n° 12 (2011): 2229-2259.
- Steiner, B. M., D. J. McClements, y G. Davidov-Pardo. «Encapsulation systems for lutein: A review.» *Trends in Food Science & Technology* 82 (2018): 71-81.
- Szarka, Sz., É. Héthelyi, É. Lemberkovics, I. N. Kuzovkina, P. Bányai, y É. Szöke. «GC and GC-MS Studies on the Essential Oil and Thiophenes from *Tagetes patula* L.» *Chromatographia* 63, n° S13 (2006): S67-S73.
- Szarka, Szabolcs, y otros. «GC–MS Studies of Thiophenes in the Supercritical Fluid CO₂ and Solvent Extracts of *Tagetes patula* L.» *Chromatographia* 71, n° 11-12 (2010): 1039-1047.
- Tawfeek, Hesham M., Ahmed A.H. Abdellatif, Thomas J. Dennison, Afzal R. Mohammed, Younis Sadiq, y Imran Y. Saleem. «Colonic delivery of indometacin loaded PGA-co-PDL microparticles coated with Eudragit L100-55 from fast disintegrating tablets.» *International Journal of Pharmaceutics* 531, n° 1 (2017): 80-89.
- Vishwanathan, Rohini, Thomas A. Wilson, y Robert Nicolosi. «Bioavailability of a Nanoemulsion of Lutein is Greater than a Lutein Supplement.» *Nano Biomedicine and Engineering* 1, n° 1 (2009): 38-49.

- Wang, Xiao, y otros. «Effects of lutein particle size in embedding emulsions on encapsulation efficiency, storage stability, and dissolution rate of microencapsules through spray drying.» *LWT* 146 (2021): 111430.
- Wilczewska, Agnieszka Z., Katarzyna Niemirowicz, Karolina H. Markiewicz, y Halina Car. «Nanoparticles as drug delivery systems.» *Pharmacological Reports* 64, n° 5 (2012): 1020-1037.
- Xu, Duoxia, Zulipiya Aihemaiti, Yanping Cao, Chao Teng, y Xiuting Li. «Physicochemical stability, microrheological properties and microstructure of lutein emulsions stabilized by multilayer membranes consisting of whey protein isolate, flaxseed gum and chitosan.» *Food Chemistry* 202 (2016): 156-164.
- Yaqoob Khan, Azhar, Sushama Talegaonkar, Zeenat Iqbal, Farhan Jalees Ahmed, y Roop Krishan Khar. «Multiple emulsions: An overview.» *Current Drug Delivery* 3, n° 4 (2006): 429-443.
- Zhang, Xiujuan, Wenjuan Yin, Yankai Qi, Xiangcun Li, Wenjun Zhang, y Gaohong He. «Microencapsulation of astaxanthin in alginate using modified emulsion technology: Preparation, characterization, and cytostatic activity.» *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 95, n° 3 (2016): 412-419.
- Zhao, Lisha, Feral Temelli, Jonathan M. Curtis, y Lingyun Chen. «Encapsulation of lutein in liposomes using supercritical carbon dioxide.» *Food Research International* 100 (2017): 168-179.

Índice de figuras

Figura 1.- Flor de Tagete patula (Fir0002 2005)	2
Figura 2.- Estructura química de la LUT	3
Figura 3.- Diagrama esquemático de una operación de secado por aspersion. .	7
Figura 4.- Nano secador por aspersion B-90® y un diagrama esquemático de su principio funcional.	9
Figura 5.- Estabilidad de LUT bajo distintas condiciones de almacenamiento.	19
Figura 6.- Posibles mecanismos para la entrada y metabolismo de xantofilas desde la sangre hacia el RPE.....	23
Figura 7.- Escala de tamaño de las partículas estudiadas.	24
Figura 8.- Distribución de tamaño por volumen de los nanopolvos obtenidos.	35

Índice de Tablas

Tabla 1. Solubilidad y estabilidad de LUT en solventes orgánicos y sus respectivos puntos de ebullición.	20
Tabla 2.- Caracterización fisicoquímica de las emulsiones ensayadas.....	31
Tabla 3.- Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones aniónicas cubiertas en Eudragit® L100-55.....	33