



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DESARROLLO DE UN NANOSISTEMA MUCOADHESIVO PARA LA
ADMINISTRACIÓN ORAL DE AGENTES ANTIOXIDANTES EN RUMIANTES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:
MARIO ALBERTO CANO VEGA

ASESOR: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO
COASESOR: DR. GUSTAVO R. RIVERA RODRÍGUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
AV. PUNTA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Desarrollo de un nanosistema mucoadhesivo para la administración oral de agentes antioxidantes en rumiantes

Que presenta el pasante: Mario Alberto Cano Vega

Con número de cuenta: 306020759 para obtener el Título de: Licenciado en Farmacia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de agosto de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DAR. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez	
SECRETARIO	Dra. Raquel López Arellano	
1er. SUPLENTE	Dr. José Juan Escobar Chávez	
2do. SUPLENTE	MI. Claudia Mariano Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac

Dedico este trabajo a Dios y su creación, la vida...

*Que aún en mi condición humana pueda domar mi alma y dejar de lado todo aquello que me
aleje del camino que hoy he decidido seguir.*

*Que con mi trabajo en esta efímera vida aporte a la tierra que me ha cobijado la bala mágica
que alivie las enfermedades del cuerpo; y que mis pensamientos y actos se conviertan en
ejemplos para evitar las enfermedades del alma...*

Agradecimientos

A Dios... A la Vida...

A la Universidad Nacional Autónoma de México... A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán...

A mi madre que primero me dio su espacio, luego la vida y después como si hubiera sido poco me ofreció su amor, esfuerzo y cansancio, las palabras de aliento y los abrazos.

A mi padre, por compartir conmigo en tantas ocasiones su sabiduría; por su amor incondicional y por el ejemplo de cada día, por enseñarme la sonrisa y la actitud con la que se enfrenta a la vida.

A mi hermana, por estar a mi lado todos estos años, compartir conmigo su espacio, ser mi amiga y por creer siempre en mí.

A mi novia Fher por los felices momentos que pasamos durante nuestras clases de universidad, la paciencia y comprensión durante el tiempo que he dedicado a este trabajo de tesis, las ideas que me has dado y ante todo por el cariño que recibo siempre de ella.

A toda mi familia, a mis abuelos, tíos, tías, primos, primas, sobrinos, sobrinas... porque sin ustedes yo no sería el mismo, por todos esos divertidos momentos y por los de aflicción, porque todos han marcado mi vida.

A mi amiga de cuatro patas, mi perrita Chispa, por acompañarme en todas y en cada una de las noches de desvelo; por esperar siempre sobre mi mochila, libretas, libros y tareas; porque al final por tu esfuerzo tú también deberías ser farmacéutica.

A mis compañeros y amigos de la primer generación de Farmacia, porque cada uno de ustedes ha dejado una enseñanza en mí y ahora, aunque separados físicamente, se encontraran en mis recuerdos y en mi corazón. Y de forma especial gracias a mis compañeros de trabajo: Gracias "Ñoñoteam", gracias "Surtido Rico", gracias "Amigos".

A mis amigos de siempre... Kevin y Javier

A la Dra. Raquel y al Profe. Juan José, por los ejemplos, el afecto, los conocimientos, la confianza, el apoyo, las herramientas brindadas, los consejos, el tiempo y la paciencia... Al grupo de trabajo de LEDEFAR, que ahora son mis amigos; por compartir el lugar de trabajo y sus conocimientos; por los consejos y los momentos de esparcimiento

Al Dr. Gustavo R. Rivera, compañero, asesor y amigo, porque este trabajo es gracias a ti y porque con tu propio esfuerzo me has dado el ejemplo para mirar más alto y me has mostrado el científico en el que me quiero convertir.

A la Dra. Elizabeth García García, por el apoyo recibido para la realización de las pruebas de caracterización, por los consejos y por motivarme a pensar más y más acerca de este trabajo, lo que me ha permitido enriquecerlo y me ha enriquecido de conocimientos.

Al Ing. Carlos Flores Morales del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM y a la M. en C. Sofía por la amabilidad, los conocimientos, el tiempo y la paciencia que me brindaron para la realización de las técnicas de microscopía electrónica.

Al profesor Crisóforo Mercado Márquez por el apoyo y facilidades brindadas para la obtención de animales de laboratorio para las pruebas realizadas.

A todos y a cada uno de mis animalitos de laboratorio, por comprometerse con mi carrera y este trabajo de tesis a tal punto de dar su vida para ello...

A los sinodales por tomarse un tiempo para revisar y corregir este trabajo de tesis, porque sus opiniones han hecho que este trabajo pueda ser.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología y a la Secretaría de Educación Pública por el apoyo económico que me brindaron para poder concluir con este trabajo

A los que descuidadamente he olvidado... a todos.... mil gracias...

Mario Alberto Cano Vega

Contenido

Índice de figuras	vi
Índice de tablas	viii
Lista de abreviaturas y símbolos	x
Justificación.....	xi
Marco teórico	2
1. Etnoveterinaria	2
2. Cúrcuma longa Linn y Curcumina.....	3
2.1 Extracción.....	4
2.2 Estructura química y propiedades fisicoquímicas de la curcumina.....	5
2.3 Propiedades terapéuticas	10
2.4 Farmacocinética de la curcumina.....	15
3. Nanotecnología en Farmacia. Nanomedicina.	19
3.1 Nanocristales.....	20
3.2 Liposomas	22
3.3 Micelas poliméricas.....	23
3.4 Dendrímeros	25
3.5 Nanopartículas poliméricas.....	26
4. Preparación de nanocápsulas	27
4.1 Consideraciones generales para la caracterización de nanopartículas	30
5. Mucoadhesión y polímeros mucoadhesivos	31
5.1 Quitosano	34
5.2 Factores que afectan la mucoadhesión.....	36
6. Rumiantes. Generalidades del aparato digestivo.....	39
Objetivo general	42
Objetivos particulares.....	42
Hipótesis	42

Materiales.....	44
Métodos	46
Resultados y discusión.....	57
Selección de aceite para el núcleo lipófilo.....	57
Selección del tipo de tensoactivo	62
Determinación de los componentes y proporciones dentro de la formulación	63
Estabilidad	96
Microscopia electrónica de transmisión.....	100
Estabilidad en diferentes puntos de pH.....	100
Estudios In vivo y Ex vivo	104
Conclusiones.....	117
Anexo.....	118
Referencias	121

Índice de figuras

Figura 1 Curcuma longa L.	3
Figura 2 Evolución del número de publicaciones al año relacionadas a los términos de búsqueda Curcumina.	4
Figura 3 Ejemplo del tautomerismo típico ceto-enol de los curcuminoides.	8
Figura 4 Espectro UV-Vis de la curcumina.	8
Figura 5 Comportamiento de la curcumina a diferente pH.	9
Figura 6 Ruta de degradación común de la curcumina hasta la obtención de vainillina y acetona [11].	10
Figura 7 Resumen de propiedades terapéuticas de la curcumina [3].	11
Figura 8 Evolución de la concentración de curcumina en plasma de ratón después de una dosis única por vía oral (1g/Kg) [58].	16
Figura 9 Evolución de la concentración de curcumina en plasma de ratón después de una dosis única por vía intraperitoneal (0.1 g/Kg) [58].	17
Figura 10 Principales metabolitos de curcumina encontrados en humano y ratón [57, 58].	18

Figura 11 Imagen de microscopio de barrido de un compuesto A (MW = 469 g/mol) formulado en una nanosuspension [71]	21
Figura 12 Representación gráfica de una estructura de un liposoma.....	23
Figura 13 Representación gráfica de la estructura de una micela polimérica.....	24
Figura 14 Representación gráfica de la estructura de un dendrímero.....	25
Figura 15 Representación gráfica de la estructura de nano partículas poliméricas.....	26
Figura 16 Técnicas para medir fuerza mucoadhesiva [87].....	32
Figura 17 Estructura química de la quitina y el quitosano [93].	35
Figura 18 Anatomía del aparato digestivo de los rumiantes.....	39
Figura 19 Estructura química de la fosfatidilcolina.	48
Figura 20 Estructura química del Span 40®.	49
Figura 21 Estructura química de los componentes del Cremophor EL®.	49
Figura 22 Estructura química del Poloxámero 188.	50
Figura 23 Esquematación de la producción y caracterización de nanocápsulas mucoadhesivas cargadas con curcumina.	55
Figura 24 Composición y apariencia física de nanocápsulas con diferentes núcleos oleosos...	58
Figura 25 Representación clásica del mecanismo de auto-oxidación de un aceite.....	59
Figura 26 Composición y apariencia física de las formulaciones producidas.	65
Figura 27 Gráfico de probabilidad normal para 1/Tamaño de partícula.....	69
Figura 28 Gráfico de residuos para 1/Tamaño de partícula.	70
Figura 29 Diagrama de Pareto para el inverso de tamaño de partícula.	71
Figura 30 Gráfico de superficie de respuesta para 1/Tamaño de partícula.	72
Figura 31 Gráfico cúbico de respuesta para 1/Tamaño de partícula.....	73
Figura 32 Gráfico de probabilidad normal para log (Pdl).....	75
Figura 33 Gráfico de residuos para log (Pdl).	76
Figura 34 Diagrama de Pareto para el log (Pdl).....	77
Figura 35 Gráfico de superficie de respuesta para log [Pdl].....	78
Figura 36 Representación esquemática de la floculación de nanocápsulas cargadas de curcumina y cubiertas con quitosano.....	81
Figura 37 Gráfico cúbico de respuesta para log [Pdl].	84
Figura 38 Gráfico de probabilidad normal para Potencial ζ	85
Figura 39 Gráfico de residuos para Potencial ζ	86
Figura 40 Diagrama de Pareto para Potencial ζ	88
Figura 41 Gráfico de superficie de respuesta para Potencial ζ	89

Figura 42 Localización del plano de corte con relación al plano de Stern sobre la superficie de una nanocápsula.....	92
Figura 43 Gráfico cúbico y de superficie de respuesta para Potencial ζ	93
Figura 44 Representación esquemática de las nanocápsulas cargadas de curcumina producidas.....	94
Figura 45 Micrografía obtenida por TEM de las nanocápsulas de la Formulación 7.	100
Figura 46 Tamaño de partícula de nanocápsulas cubiertas de quitosano bajo diferentes valores de pH.	101
Figura 47 Índice de polidispersión de nanocápsulas cubiertas de quitosano bajo diferentes valores de pH.	101
Figura 48 Apariencia física del tejido después de contacto con Nanocapsulas y Transcutol HP.	104
Figura 49 Apariencia física del tejido intestinal de borrego después de la prueba de mucoadhesión.....	106
Figura 50 Apariencia física de un segmento de intestino de borrego después de contacto con la formulación 7.....	107
Figura 51 Tracto gastrointestinal de ratón abierto 3 horas después de administración por vía oral de una suspensión de curcumina en agua.	109
Figura 52 Tracto gastrointestinal de ratón abierto 3 horas después de la administración por vía oral de suspensión de nanopartículas cargadas de curcumina.....	110
Figura 53 Representación esquemática de la ionización del quitosano [146].	111
Figura 54 Estructuras químicas de los principales aminoácidos y carbohidratos que forman la mucina [147].....	112

Índice de tablas

Tabla 1. Especificaciones químicas de los componentes del extracto de la Curcuma Longa [4, 11].....	5
Tabla 2 Estructura química desarrollada de los curcuminoides de la Curcuma longa	6
Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas de la curcumina. Se resumen las principales características de la curcumina de interés para el desarrollo farmacéutico.	7
Tabla 4 Distribución de curcumina en tejidos después de la administración intraperitoneal en ratón.....	17

Tabla 5 Análisis comparativo de los criterios sugeridos para la selección de un método de nano-encapsulación [78].	29
Tabla 6 Técnicas aplicadas a la caracterización básica de nanopartículas.	31
Tabla 7 Principales factores que afectan la mucoadhesión.	36
Tabla 8 Formulación de prueba para la selección de aceite.....	47
Tabla 9 Principales ácidos grasos que componen a los aceites vegetales. [101-103].....	47
Tabla 10 Proporciones de los excipientes (en gramos) en las formulaciones de nanocápsulas cargadas de curcumina estudiadas.	51
Tabla 11 Proporciones de los excipientes (en porcentaje) en las formulaciones de nanocápsulas cargadas de curcumina estudiadas.	52
Tabla 12 Propiedades del Aceite de Ricino y Vitamina E consideradas para la selección de núcleo lipófilo para las nanocápsulas cargadas de curcumina.....	62
Tabla 13 Características físicas y de superficie después de 24 horas de la preparación de las formulaciones obtenidas.....	66
Tabla 14 Factores codificados y niveles del experimento de exploración.....	67
Tabla 15 Análisis de Varianza para 1/Tamaño de partícula	68
Tabla 16 Resultados del análisis de la Suma de Cuadrados Tipo III para el inverso de tamaño de partícula.	71
Tabla 17 Análisis de Varianza para log (Pdl)	74
Tabla 18 Suma de Cuadrados Tipo III para log [Pdl].....	77
Tabla 19 Promedio y desviación estándar de Pdl para cada grupo.....	79
Tabla 20 Análisis de Varianza para Potencial ζ	85
Tabla 21 Suma de Cuadrados Tipo III para potencial ζ	87
Tabla 22 Resumen del análisis estadístico a cada una de las variables de respuesta estudiadas.....	95
Tabla 23 Estabilidad física de los 17 experimentos, sin dilución, almacenados a 4°C.....	97
Tabla 24 Fórmula condensada y fórmula desarrollada de los principales ácidos grasos presentes en los aceites vegetales empleados durante la experimentación.	118
Tabla 25 Clasificación de disolventes residuales en fármacos, excipientes y medicamentos [154].	119

Lista de abreviaturas y símbolos

%	Porcentaje
±	Mas, menos
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µl	Microlitros
BCS	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
CAS number	Chemical Abstract Service number
cm	Centímetros
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	Acido desoxirribonucleico
FAO	Food and Agriculture Organization
gr	Gramos
Kg	Kilogramos
M	Concentración Molar (mol/l)
ml	Mililitros
MM	Masa molecular
mV	Milivoltios
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PdI	Índice de polidispersión
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
LEDEFAR	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico
MW	Peso molecular
Castor oil	Aceite de ricino
Aceite de castor	Aceite de ricino
USP	Farmacopea de los Estados Unidos

Justificación

Posiblemente el peligro más importante y continuo para las células proviene de la acción y presencia de moléculas oxidantes. Dentro de estas moléculas se encuentran diversos tipos de radicales libres, tales como alquil, hidroxil, hipoclorito, oxígeno, peroxi, superóxido y el peróxido de hidrógeno. Estos radicales pueden tener un origen endógeno, al formarse de modo natural en las células del organismo, o bien un origen exógeno, al proceder de diversos agentes externos, tales como disolventes orgánicos, el humo, los pesticidas, etc. [2].

La reactividad química de los radicales libres formados durante los procesos metabólicos normales y/o los adquiridos del medio, les permite inducir un amplio espectro de reacciones nocivas para el organismo. Para contrarrestar estos efectos nocivos, el organismo suele disponer de moléculas ricas en electrones que, al donarlos, ejercen un efecto antioxidante. Sin embargo, cuando los sistemas antioxidantes defensivos del organismo se ven superados por la actividad dañina de los radicales libres, aparece un estrés oxidativo que tiene trascendencia sobre la salud [2].

Existen otros antioxidantes que pueden ser ingeridos en la dieta o ser suplementados y, al igual que los sistemas antioxidantes defensivos del organismo, tienen como principal función disminuir el daño que causan los agentes oxidantes en las células del organismo vivo. Se ha demostrado que el uso de curcumina tiene grandes beneficios en la salud de quien la consume debido a su actividad antioxidante y terapéutica en el tratamiento de múltiples padecimientos, aunque desde el punto de vista biofarmacéutico presenta problemas de biodisponibilidad oral, limitando su efectividad terapéutica y en consecuencia su uso [3, 4].

El LEDEFAR propone el desarrollo de un nuevo sistema para la administración y liberación de curcumina. Dicho sistema consistirá en la aplicación nanotecnológica al desarrollo de una suspensión de nanocápsulas. Dicha suspensión, permitirá aumentar la capacidad antioxidante de la curcumina mejorando los procesos de administración, su biodisponibilidad oral y disminuyendo los costos de la suplementación. Así, este nuevo nanosistema conteniendo curcumina adquiere gran importancia en el desarrollo, innovación y mejor apego a la administración de esta sustancia.



LEDEFAR

Marco teórico



Mario Alberto Cano Vega
Lic. Farmacia

Marco teórico

En años recientes el tratamiento de las enfermedades más comunes e inclusive las más exóticas, ha sufrido una gran transformación. En la búsqueda de más y mejores alternativas para enfrentar enfermedades se desarrollan cada día nuevas herramientas, se perfeccionan las ya existentes, o bien, en un proceso de retrospectiva se retoman terapias y curas ancestrales de uso popular. Las nuevas aproximaciones involucran el uso de nuevos materiales, sistemas y dispositivos, mientras que de la medicina ancestral y popular se retoman diversas aplicaciones terapéuticas de plantas, remedios e incluso tratamientos personales y espirituales.

1. Etnoveterinaria

En la actualidad, al igual que en la medicina humana, la aplicación terapéutica de las plantas y de remedios tradicionales a la práctica médica veterinaria es bastante frecuente, siendo a menudo competencia de los productos farmacéuticos de síntesis por los cuales durante algún tiempo habían sido desplazados [5]. Así, ante el reciente auge de los métodos terapéuticos alternativos en medicina humana y sus beneficios aportados, la medicina veterinaria ha comenzado a aplicar las técnicas de la medicina alternativa para el tratamiento y control de las enfermedades en los animales [6].

La llamada medicina etnoveterinaria [6, 7] se define como el uso de plantas medicinales localmente disponibles para la paliación de enfermedades en los animales, principalmente los de consumo humano o de producción [5]. La etnoveterinaria tiene importantes ventajas con respecto a la medicina veterinaria moderna. Por ejemplo, actualmente el uso de fármacos sintéticos se convierte en una decisión crítica para el productor, debido al riesgo de generar residuos en el producto y en el caso de antibióticos la resistencia de los microorganismos a estos es cada vez mayor. Además, el elevado costo de los medicamentos sintéticos es causa de tratamientos incompletos o con un mal seguimiento [6].

Diversas son las plantas y remedios utilizados para el tratamiento de diversos padecimientos en animales. Sin embargo, se describirá únicamente a la *Curcuma longa*, utilizada para el desarrollo de los sistemas terapéuticos descritos en esta tesis. Esta planta resulta de particular interés por sus diversas propiedades terapéuticas, muchas de ellas científicamente demostradas [1, 4]. Particularmente empleada para el tratamiento de padecimientos en humanos, los beneficios antioxidantes que aporta esta planta tienen la suficiente importancia como para pensar en su aplicación veterinaria [8, 9].

2. *Curcuma longa* Linn y Curcumina

La *Curcuma longa* L. (Figura 1) se ha utilizado ampliamente en la medicina tradicional de China e India, y su uso persiste hasta la actualidad formando parte de preparaciones por demás variadas. Su uso inclusive ha llevado a la comercialización en el mercado Hindú de las llamadas Band-Aids™ de Jhonson & Jhonson. También conocida como *Turmeric* en inglés, *haldi* en hindú y *ukon* en japonés, sus aplicaciones no solo se limitan a la terapéutica sino que su uso se extiende también a la cocina como especia, saborizante y colorante y en cosmetología como colorante por su atractivo matiz [1].



Figura 1 *Curcuma longa* L.

La *Curcuma longa* L., de la familia de las Zingiberáceas, posee un rizoma de color naranja vivo característico cubierto de una delgada película marrón clara [1].

Las aplicaciones de la *Curcuma longa* L. en la medicina son variadas e incluyen, entre muchas otras, las siguientes [1]:

- a) Tratamiento de infecciones.
- b) Cicatrización de heridas.
- c) Tratamiento de quemaduras.
- d) Tratamiento de enfermedades de la piel.
- e) Tratamiento de desórdenes digestivos como dispepsia y acidez, indigestión, flatulencia o úlceras.
- f) Tratamiento de enfermedades dentales.

La creciente importancia que se ha dado en la medicina tradicional a esta planta, ha llevado a que la investigación dedicada a la misma se multiplique alrededor del mundo. Esta investigación ha arrojado la precisa identificación de los componentes que condicionan la actividad de la planta. De gran interés resulta la curcumina (Tabla 1 y Tabla 2), principal componente de la planta y compuesto que brinda el color amarillo característico y la actividad terapéutica del denominado “oro hindú”. En los últimos 10 años se ha observado un crecimiento exponencial en el número de publicaciones relacionadas con la actividad terapéutica de la *Curcumina* (Figura 2).

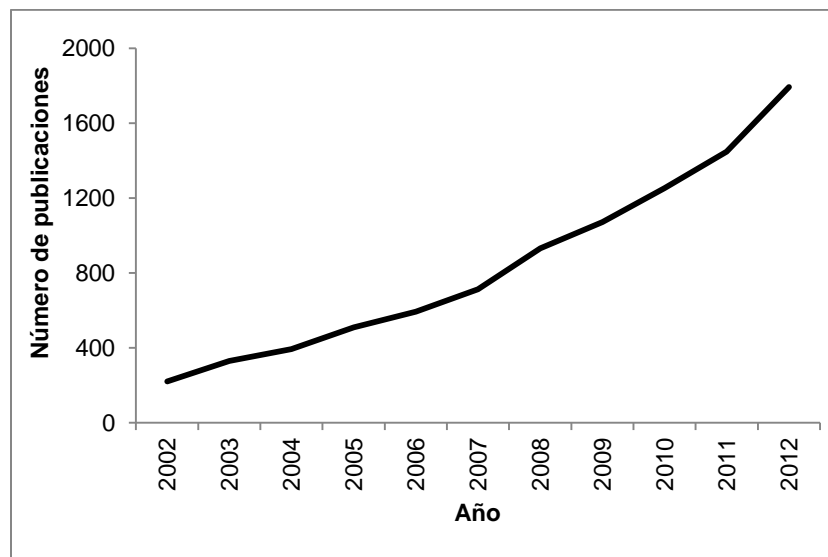


Figura 2 Evolución del número de publicaciones al año relacionadas a los términos de búsqueda *Curcumina*.

Fuente: Sciencedirect®. Fecha de consulta: Abril de 2013.

3. Curcumina

La curcumina se logró aislar e identificar por primera vez en el siglo XIX [10]. Junto con un grupo de compuestos, denominados curcuminoides, químicamente semejantes, forma parte del extracto químico activo de la *Curcuma longa* [11].

2.1 Extracción

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha definido que la curcumina para consumo humano y animal puede ser extraída de recursos naturales o ser producida a través de síntesis química mediante procesos específicos [11].

El proceso de extracción requiere la materia prima molida, la cual se lava con un solvente adecuado con el fin de extraer la oleoresina que contiene la curcumina y algunos otros aceites volátiles y extractos resinosos. Posteriormente se debe lavar con solventes que permitan la separación de la curcumina del resto de los componentes, para producir finalmente un polvo de color naranja vivo, la curcumina [11].

Además de la curcumina, como ya se mencionó anteriormente, el extracto de la *Curcuma longa* contiene: carbohidratos (4.7-8.2%), aceites esenciales (2.44%), ácidos grasos (1.7-3.3%), curcuminoides (curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina), cuyo contenido aproximado es de un 2%, aunque puede rondar entre 2.5-5.0% del peso seco, y otros polipéptidos como la turmerina (0.1 % del extracto seco) [4].

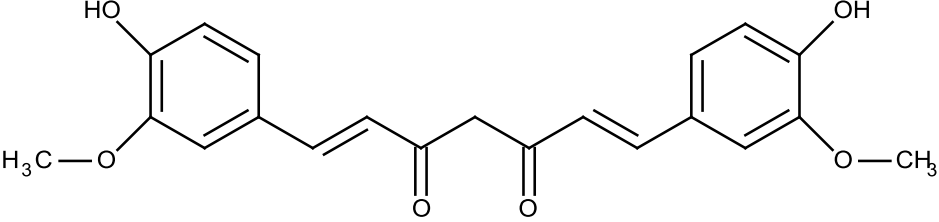
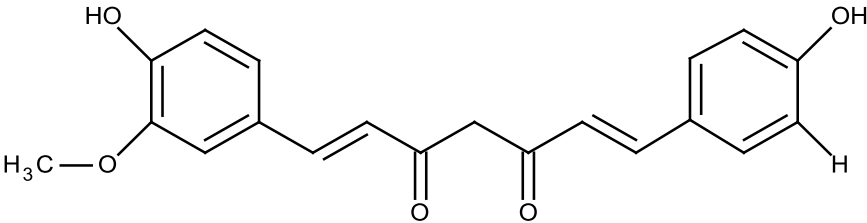
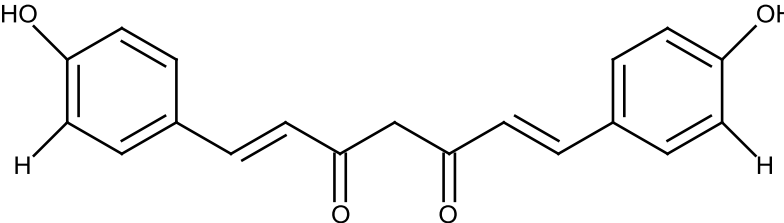
2.2 Estructura química y propiedades fisicoquímicas de la curcumina

El nombre sistemático, fórmula química condensada, número CAS y peso molecular de los tres principales componentes del extracto de *Curcuma longa* L. se muestran en la Tabla 1. La fórmula química desarrollada para cada uno de los compuestos se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1. Especificaciones químicas de los componentes del extracto de la *Curcuma Longa* [4, 11].

Nombre común	Nombre químico	Fórmula	CAS	MM (g/mol)
Curcumina	1,7-Bis-(4-hidroxifenil)-hepta-1,6-diene-3,5-diona	$C_{21}H_{20}O_6$	458-37-7	368
Demetoxicurcumina	1-(4-Hidroxifenil)-7-(4-hidroxifenil)-hepta-1,6-diene-3,5-diona	$C_{20}H_{18}O_5$	33171-16-3	338
Bis-demetoxicurcumina	1,7-Bis-(4-hidroxifenil)-hepta-1,6-diene-3,5-diona	$C_{19}H_{16}O_4$	33171-05-0	308

Tabla 2 Estructura química desarrollada de los curcuminoides de la *Curcuma longa*

Nombre común	Fórmula química desarrollada
Curcumina	
Demetoxicurcumina	
Bisdemetoxicurcumina a	

La Tabla 3 enlista las principales propiedades fisicoquímicas de la curcumina.

Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas de la curcumina. Se resumen las principales características de la curcumina de interés para el desarrollo farmacéutico.

Propiedad	Característica	Ref.
Aspecto	Polvo cristalino, color amarillo-naranja de tonalidad intensa e inodoro.	[11]
Solubilidad	Soluble en aceites. Completamente soluble en dimetilsulfoxido, acetona, etanol y cloroformo. Prácticamente insoluble en agua a pH ácido o neutro y soluble en medio alcalino.	[3]
Punto de fusión	Aproximadamente 183 °C.	[10]
Isomería	La curcumina, demetoxicurcumina y <i>bis</i> -demetoxicurcumina presentan dos isómeros geométricos, el isómero <i>cis-trans</i> y el isómero <i>trans-trans</i> . Desde el punto de vista fisicoquímico este último isómero geométrico tiene un menor punto de fusión y menor estabilidad en solución. En solución, los curcuminoides exhiben tautomerismo ceto-enol y, dependiendo del solvente, hasta el 95 por ciento está en la forma -enol (Figura 3).	[11]
Espectro UV-Visible	La longitud de onda de máxima absorción en soluciones acuosas o solventes orgánicos ocurre entre 420 nm- 430 nm (Figura 4).	[3, 12]
Comportamiento ácido-base	A pH menor a 1, las solución acuosa de curcumina es de color naranja, que indica la presencia de la forma protonada (H_4A^+). A pH de entre 1 y 7, la curcumina se encuentra en su forma neutra (H_3A). La solubilidad en agua es muy baja en este rango de pH y las soluciones que se obtienen son de color amarillo. Para la disociación de los tres protones ácidos en la curcumina (formas H_2A^- , HA^{2-} y A^{3-}) los valores de pKa son 7.8, 8.5 y 9 respectivamente. Por arriba de pH de 7.5, el color de las soluciones preparadas es rojo (Ver Figura 5)	[3, 11]
Estabilidad	La curcumina es estable a pH ácido. A pH por encima de la neutralidad se descompone rápidamente. Los curcuminoides no son estables a la luz, especialmente en solución.	[13, 14]
Productos de degradación	Los productos de la degradación en solución a pH alcalinos se forman en 5 minutos. Inicialmente se forman el ácido felúrico y el feruloilmetano. El feruloilmetano, se descompone para formar productos coloreados de descomposición (principalmente amarillo a café-amarillento). Los productos de degradación formados por la hidrólisis de feruloilmetano son la vainillina y acetona. Después de que es sometida a la irradiación de luz ultravioleta, se forma el producto de ciclación, así como los productos de descomposición como el ácido vanilínico, ácido ferúlico y acetona (Figura 6).	[11, 14]

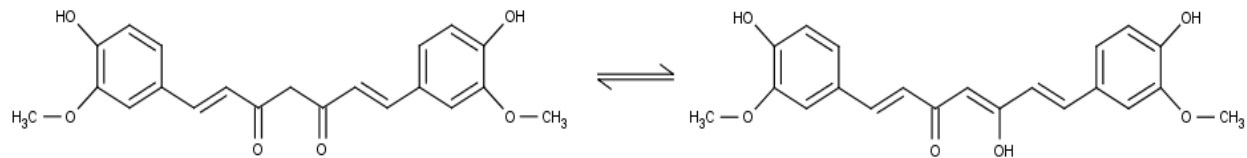


Figura 3 Ejemplo del tautomerismo típico ceto-enol de los curcuminoides.

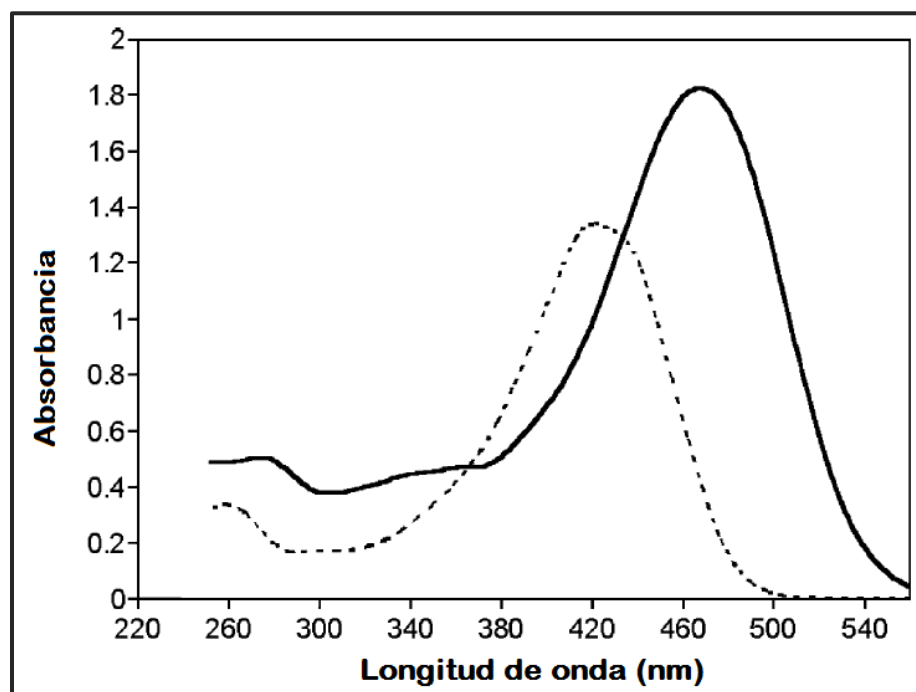


Figura 4 Espectro UV-Vis de la curcumina.

La línea continua se obtiene de una solución de curcumina $3.09 \times 10^{-5} \text{ M}$ en medio básico (NaOH 0.5 M).

La línea punteada se obtiene de una solución de curcumina $3.04 \times 10^{-5} \text{ M}$ en ácido acético glacial [12].

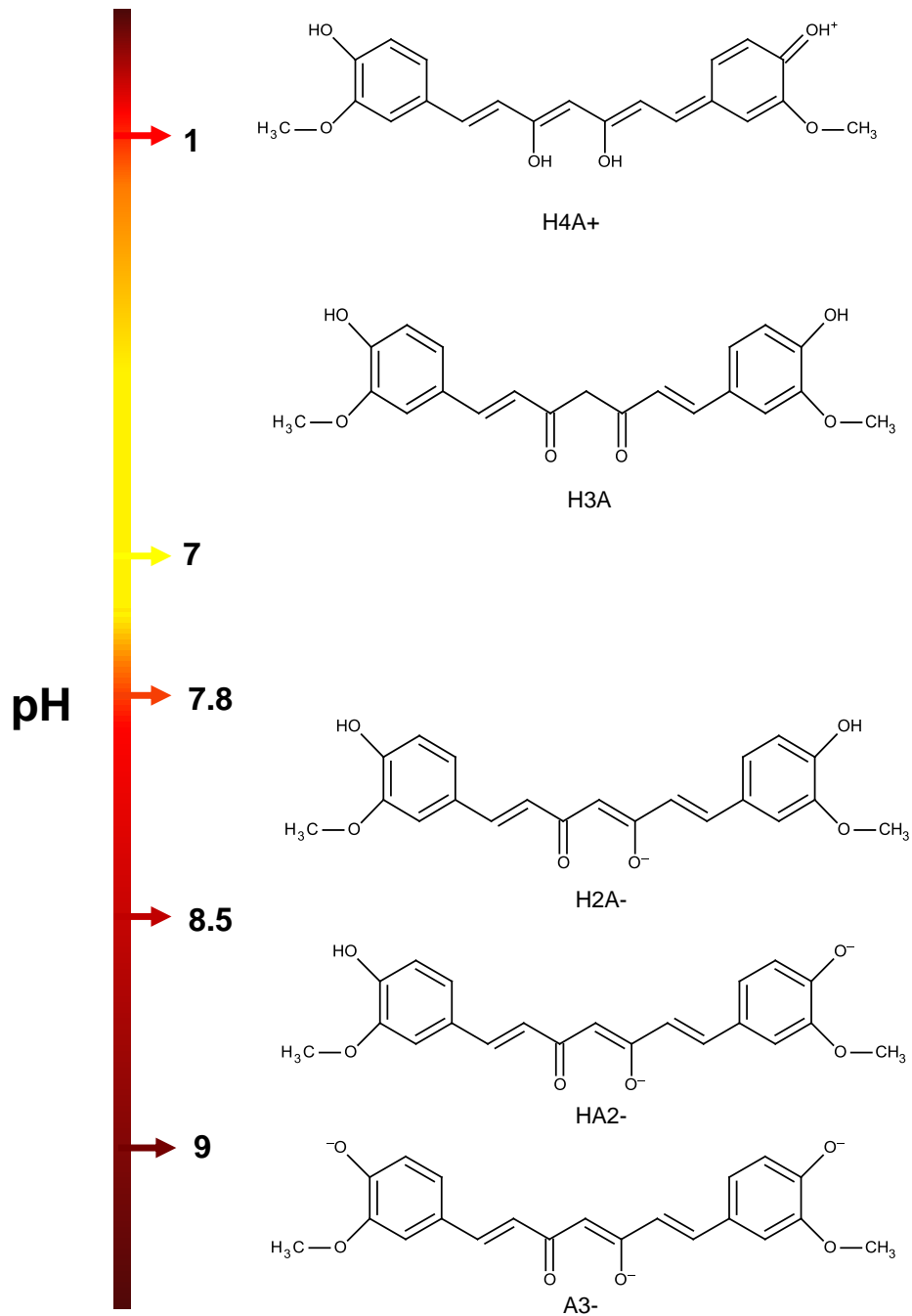


Figura 5 Comportamiento de la curcumina a diferente pH.

Se observa la forma ionizada de la curcumina presente a cada rango de pH según los valores de pKa [11].

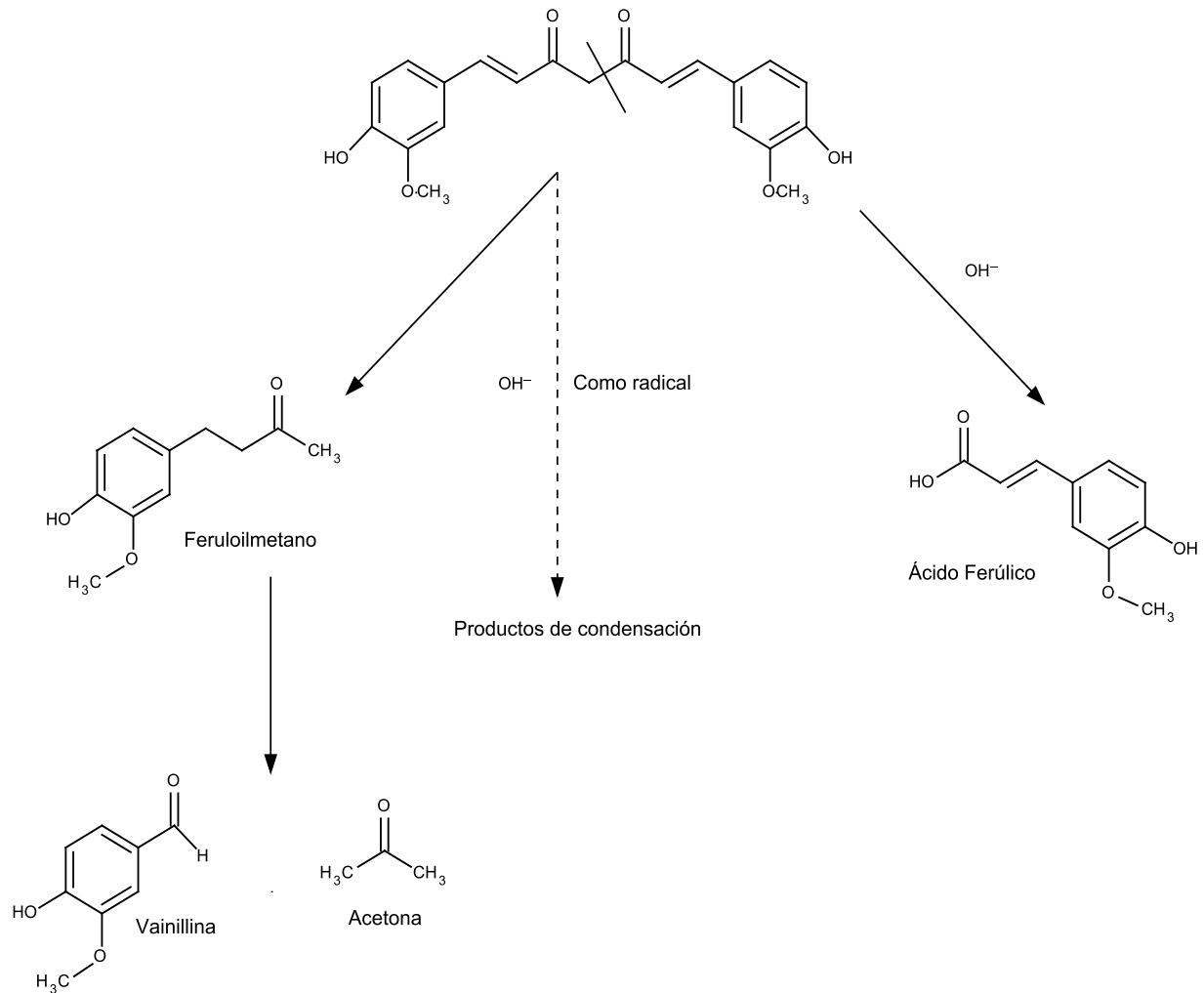


Figura 6 Ruta de degradación común de la curcumina hasta la obtención de vainillina y acetona [11].

2.3 Propiedades terapéuticas

Ampliamente conocidas por diferentes culturas ancestrales, son varias las propiedades terapéuticas descritas tanto para la *Curcuma* como para la curcumina (Figura 7). Hasta hace poco tiempo, muchas de estas propiedades o bien eran ignoradas o rechazadas por la ciencia y las farmacéuticas. No obstante, la reciente investigación ha comprobado la actividad de esta planta en diversas enfermedades, abriendo paso a estudios más extensos tanto *in vitro* como *in vivo* [1].

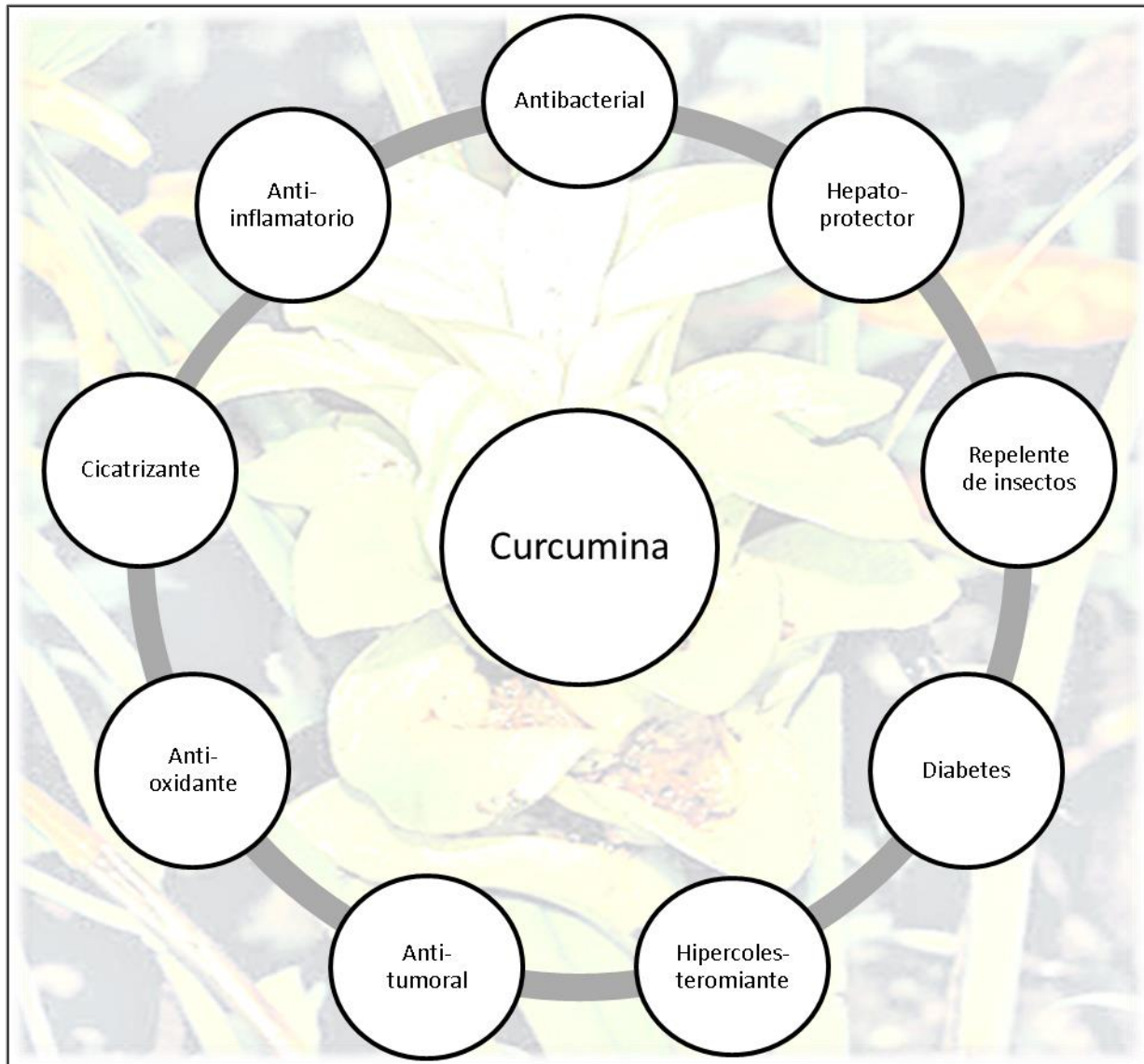


Figura 7 Resumen de propiedades terapéuticas de la curcumina [3].

Repelente de insectos

En un estudio realizado por Twatsin y col. [15] se demostró que los extractos oleosos de *Curcuma longa L.*, son efectivos para su uso como repelente de tres especies de mosquitos, ya sea solo o en combinación con vainillina, dando protección repelente por aproximadamente 1 hora el extracto solo; o hasta 4.5 horas en combinación con vainillina.

Propiedades antiinfecciosas

Son varios los trabajos que han demostrado la actividad antibacterial e incluso anti fúngica de la curcumina. El extracto alcohólico de la cúrcuma y la curcumina presenta actividad

antibacteriana *in vitro* contra bacterias *gram positivas* y *gram negativas*, debido a que tiene la capacidad de alterar el DNA en presencia de luz visible. La curcumina se ha usado también para el tratamiento de la infección causada por VIH, operando a través de dos mecanismos que comprenden la inhibición final de la expresión genética del virus VIH-1 y sobre la integrasa que interviene en la integración del RNA viral en la doble cadena de DNA cromosómico antes de la replicación del virus. Por otro lado, se ha demostrado que la curcumina es también efectiva en el tratamiento de infecciones micóticas causadas por diversos hongos y contra infecciones parasitarias [16-20].

Hepatoprotector

Una de las principales propiedades de la curcumina es su actividad hepatoprotectora, demostrada en diversos modelos animales frente a diferentes agentes hepatotóxicos; y también el aumento en la secreción de bilis [21].

En este sentido, se ha observado que el curcuminato de sodio disminuye la cantidad de sólidos en la bilis e incrementa la cantidad de sales biliares, bilirrubina y colesterol [4]. La curcumina induce la contracción de la vesícula biliar [22] y previene o revierte la formación de piedras de colesterol en la bilis de ratones [23].

Al enfrentarse con diferentes agentes hepatotóxicos, como la ciclofosfamida [24] o el tetracloruro de carbono, la curcumina ha demostrado tener un fuerte efecto hepatoprotector, reduciendo el daño hepático medido a través de marcadores séricos como la fosfatasa alcalina, bilirrubina y la aspartato aminotransferasa [25]. Este efecto hepatoprotector se extiende además a compuestos no necesariamente malignos, como algunos fármacos. La hepatotoxicidad originada por la administración de paracetamol en ratones, disminuye considerablemente tras un pre-tratamiento con curcumina [26]. Finalmente, se ha observado también que la *Curcuma Longa* ayuda a los sistemas de detoxificación del organismo responsable del tratamiento de xenobióticos además de presentar interesantes propiedades antioxidantes [27].

Antioxidante

Dentro de las principales causas del envejecimiento y la aparición de múltiples enfermedades, se encuentra el ataque a las células por parte de diferentes agentes químicos oxidantes. Dichos agentes, pueden tener su origen en el medio ambiente exterior o ser generados dentro de las células como productos metabólicos [28].

El daño que la oxidación produce en biomoléculas, como los ácidos grasos insaturados de la membrana celular y el DNA, por la unión covalente con electrófilos o a través de reacciones de óxido-reducción, provoca que estas pierdan su actividad biológica provocando la muerte celular por irrupción en el metabolismo [29]. Por ejemplo, el daño a membranas plasmáticas debido a la peroxidación lipídica produce un aumento en la concentración de calcio citosólico que puede activar proteasas, fosfolipasas y endonucleasas que rompen constituyentes celulares críticos, citoesqueleto, membranas plasmáticas y DNA, alterando el funcionamiento celular y provocando la muerte [4, 30].

Como se mencionó anteriormente, la curcumina presenta una importante actividad antioxidante, principalmente debida a su gran capacidad para remover especies reactivas del oxígeno, como los radicales hidroxilo [31], superóxido [32], el oxígeno singulete [33], el dióxido de nitrógeno y el óxido nítrico [34].

El hígado, debido a sus funciones de biotransformación de xenobióticos y sustancias tóxicas, y de metabolizar grasas, sufre del estrés oxidativo en mayor medida, incrementándose en este órgano el proceso de peroxidación lipídica, perjudicando su actividad. Al administrar curcumina por vía oral, se ha conseguido reducir el nivel de oxidación hepático, preservando en mayor grado la actividad hepática y la integridad de las membranas hepatocelulares [35, 36].

Otros padecimientos donde la peroxidación lipídica juega un papel importante, como las enfermedades neurológicas, vasculares y oculares, han conseguido ser controladas y tratadas tras la administración de curcumina [4].

Regeneración tisular

La regeneración tisular y la curación de heridas son procesos complejos que implican fenómenos de inflamación, granulación y remodelación de tejidos. Diversos estudios han demostrado las propiedades benéficas de la curcumina en procesos de reparación tisular, convirtiéndose en un efectivo tratamiento para este fin [37].

En este mismo contexto, la curcumina ha demostrado también ser un agente efectivo en la prevención y curación del cáncer de piel, demostrado en cultivos in vitro de este tipo de células,

inhibiendo los efectos de la oxidación por radicales libres en el DNA de la epidermis y modulando la expresión genética de protooncogenes¹ [38] inducidos por diferentes factores carcinogénicos [31]. Además, la curcumina inhibe a las ciclooxigenasas y lipooxigenasa epidérmicas disminuyendo la unión covalente del benzo(a)pireno, cancerígeno, al DNA epidérmico [39]. Basado en la información anterior, es posible pensar en la curcumina aplicada para el tratamiento de alteraciones de piel tales como infecciones bacterianas y virales [40].

Efecto antiinflamatorio

La *Curcuma longa*, se ha utilizado a lo largo de los años como un agente antiinflamatorio en la medicina tradicional oriental. Recientes descubrimientos han demostrado mediante su evaluación tanto *in vitro* como *in vivo* que esta actividad es debida a la presencia de la curcumina y demás derivados curcuminoides, como el curcuminato sódico, la diacetylcurcumina, trietil curcumina y la tetrahidrocurcumina [41].

Así mismo, se han obtenido a nivel clínico interesantes resultados; observándose una respuesta satisfactoria en pacientes con artritis reumatoide y osteoartritis después de la administración de la curcumina [42]. A diferencia de otros antiinflamatorios, la curcumina no da lugar a irritación gástrica, ni genera efectos en el sistema nervioso central [43].

El mecanismo de acción de los curcuminoides, se ha explicado mediante la modulación del metabolismo del ácido araquidónico, inhibiendo la actividad de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa, afectando la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos evitando el desarrollo de procesos inflamatorios y agregación plaquetaria [44, 45]. La curcumina, induce la actividad de las enzimas responsables de la detoxificación de productos de la peroxidación lipídica, glutatión transferasa y glutatión peroxidasa [46].

Efecto hipocolesteromiante

Tras la administración de curcumina en ratas con diabetes inducida por estreptomycin, se observó una mejora en el estado metabólico generado por la condición diabética en virtud de su influencia hipocolesterolemica y su naturaleza antioxidante, reduciendo los niveles de colesterol sanguíneo, triglicéridos y fosfolípidos [47]. Estos efectos se deben a un incremento

¹ Genes que codifican proteínas que estimulan el crecimiento y la división celular normal.

de la actividad de la enzima colesterol-7 α -hidroxilasa del hígado, disminuyendo la concentración biliar de este compuesto y de fosfolípidos [48].

Tratamiento de diabetes

Como es bien sabido, la diabetes es el resultado de múltiples procesos oxidativos que originan daños en el órgano responsable de la producción de insulina, el páncreas. Al administrar curcumina estos procesos oxidativos se ven reducidos considerablemente mejorando el dañado estado metabólico en la diabetes [49]. Además, se ha observado la disminución de las lesiones renales causadas por la diabetes y permite el tratamiento de estos desórdenes [50]. Además, como se mencionó anteriormente, ayuda en el proceso de sanación de heridas y la revascularización del área afectada [4, 51].

Antitumoral

El cáncer es en la actualidad, al igual que las enfermedades metabólicas, una de las principales causas de muerte a nivel mundial [52], atrayendo gran cantidad de recursos a su estudio y tratamiento. El llamado oro hindú, ha demostrado una interesante actividad antiproliferativa, antitumoral y anticancerosa [4] debida principalmente a su efecto antioxidante pero aunado con otra serie de mecanismos por demás interesantes, como la inducción de la apoptosis celular [53].

La curcumina, en combinación con otros agentes antitumorales, posee un efecto sinérgico sobre estos, obteniéndose inclusive recuperaciones casi totales en pruebas *in vivo* [54]. La curcumina es efectiva en el tratamiento de tumores de colon además de poseer propiedades citoprotectoras y quimioprotectoras [55].

2.4 Farmacocinética de la curcumina

El proceso ADME de la curcumina se ha estudiado arduamente en los últimos años, concluyéndose su inminente baja biodisponibilidad [56]. En este sentido se sabe, que las razones de una reducida biodisponibilidad después de la administración de curcumina por vía oral pueden ser principalmente una mala absorción, siendo probablemente la solubilidad de la molécula en cuestión su principal limitante; rápida biotransformación, inactivación de productos metabólicos y la rápida excreción del activo o los metabolitos de éste.

Absorción

Los estudios hechos con curcumina revelan que ésta se absorbe escasamente cuando se administra por vía oral (aproximadamente 60%) y es rápidamente biotransformada, lo que impide que la molécula activa alcance el torrente sanguíneo y sea cuantificable en plasma [56, 57].

Esto se ha verificado en diferentes estudios. Por ejemplo, tras ser administrados por vía oral 2 g/Kg de peso de curcumina a ratas de laboratorio, se observó una concentración máxima en plasma de apenas $1.35 \pm 0.23 \mu\text{g/ml}$ después de 0.83 horas [56]. Otros estudios demuestran comportamientos similares, como el realizado por Pan y col. [58], en el cual se administró curcumina vía oral e intraperitoneal a ratones hembra BALB/c y se monitoreó su distribución, observándose que cuando se administraba por vía oral (1.0 g/Kg), en forma de emulsión de curcumina en 2.5% de carboximetilcelulosa, la curcumina pudo ser detectada en plasma después de 15 minutos ($0.13 \mu\text{g/ml}$), alcanzando su concentración máxima después de 1 hora ($0.22 \mu\text{g/ml}$) y disminuyendo posteriormente hasta $< 5 \text{ ng/ml}$ después de 6 horas (Figura 8).

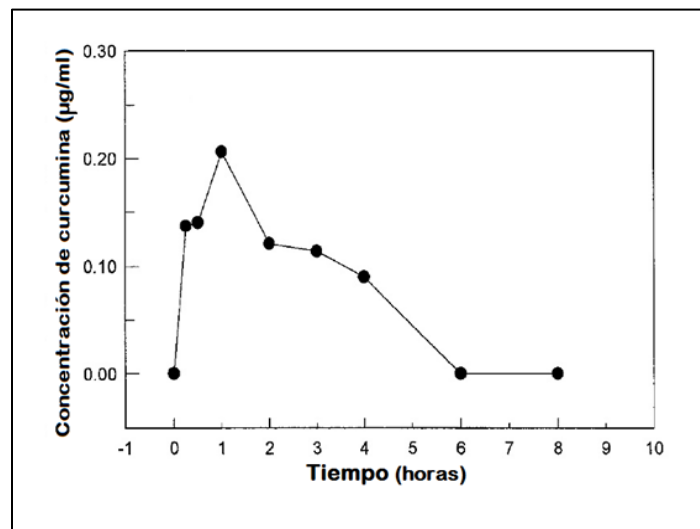


Figura 8 Evolución de la concentración de curcumina en plasma de ratón después de una dosis única por vía oral (1g/Kg) [58].

Se ha observado que después de administrar curcumina por vía intraperitoneal (0.1 g/kg) la concentración máxima en sangre (C_{max}) se alcanzó a los 15 minutos (alrededor de $2.25 \mu\text{g/ml}$) eliminándose rápidamente en 1 hora (Figura 9) [58].

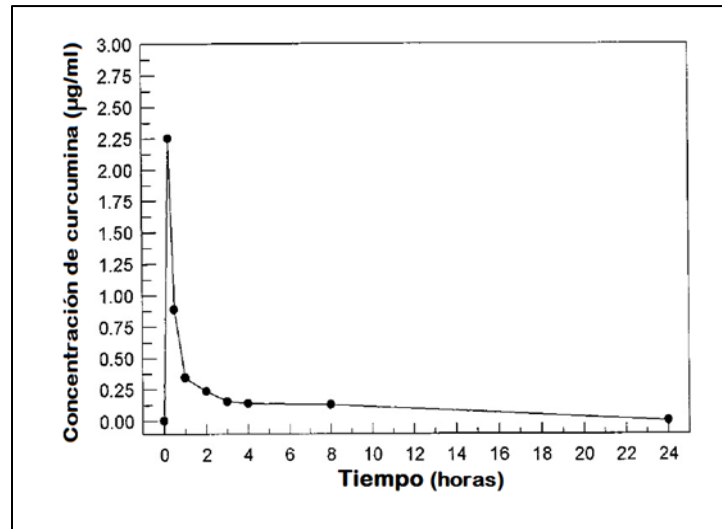


Figura 9 Evolución de la concentración de curcumina en plasma de ratón después de una dosis única por vía intraperitoneal (0.1 g/Kg) [58].

Distribución

El comportamiento en la distribución en tejidos es un parámetro clave en la actividad biológica de una molécula activa. Sin embargo, hasta el momento es poca la información que se tiene sobre la curcumina en este sentido. A pesar de su pobre biodisponibilidad, se sabe que sus principales órganos de acumulación, tras una administración parenteral son sangre, hígado y riñones (Tabla 4) [56].

Tabla 4 Distribución de curcumina en tejidos después de la administración intraperitoneal en ratón. Para los experimentos de administración por vía intraperitoneal la curcumina se disolvió en dimetilsulfoxido y fue administrada a los ratones en una dosis de 4 ml/Kg (0.1 g/Kg) por vía intraperitoneal [58].

Muestra o Tejido	Concentración de curcumina (µg/g)	Curcumina en tejido (µg/total órgano)
Plasma	0.60 ± 0.03	0.52 ± 0.03
Riñones	7.51 ± 0.08	3.00 ± 0.03
Bazo	26.06 ± 1.06	2.61 ± 0.11
Hígado	26.90 ± 2.58	33.09 ± 3.17
Cerebro	0.41 ± 0.01	0.18 ± 0.01
Intestino	117.04 ± 6.86	319.52 ± 18.73

Biotransformación

Una tercera parte de la dosis administrada de curcumina es excretada del organismo sin cambio alguno. Sin embargo, la cantidad metabolizada es de consideración, los principales metabolitos reportados son conjugados del ácido glucurónico de tetrahidrocurcumina y hexahidrocurcumina, y sulfatos de curcumina y hexahidrocurcuminol (Figura 10) [57, 58].

Existe evidencia que soporta la hipótesis que indica que la curcumina sufre biotransformación durante la absorción en el tracto gastrointestinal y la circulación enterohepática [57].

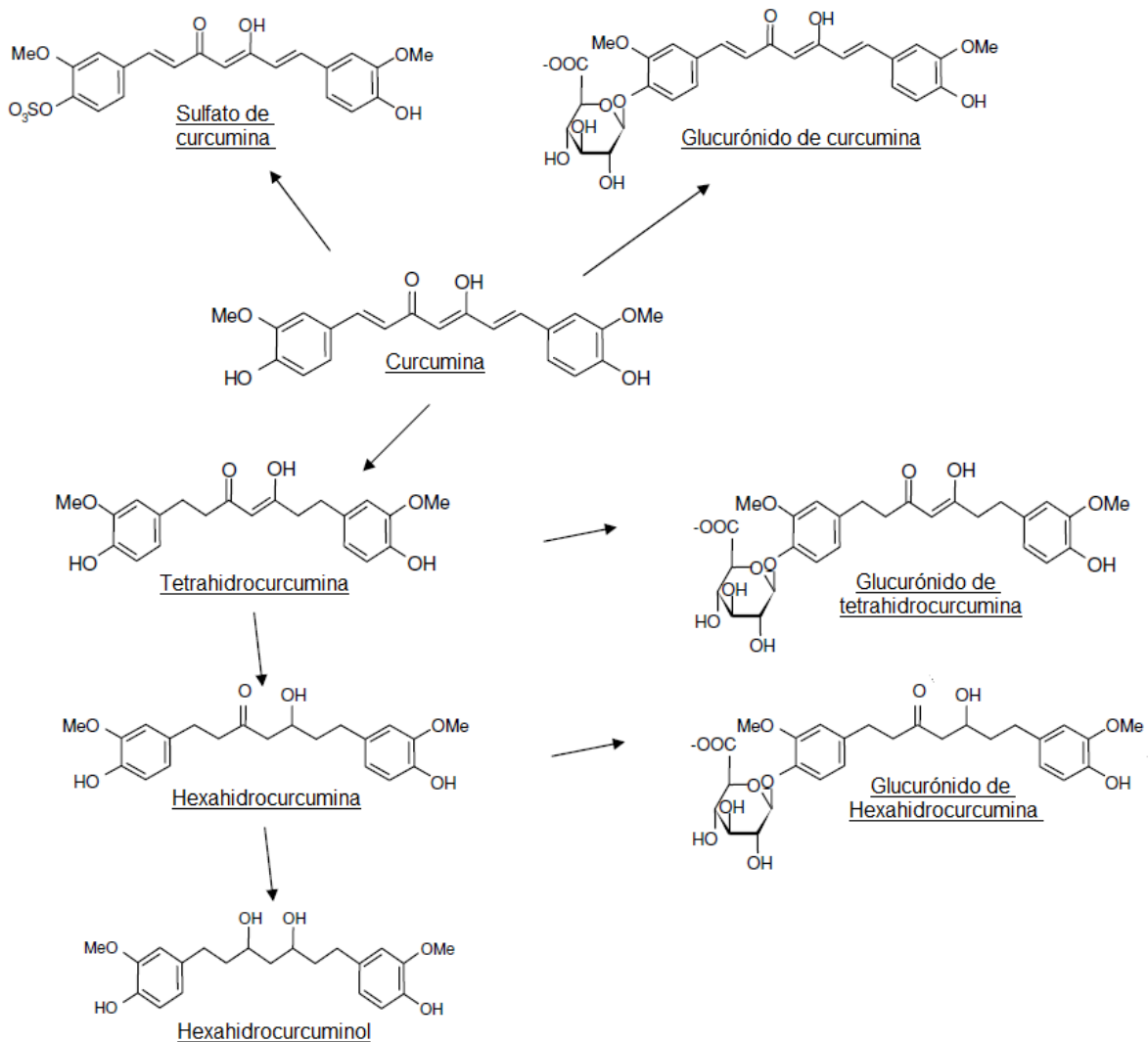


Figura 10 Principales metabolitos de curcumina encontrados en humano y ratón [57, 58].

Eliminación

La mayor cantidad de curcumina o metabolitos de la misma tras su administración oral es eliminada a través de las heces, mientras que, después de una administración parenteral la mayor parte de la curcumina se excreta por la bilis, ya sea en su forma inalterada o en cualquiera de sus metabolitos [57].

Así pues, al igual que muchos fármacos con problemas de biodisponibilidad, la curcumina ha sido el objeto de una fuerte investigación tecnológica para mejorar este ámbito, teniendo en consideración que el factor limitante en el caso de la curcumina es su solubilidad, que condiciona en gran medida una formulación eficaz de dicho activo. Numerosas son las estrategias tecnológicas que han buscado un aumento en la solubilidad de la curcumina, estas van desde el uso de solventes, cosolventes o tensoactivos, hasta el procesamiento mediante tecnología por demás sofisticada, como la obtención de pellets autoemulsificables [59] o su asociación a sistemas coloidales [60-62].

Dentro de estas estrategias de solubilización, destaca el enorme esfuerzo que ha implementado la nanotecnología para satisfacer los requerimientos, tanto de solubilidad [63] cómo de permeabilidad de moléculas con problemas de formulación en formas farmacéuticas convencionales, especialmente de macromoléculas y moléculas poco solubles en agua [64].

3. Nanotecnología en Farmacia. Nanomedicina.

La nanotecnología, es un área multidisciplinaria que involucra el esfuerzo de la ingeniería, la química, la medicina, la biología y la tecnología farmacéutica para modelar, manipular y medir la materia a escala nanométrica, es decir entre 1 y 1000 nm (10^{-9} m), principalmente para la obtención de sistemas coloidales con potencial aplicación preventiva, diagnóstica y terapéutica.

A la aplicación de la nanotecnología a la medicina y la farmacia se le ha bautizado con el nombre de nanomedicina, la cual podría definirse como una rama de las ciencias y tecnologías de la salud que aplica los conocimientos de la nanotecnología a la medicina humana y veterinaria ofreciendo nuevos métodos y herramientas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades o lesiones traumáticas, con el fin de preservar y/o mejorar la salud y aliviar el dolor [65, 66]. Es de vital importancia mencionar que tanto la nanotecnología como la nanomedicina son siempre áreas multidisciplinarias del conocimiento.

A lo largo de la historia, se han desarrollado nuevas y mejores estrategias en la administración y vehiculización, o entrega de fármacos. En la actualidad, durante el diseño de una formulación farmacéutica se busca, principalmente, que los nuevos sistemas mejoren las propiedades biofarmacéuticas del agente farmacológico controlando su liberación en un sitio de acción específico a una velocidad óptima, tratando de disminuir al máximo la posibilidad de reacciones adversas [67].

En general, los principales objetivos de los sistemas nanotecnológicos pueden englobarse de la siguiente manera [68]:

1. Proteger al fármaco de la degradación a causa de enzimas o del ambiente.
2. Aumentar la absorción de los fármacos, facilitando su permeabilidad por difusión a través del epitelio.
3. Modificar el perfil farmacocinético del fármaco.
4. Mejorar la penetración y distribución intracelular, en búsqueda de terapias más efectivas.
5. Mejorar el desempeño de las técnicas de imagen y diagnóstico, implementando sistemas a escala celular o inclusive molecular.

Algunas de las premisas en el desarrollo de sistemas a este nivel plantean que los nuevos acarreadores de fármacos sean estables, de fácil administración, transporten al fármaco al sitio diana, liberación a una velocidad adecuada, que sean biodegradables y no tóxicos [69].

Diversas son las nuevas formas farmacéuticas que han surgido a la luz gracias al gran avance de los últimos años a nivel nanotecnológico. Sin embargo, los más comunes y más estudiados a la fecha pueden enlistarse en nanopartículas, nanocápsulas, nanocristales, dendrímeros, micelas poliméricas y liposomas.

3.1 Nanocristales

Los nanocristales son estructuras compuestas por arreglos moleculares de fármaco libre y surfactante(s) para su estabilización que presentan un tamaño de partícula promedio de entre 10 y 1000 nm. Generalmente se encuentran dispersos en medio acuoso, por lo que también reciben el nombre de “nanosuspensiones” [70]. En la figura 11 se muestra una imagen obtenida por microscopia de barrido de un fármaco formulado en una nanosuspensión. Aunque, en su definición más exacta, no son sistemas nanoparticulados, la estrategia de disminución y

estabilización de estos arreglos moleculares los hace por demás interesantes para su aplicación tecnológica.

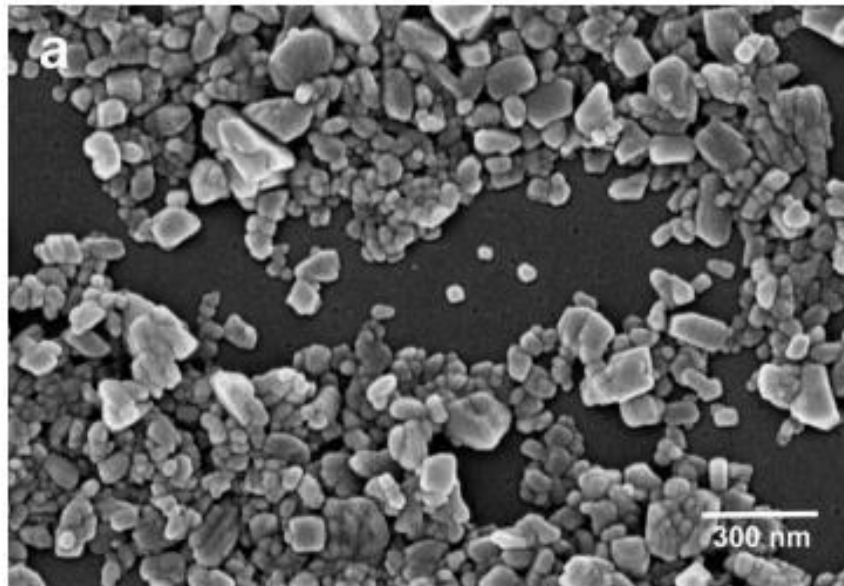


Figura 11 Imagen de microscopio de barrido de un compuesto A ($MW = 469 \text{ g/mol}$) formulado en una nanosuspension [71].

La preparación de nanocristales es de particular interés cuando se trata de formular fármacos con una muy baja solubilidad en agua, clases II y IV BCS, no siendo esta situación un hecho trivial, debido a que en la actualidad un elevado porcentaje de nuevas moléculas desarrolladas con objetivo terapéutico son pobremente solubles en agua condicionando el desempeño del fármaco y la formulación. La estrategia más común hasta la fecha adoptada es el uso de cantidades excesivas de tensoactivos y cosolventes que finalmente pueden resultar tóxicos para el paciente[63, 68].

La preparación de nanocristales conduce a un incremento del área superficial y como consecuencia, y de acuerdo a la ecuación de Noyes-Withney, un incremento en la velocidad de disolución. Este hecho hace que la determinación de la dosificación sea más exacta, mejora la absorción oral de los fármacos y da lugar a una mayor biodisponibilidad [68, 72].

$$\frac{dC}{dt} = KS(c_s - c_t)$$

Ecuación 1 Ecuación de Noyes-Withney

Donde dC/dt se refiere a la velocidad de disolución del fármaco, K a la constante de proporcionalidad, S al área superficial de fármaco expuesto al medio de disolución, C_s a la concentración de saturación, C_t a la concentración en el tiempo t y $(C_s - C_t)$ al gradiente de concentración.

Las estrategias de producción de nanocristales se pueden clasificar en *bottom-up*, que implica la formación de nanocristales por precipitación en una mezcla de solventes; *top-down* que incluye el uso de molinos y homogenización a alta presión para la formación de nanocristales o una combinación de ambos que con ayuda de agentes de superficie estabilizan el sistema [68, 72].

3.2 Liposomas

Los liposomas, representados en la Figura 12, son estructuras esféricas formadas por bicapas de fosfolípidos y colesterol que contienen en su interior un espacio acuoso separado del resto del medio, también acuoso en que se encuentran suspendidos. Esta cualidad les proporciona la capacidad de incorporar sustancias hidrófilas (en el interior acuoso) o hidrófobas (en la membrana lipídica). El número de bicapas presentes en cada sistema liposomal es dependiente del tipo de componentes empleados en su formulación y del proceso llevado a cabo para su obtención.

Existen diferentes tipos de liposomas que se agrupan de acuerdo a su tamaño o al número o tipo y características de las capas de las que están formados. Una clasificación muy general es la siguiente [73]:

- Vesículas multilamelares (MLVs): consisten de varias bicapas lipídicas con un rango de tamaño de entre 500 a 5,000 nm.
- Vesículas pequeñas unilamelares (SUVs): formados por una sola bicapa lipídica con un tamaño promedio alrededor de 100 nm.
- Vesículas grandes unilamelares (LUVs) formados por una sola bicapa lipídica con un tamaño de entre 200 a 800 nm.
- Liposomas de larga circulación: liposomas modificados en su superficie, generalmente con polímeros hidrofílicos, que pueden estar en la sangre mucho más tiempo (horas).
- Inmunoliposomas: liposomas que cargan anticuerpos en sus superficies y son capaces de acumularse en un área específica del cuerpo donde su anticuerpo reconoce y se une a su antígeno.

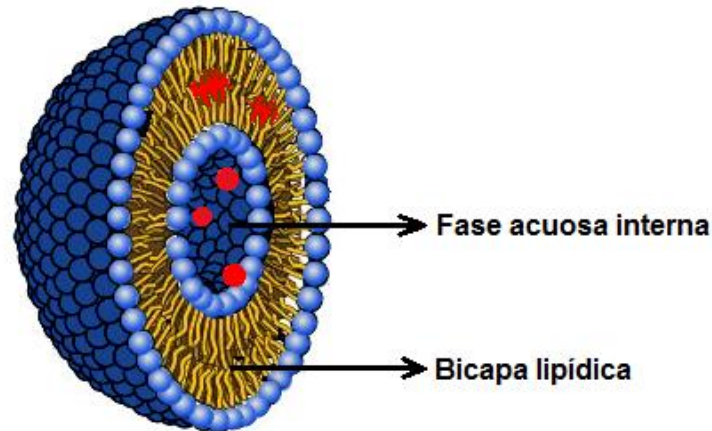


Figura 12 Representación gráfica de una estructura de un liposoma.

En la figura se observa la doble capa de fosfolípidos con un espacio interior acuoso para incorporar fármacos hidrófilos; mientras que la bicapa lipídica incorpora fármacos hidrófobos (ambos representados en rojo dentro de la figura).

Las principales ventajas del uso de liposomas son: [73]

- Alta biocompatibilidad.
- Capacidad de asociación de fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos.
- Aumento en la seguridad de tratamientos y mejora farmacológica.
- Capacidad de vehiculización de los fármacos asociados.
- Amplia versatilidad en su composición para permitir cumplir con diversos fines farmacológicos.

3.3 Micelas poliméricas

Las micelas poliméricas son nanoestructuras formadas por el auto-ensamblado de polímeros anfífilos en agua, generalmente como resultado de interacciones hidrofóbicas o interacciones iónicas de segmentos de polímeros por encima de la llamada concentración micelar crítica (CMC). Las micelas poliméricas están compuestas por una zona interna llamada “núcleo” y una zona externa, o cubierta, con un tamaño menor a los 100 nm (Figura 13) [68, 74].

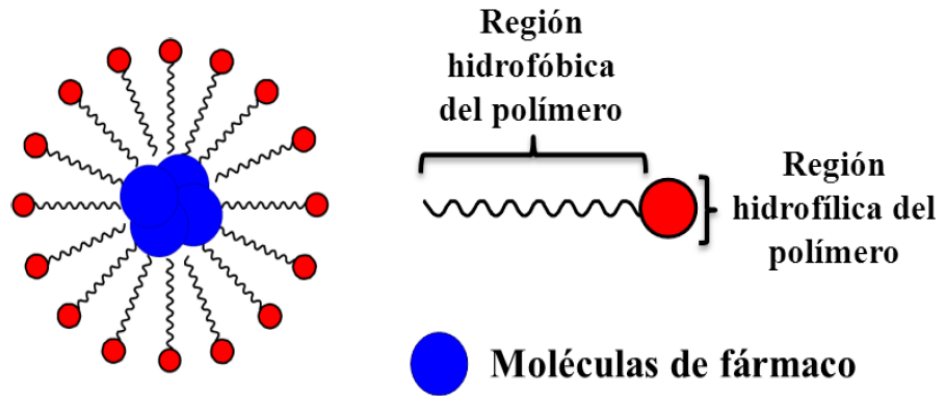


Figura 13 Representación gráfica de la estructura de una micela polimérica.

Se representan los componentes de una micela polimérica. En azul las moléculas de fármaco al interior de la micela polimérica. En rojo la región hidrofílica del polímero que forma la micela [75].

De manera general, las micelas poliméricas son más estables que las micelas preparadas con detergentes convencionales. Además, se ha observado que poseen una serie de ventajas como vehículo para fármacos de baja solubilidad. Las micelas formadas por polímeros lineales tienden a precipitar en agua debido a una hidrofobicidad localizada causada por las interacciones entre el fármaco poco soluble y la parte hidrofoba de la cadena del polímero. Las micelas poliméricas con estructura de características “núcleo-cubierta” son más estables en agua debido a que protegen el núcleo hidrófobo del agua con la cubierta hidrofílica [68].

En la obtención de las micelas poliméricas, un parámetro crítico es su concentración crítica de asociación, definida como el umbral de concentración para asociarse y formarse. Debido al valor tan bajo que adquiere este parámetro (10^{-6} - 10^{-10} M), no requiere dilución tras la administración intravenosa, a diferencia de otros tensoactivos. Además, se disocia mediante una cinética lenta dando tiempo a que las micelas pueden circular hasta acumularse en los tejidos diana [76].

Las micelas poliméricas como ventajas tienen un tamaño apropiado para aumentar el tiempo de vida media de circulación en sangre, son inertes a la unión con los componentes biológicos, poseen alta solubilidad en agua, alta estabilidad estructural, gran capacidad de acarreamiento de fármacos hidrófobos, iónicos o incluso nucleótidos y funcionalidad para almacenar fármacos en las capas interna y externa [68, 74].

3.4 Dendrimeros

Los dendrimeros son macromoléculas monodispersas que combinan una serie de características únicas, incluyendo su estructura hiper-ramificada y tridimensional bien definida, baja poli dispersión (relativa) y una amplia funcionalidad [68].

Los dendrimeros poseen tres componentes que se distinguen en su arquitectura, los cuales reciben el nombre de (a) núcleo iniciador; (b) capas interiores compuestas de unidades de la ramificación que se repiten y reciben el nombre de generaciones y (c) el exterior donde se encuentran los grupos terminales (Figura 14). Estos grupos pueden ser cambiados para modificar su solubilidad, la miscibilidad y reactividad [68, 77].

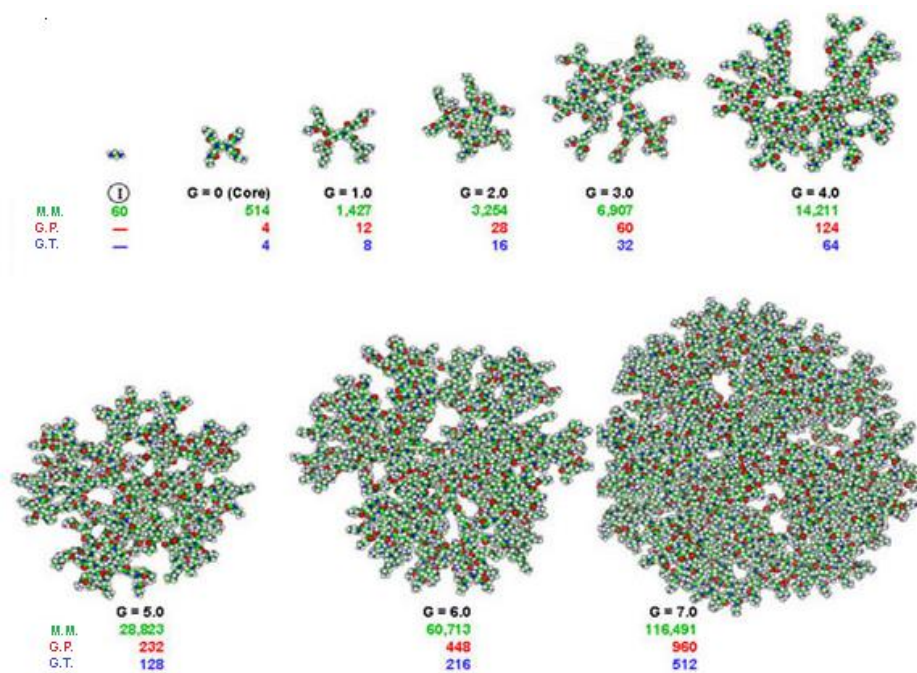


Figura 14 Representación gráfica de la estructura de un dendrímtero.

En la figura se observa un dendrímtero Poli (amidoamina) (PAMAM) con núcleo de etilendiamina. Las abreviaciones M.M. corresponde a la masa molecular del dendrímtero, G.P. al grado de polimerización y G.T. al número de grupos terminales. Se indica también el número de generaciones de cada dendrímtero [78].

Los dendrimeros se usan principalmente para la vectorización de fármacos o incluso como fármacos *per se*. Para hacer uso de estos sistemas transportadores de fármacos se deben tomar en cuenta el tipo de interacciones que habrá entre la molécula activa y la estructura dendrítica que pueden ser el atrapamiento del fármaco en el interior de la estructura dendrítica,

mediante interacciones electrostáticas, hidrófobas o por puentes de hidrogeno o la interacción entre el fármaco y la superficie del dendrímero [76].

3.5 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas (Figura 15) se pueden definir como dispersiones de partículas coloidales o sistemas sólidos, de tamaños submicrónico (10-1000 nm), constituidas de materiales poliméricos biodegradables o no biodegradables, aunque estos últimos han sido sustituidos rápidamente por los primeros. Estos sistemas pueden ser empleados terapéuticamente como vehículos, donde el fármaco o material biológicamente activo se disuelve, atrapa, encapsula, adsorbe o une [68, 74].

El término nanopartícula hace referencia a dos formas farmacéuticas muy diferentes entre sí, las nanoesferas comúnmente llamadas simplemente nanopartículas, y las nanocápsulas. La obtención de cualquiera de estos dos sistemas depende del método de preparación empleado y el tipo de excipientes empleados para su fabricación [68]. Las nanocápsulas son sistemas de tipo reservorio con un núcleo líquido, acuoso u oleoso, en el cual el fármaco se encuentra disuelto rodeado por una cubierta polimérica. Por otra parte, las nanoesferas son matrices poliméricas sólidas que consisten de agregados moleculares unidos por distintos tipos de fuerzas en los que el fármaco se encuentra disperso [79].

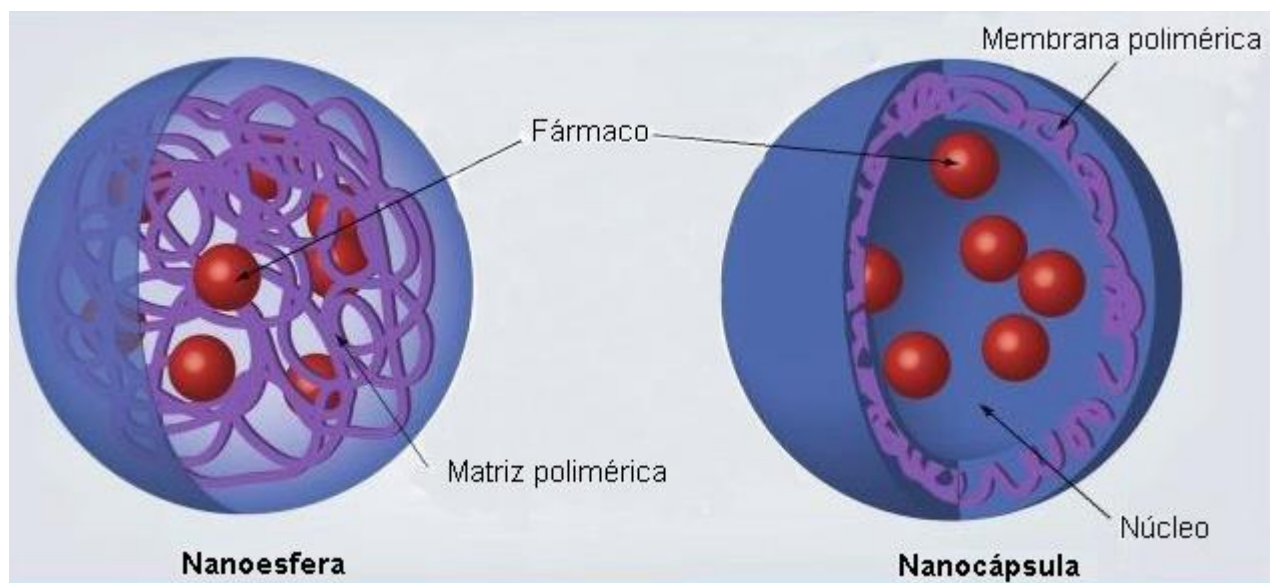


Figura 15 Representación gráfica de la estructura de nano partículas poliméricas.

Del lado izquierdo, la representación esquemática de una nanoesfera; las moléculas de fármaco representadas por esferas rojas se encuentran embebidas en la matriz polimérica representada por la

línea color violeta. De lado derecho, la representación esquemática de una nanocápsula, las moléculas de fármaco dentro del núcleo oleoso o acuoso, recubierto por una membrana polimérica. [80].

Dentro de las grandes ventajas de las nanopartículas poliméricas se encuentran su versatilidad para la administración por diversas vías, debido a que presentan alta estabilidad cuando entran en contacto con fluidos biológicos y su naturaleza permite la liberación controlada de fármacos. En consecuencia, han atraído la atención de los investigadores debido a su potencial como dispositivos de liberación de fármacos, como vehículos de fármacos a tejidos en particular, sistemas acarreadores de DNA o RNA en terapia génica, y la capacidad de liberar fármacos lipofílicos, proteínas, péptidos y genes [68].

Las principales ventajas de las nanocápsulas son [79]:

- a) Incrementan la capacidad de carga de fármaco, si el material con el cual se ha hecho el núcleo es un buen disolvente del fármaco en cuestión.
- b) Impide que el fármaco este en contacto directo con los tejidos evitando de esta manera la irritación del área en el cual se administran.
- c) Impide que el fármaco tenga contacto con el medio circundante, durante el almacenamiento o administración, evitando con esto que se lleven a cabo procesos de degradación del fármaco.

Debido a la baja solubilidad de la curcumina en medio acuoso se requiere emplear un sistema que tenga la capacidad de almacenar fármacos hidrófobos. Las nanocápsulas debido a su relativa facilidad de preparación y amplia capacidad de carga de fármacos han sido el sistema seleccionado para el desarrollo de este proyecto. A continuación se consideran algunos de los factores a considerar para la selección de los principales métodos de preparación de nanocápsulas.

4. Preparación de nanocápsulas

Se han desarrollado diversos métodos de preparación de nanocápsulas poliméricas, los cuales pueden clasificarse en dos principales categorías de acuerdo a la naturaleza del polímero que forma parte de la estructura de la nanopartículas. Para la preparación de nanopartículas puede emplearse polímeros preformados o los polímeros sintetizados *in situ* [68, 81].

La mayoría de estos métodos incluyen dos pasos principales. El primer paso consiste en la preparación de un sistema disperso o emulsificado para posteriormente precipitar o llevar a cabo la gelificación de polímeros o polimerización de monómeros.

Algunos otros métodos no requieren la preparación previa de una emulsión para la obtención de nanopartículas sino que están basados en la precipitación de un polímero en condiciones de formación espontánea tras su dispersión o gracias al autoensamblaje de macromoléculas para formar nanogeles o complejos poli electrolíticos de una solución polimérica [68, 79].

La Tabla 5 muestra un análisis comparativo de los principales métodos de nanoencapsulación.

Tabla 5 Análisis comparativo de los criterios sugeridos para la selección de un método de nano-encapsulación [78].

Criterio	Nano-precipitación	Emulsión-difusión	Doble emulsión	Emulsión-coacervación	Cubierta polimérica	Capa por capa
Naturaleza del principio activo	Núcleo oleoso: lipófilo	Núcleo oleoso: Lipófilo Núcleo acuoso: hidrófilo	Núcleo acuoso: hidrófilo Núcleo sólido: solido	Núcleo oleoso: lipófilo	Núcleo oleoso: lipófilo	Núcleo oleoso: lipófilo Núcleo solido: solido
Estabilidad de la sustancia activa	Alto	Alto	Las proteínas pueden desnaturalizarse	Alto	Alto	Alto
Naturaleza del solvente*	Clase 3	Clase 3	Clase 3/Clase 2	Clase 3	Clase 3	No se requieren
Consumo de agua	Moderado	Alto	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado
Factibilidad del método	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Generación de contaminantes	Bajo	Bajo	Bajo	Moderado	Bajo	Bajo
Pasos de purificación	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Moderado	Moderado
Tiempo requerido para la obtención	Alto	Moderado	Bajo	Moderado	Sin referencia disponible	Sin referencia disponible

*Ver Anexo B

Una vez que los sistemas son obtenidos pueden ser necesarios algunos otros pasos como:

Concentración. Generalmente, las nanocápsulas se producen con bajas concentraciones de fármaco, lo cual, es una seria desventaja cuando el objetivo es lograr concentraciones terapéuticas [79].

Purificación. Las dispersiones de nanocápsulas iniciales obtenidas de polímeros preformados pueden estar contaminadas con solventes, sales, estabilizantes, agentes de *cross-linking* o agentes patógenos que deben ser eliminados de manera que pueda asegurarse que tienen la pureza requerida para la administración *In vivo*. Por ejemplo, la filtración de flujo tangencial, filtración por centrifugación o ultra-centrifugación; son procesos de esterilización para nano partículas que se pretendan administrar por vía parenteral u oftálmica donde se emplea la filtración antes de ser colocadas en el contenedor principal o radiación gamma cuando ya han sido envasadas [68, 79].

Finalmente se pueden emplear técnicas como la *liofilización* con el objeto de aumentar la estabilidad, facilitar su manipulación, transporte o almacenamiento [79].

4.1 Consideraciones generales para la caracterización de nanopartículas

Al igual que con cualquier otra forma de dosificación de fármacos, se hace necesario realizar estudios de caracterización de las nanopartículas con la finalidad de dar una descripción física y química completa de estas; de manera que se pueda asegurar que el producto final del proceso de preparación de nanopartículas tenga siempre las mismas características y se supone el mismo comportamiento de liberación.

La caracterización de las nanopartículas es complicada debido al tamaño y la compleja composición de los sistemas, algunos con hasta 5 componentes. Las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas depende de diferentes factores entre los que se encuentran la naturaleza química y la concentración del polímero, la naturaleza química del fármaco encapsulado, la tensión interfacial y viscosidad del aceite, la naturaleza química y la cantidad de tensoactivos, la proporción de solvente orgánico y agua, la concentración de aceite en la solución orgánica y la velocidad de difusión de la fase orgánica en la fase acuosa [82].

Se han desarrollado diferentes técnicas de caracterización de nanopartículas, considerando sistemas de diferentes naturalezas y la información requerida para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

La Tabla 6 muestra las técnicas más utilizadas en la caracterización de nanopartículas.

Tabla 6 Técnicas aplicadas a la caracterización básica de nanopartículas.

Característica	Técnicas empleadas	Ref.
Morfología	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	[82, 83]
	Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	
	Microscopia de fuerza atómica (AFM)	
Tamaño y distribución de tamaño de partícula	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	[82, 83]
	Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	
	Microscopia de fuerza atómica (AFM)	
	Laser Diffraction	
	Dynamic Light Scattering (DLS)	
Carga eléctrica superficial (Potencial ζ)	Movilidad electroforética	[84, 85]
	Laser Doppler Velocimetry	

Para la adecuada selección de una técnica de caracterización se debe considerar el requerimiento y costo del proceso de caracterización, el tiempo requerido para llevar a cabo la prueba y evaluar el costo/beneficio de ésta.

Un factor limitante para la elección de una técnica es la cantidad de muestra que se tiene disponible para el análisis, el estado físico de la muestra y la composición de esta, debido a la necesidad, en ocasiones, de un pre-tratamiento de la misma [83].

5. Mucoadhesión y polímeros mucoadhesivos

Actualmente, ante las limitaciones de las formas farmacéuticas tradicionales para la formulación de los nuevos fármacos existe cada vez un mayor interés en el uso de la nanotecnología y dentro de este campo del uso de materiales que favorezcan y prolonguen el tiempo de contacto de los fármacos o sistemas nanofarmacéuticos con las membranas biológicas con el fin de generar sistemas para sitios específicos que controlen la liberación, mejorando con esto las alternativas de tratamiento de las enfermedades que hoy se enfrentan.

La bioadhesión se define como el estado en el cual dos materiales, de los cuales al menos uno es de naturaleza biológica, permanecen juntos por periodos extensos de tiempo debido a fuerzas interfaciales. En las ciencias farmacéuticas, cuando la unión adhesiva se lleva a cabo entre un material empleado como excipiente y el mucus o una membrana mucosa, se da el nombre de mucoadhesión [86].

Diferentes tipos de materiales, principalmente polímeros, han sido empleados en el desarrollo de sistemas nanofarmacéuticos, siendo los más importantes aquellos con propiedades hidrofílicas y/o mucoadhesivos, dependiendo del uso al que están dirigidos. Llegados a este punto, es de vital importancia mencionar que el factor determinante en las características de los nanosistemas, en el caso de las nuevas aplicaciones farmacéuticas, es el tipo de polímeros utilizados y la disposición de los mismos en el sistema por lo que la capacidad mucoadhesiva del polímero y del sistema nanoparticulado resultante debe ser debidamente caracterizada. La Figura 16 muestra las principales técnicas empleadas para la medición de la capacidad mucoadhesiva de los materiales.

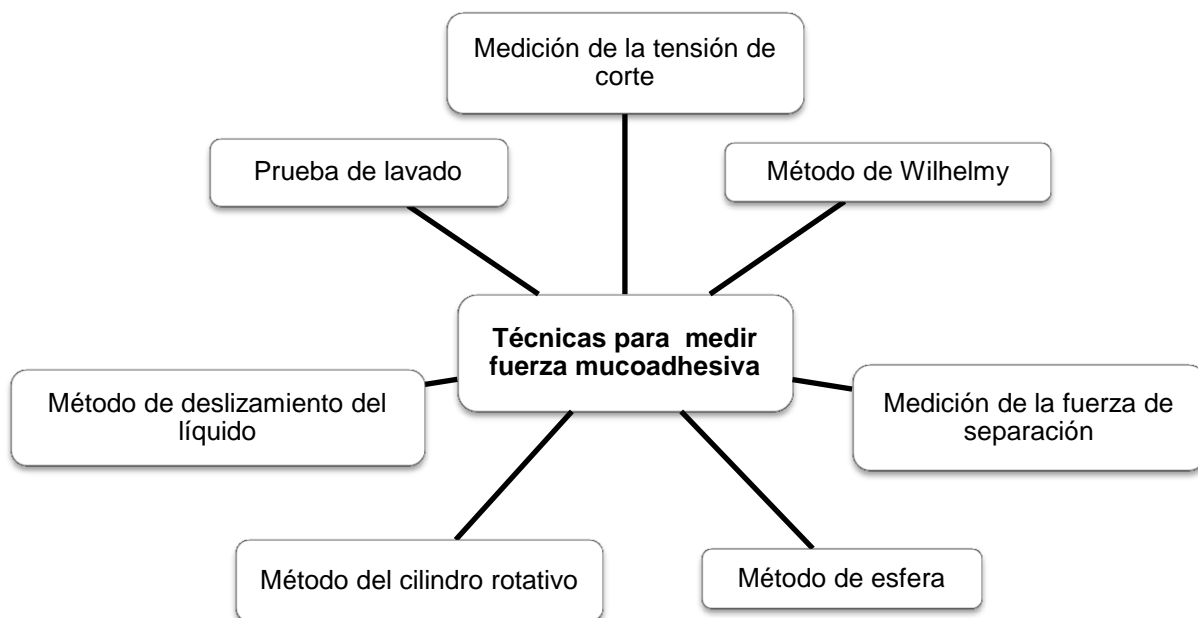


Figura 16 Técnicas para medir fuerza mucoadhesiva [87].

Así pues, para el desarrollo de los sistemas nanofarmacéuticos los polímeros mucoadhesivos empleados que se consideran ideales poseen las siguientes características: [88]

- a) Nula toxicidad y absorción por el tracto intestinal del polímero y sus productos de degradación.
- b) Completa biocompatibilidad con la membrana mucosa.
- c) Deben poseer una fluidez óptima que permita el mojado del mucus.
- d) Deben formar enlaces fuertes no covalentes con la mucina y la superficie de las células epiteliales.
- e) Debe adherirse rápidamente a los tejidos mostrando cierta especificidad.
- f) Deben permitir tanto la incorporación del fármaco, como su liberación a partir del sistema farmacéutico del que forman parte.
- g) Estabilidad en almacenamiento tanto en su forma de materia prima como en el producto terminado.

El avance e innovación en la investigación, desarrollo de las técnicas de obtención y síntesis química de polímeros; así como la constante demanda de más y mejores materiales ha traído al alcance de los investigadores materias primas con propiedades fisicoquímicas características que permiten el desarrollo de nuevos nanosistemas farmacéuticos que según las necesidades pueden contar con polímeros mucoadhesivos con capacidad de interaccionar a través de medios físicos como interpenetración de cadenas o electrostáticamente; hasta polímeros bioadhesivos que cuentan en su estructura con anticuerpos y poseen la capacidad de unirse a sitios específicos en la superficie de la mucosa.

Los polímeros que deben sus propiedades mucoadhesivas a las interacciones electrostáticas, también conocidos como polímeros mucoadhesivos de primera generación, no específicos, pueden ser divididos en función a su carga eléctrica en aniónicos, catiónicos y no iónicos. Siendo los de mayor fuerza de adhesión al mucus aquellos con carga eléctrica definida [89, 90].

Las propiedades adhesivas de polímeros no-iónicos están dadas por la interpenetración y entrecruzamiento de las cadenas del polímero. Una ventaja de estos polímeros es que no se ven influenciados por las variaciones del pH ni por la presencia de electrolitos [91].

Los polímeros aniónicos son ampliamente usados para formulaciones farmacéuticas debido a su alta funcionalidad y baja toxicidad. Estos polímeros se caracterizan por la presencia de grupos carboxilo y sulfato que les proporciona cargas netas negativas cuando los valores de pH exceden el pKa del polímero. Ejemplos típicos de este tipo de polímeros incluyen el ácido poli-

acrílico y la carboximetilcelulosa sódica, que han demostrado poseer excelentes propiedades de mucoadhesión debido a la formación de puentes de hidrogeno fuertes con la mucina [89]. Otros ejemplos de polímeros aniónicos son los alginatos y las carrageninas, también con interesantes propiedades reportadas [88, 92].

Los polímeros denominados de segunda generación son la alternativa desarrollada a los materiales bioadhesivos no específicos, debido a que estos nuevos materiales reconocen y se unen o adhieren a determinadas estructuras químicas específicas, tanto sobre la superficie de las células como al mucus. Algunos ejemplos son las lectinas, glicoproteínas de origen vegetal así como los anticuerpos [90].

5.1 Quitosano

El quitosano, polímero mucoadhesivo catiónico, comprende al grupo de polímeros derivados de quitina (Figura 17). Este último, es un polisacárido lineal que consiste en unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas entre sí por enlaces β (1 \rightarrow 4), y que se encuentra presente en la pared celular de diferentes hongos y en el exoesqueleto de algunos insectos y artrópodos por lo que se considera como el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza [93, 94].

El quitosano (Figura 17), se obtiene mediante la deacetilación de la quitina en pH básico. Es un grupo de homo- o hetero- polímeros de N-acetilglucosamina y D-glucosamina que al igual que su precursor, la quitina, se encuentran unidos entre sí por enlaces β (1 \rightarrow 4). Debido al proceso de obtención y la naturaleza polimérica de estos polisacáridos, los diferentes tipos de quitosano pueden clasificarse de acuerdo a la fracción de residuos N-acetilados o grado de N-acetilación, el grado de polimerización o peso molecular, la distribución del peso molecular y la secuencia de N-acetilación [93-95].

Este grupo de polímeros, cristalinos e insolubles a pH alcalino, se protonan en los grupos amino y adquieren una carga positiva formando sales solubles con ácidos orgánicos e inorgánicos como son el ácido glutámico, clorhídrico, láctico y acético [93].

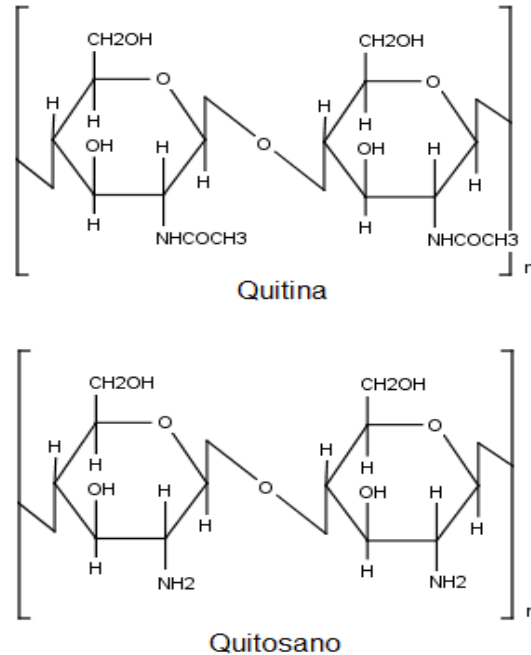


Figura 17 Estructura química de la quitina y el quitosano [93].

Para el desarrollo de una formulación farmacéutica se debe considerar que las características de cada uno de los tipos de quitosano tienen un fuerte impacto en las propiedades fisicoquímicas del sistema farmacéutico y el desempeño de este en la vehiculización y liberación de fármacos.

En este sentido, para la selección de un adecuado tipo de quitosano se debe considerar, por ejemplo, propiedades como son la relación entre el número de unidades de D-glucosamina y N-acetilglucosamina, es decir el grado de deacetilación, que afecta considerablemente su solubilidad y propiedades en solución, así como la tendencia a formar agregados; mientras que otras como el peso molecular afecta la viscosidad que tiene en solución que tiene repercusión en la forma farmacéutica y en el proceso de producción [93].

En cualquier caso el quitosano tiene como ventajas para su uso en formulaciones farmacéuticas su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades de adsorción, absorción y sus favorables propiedades toxicológicas [93-95].

Todas las propiedades fisicoquímicas y biológicas, principalmente las mucoadhesivas, del quitosano ofrecen grandes ventajas para la aplicación y formulación de sistemas

nanofarmacéuticos. Para moléculas hidrofóbicas como la curcumina, el uso de quitosano brinda dos posibilidades para aumentar la biodisponibilidad: a) un mayor tiempo de permanencia en el sitio de absorción mediante su mecanismo de mucoadhesión, permitiendo su completa disolución; o bien, b) favorecer la absorción de la molécula gracias a su capacidad de traspasar las uniones estrechas en el epitelio. Es sabido, que el quitosano se asocia a las mucosas mediante interacciones iónicas entre los grupos amino primarios y las subestructuras de ácido siálico y ácido sulfónico del mucus [93]. Adicionalmente los grupos hidroxilo y amino pueden interactuar con el mucus por medio de puentes de hidrogeno. La linealidad de las moléculas de quitosano asegura también la flexibilidad de las cadenas para facilitar la interpenetración [93]. Aunado a esto, algunos estudios han demostrado que el quitosano puede promover la absorción de moléculas mediante la reorganización de las proteínas asociadas a las uniones intercelulares [96].

A valores elevados de pH, los polímeros cargados positivamente, como el quitosano pueden formar complejos poli electrolíticos con los grupos de la mucina cargados negativamente y exhibir una fuerte mucoadhesión [89].

5.2 Factores que afectan la mucoadhesión

Como se ha mencionado anteriormente, durante el desarrollo de nuevos sistemas de vehiculización y liberación de fármacos la selección de un polímero mucoadhesivo adecuado tiene un gran impacto en las características del nuevo sistema farmacéutico. Como parte del proceso de formulación se debe considerar que la mucoadhesión es un proceso afectado por las características químicas y físicas del polímero y en el medio biológico por las condiciones fisiológicas que imperen (Tabla 7) [88, 89].

Tabla 7 Principales factores que afectan la mucoadhesión.

Características fisicoquímicas del polímero	Factores ambientales y fisiológicos
• Tipo y cantidad de grupos funcionales en la estructura química del polímero	• pka del polímero y pH de la interface del sustrato
• Masa molecular del polímero	• Fuerza inicial aplicada
• Flexibilidad de las cadenas del polímero	• Tiempo de contacto inicial
• Concentración del polímero	• Factores asociados a estados
• Hinchamiento e hidratación	patológicos

A continuación se analizan con más detalle los factores relacionados con las características fisicoquímicas del polímero:

Tipo y cantidad de grupos funcionales en la estructura química del polímero: La mucoadhesión, es un proceso que ocurre en dos pasos principales que comprenden la interpenetración de las cadenas del polímero seguida de la formación de enlaces no covalentes entre los grupos funcionales. De esta manera, los polímeros que poseen grupos funcionales hidrofílicos como ácido carboxílico (-COOH), hidroxilo (-OH), amina (-NH₂) y sulfato (-SO₄H) son favorables en la formulación de formas farmacéuticas mucoadhesivas debido a que son grupos capaces de formar puentes de hidrogeno que interactúan con las glicoproteínas de la mucina aumentando la probabilidad de interacción cuando su número aumenta, favoreciendo la adhesión del material a la superficie de las mucosas [88, 89].

Masa molecular del polímero: Un factor determinante en la capacidad de interacción de las cadenas del polímero con la superficie de la mucosa es el tamaño molecular. De manera general la capacidad del polímero de adherirse a la mucosa aumenta con polímeros de hasta 100,000 Da. Sin embargo, un tamaño molecular excesivo genera que el polímero pierda su capacidad para hidratarse, difundir e interpenetrar la superficie de las mucosas [88].

Flexibilidad de las cadenas del polímero: Por tratarse de un proceso difusivo de las cadenas del polímero en la interface se requiere un alto grado de flexibilidad para la interpenetración y el entrelazamiento en el mucus. A mayor densidad de enlaces o si las cadenas del polímero son reticuladas por algún agente la movilidad de las cadenas disminuye, y en consecuencia la fuerza de adhesión también [88].

Concentración del polímero: La concentración del polímero modifica la capacidad de adhesión de este a la superficie de la mucosa. De esta manera, una alta concentración genera poca mucoadhesión, debido a que las cadenas del polímero adquieren una conformación replegada lo que provoca que no se encuentren disponibles grupos funcionales suficientes para establecer interacciones adhesivas, mientras que una baja concentración de polímero provoca que las uniones se intensifiquen, aunque concentraciones en extremo bajas provocan que la unión formada sea inestable a causa del número escaso de moléculas que penetran por unidad de volumen [89].

Hinchamiento e hidratación: Las características de hinchamiento dependen de la concentración del polímero, la fuerza iónica y la presencia de agua. Una adhesión óptima del polímero a la superficie de la mucosa se lleva a cabo si el polímero posee una cantidad óptima de agua. Una sobrehidratación resulta en la formación de un mucilago que es más bien resbaladizo y no posee propiedades adhesivas [88].

En relación a los factores ambientales y fisiológicos, se ha observado que estos tienen un marcado efecto en la fuerza mucoadhesiva de los polímeros. A continuación se enuncian los factores más relevantes.

pKa del polímero y pH de la interface del sustrato: El pH afecta la carga formal de la superficie del mucus así como la carga de los grupos funcionales de los polímeros. El mucus, al igual que el polímero tendrá una densidad de cargas formales diferentes dependiendo del pH debido a las diferencias en las propiedades de disociación de los grupos funcionales que conforman la cadena polipéptidica del mucus. A pH cercanos a la neutralidad las moléculas de mucina se encuentran cargadas negativamente por lo que se pueden llevar a cabo fuertes interacciones con moléculas de carga opuesta y repulsión de las especies con la misma carga negativa. En consecuencia los polímeros que en las mismas condiciones de pH se encuentren cargados positivamente formaran uniones adhesivas fuertes [88].

Fuerza inicial aplicada: Para que el fenómeno de mucoadhesión se lleve a cabo en la capa de mucus es necesario aplicar fuerza, y la intensidad de esta puede afectar la profundidad de la interpenetración. [88].

Tiempo de contacto inicial: El tiempo de contacto entre el material mucodhesivo y la capa de mucus determina el grado de humectación e interpenetración de las cadenas del polímero mucoadhesivo. La fuerza de mucodhesión incrementa cuando el tiempo inicial de contacto incrementa [88].

Finalmente, desde el punto de vista fisiológico la renovación natural de las moléculas de mucina de la capa de mucus despegan los materiales mucoadhesivos de la superficie a causa del recambio. La producción de mayor cantidad de mucina se puede ver alterada en presencia de un material mucoadhesivo y de la presencia de comida [88, 90].

También es necesario considerar que los factores asociados a estados patológicos, como el resfriado común, úlceras gástricas, colitis ulcerativa, inflamación, infecciones bacterianas o micosis, pueden afectar las propiedades fisicoquímicas del mucus. Si un material será empleado en un organismo enfermo, las propiedades de mucoadhesión deben ser evaluadas en estas mismas condiciones [88, 90].

6. Rumiantes. Generalidades del aparato digestivo.

Los rumiantes son animales capaces de alimentarse de pasto o forraje, debido a que poseen cualidades anatómicas y fisiológicas para llevar a cabo la digestión fermentativa necesaria y así degradar carbohidratos como celulosa, hemicelulosa y pectina. Desde el punto de vista exclusivamente utilitario, los rumiantes son animales muy importantes para la especie humana porque de ellos se obtienen cantidades importantes de alimentos y materias primas para la industria como son las de calzado y vestido [97].

La palabra rumiantes procede del latín, *ruminare*, que significa volver a masticar; y es que en este tipo de animales la rumia consiste en la regurgitación de la ingesta, seguida de una remasticación, reensalivación y nueva deglución [98]. Para ello los rumiantes han desarrollado un complejo sistema digestivo que de manera general se divide de la siguiente manera (Figura 18):

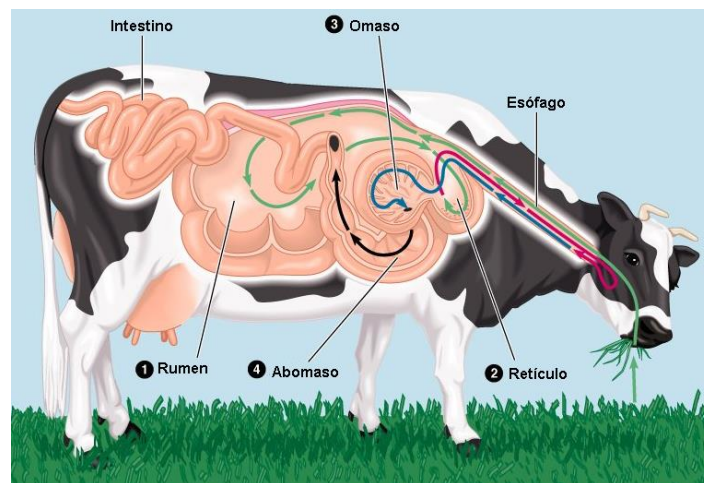


Figura 18 Anatomía del aparato digestivo de los rumiantes.

El tracto digestivo de los rumiantes incluye la boca, el esófago, un estómago de cuatro compartimientos (rumen, retículo, omaso y abomaso), intestino delgado e intestino grueso. Las flechas en la figura indican los movimientos del alimento a través del tubo digestivo de los rumiantes [99].

Boca: La primera porción del conducto alimenticio está formado por la boca, que contiene la lengua y los dientes, cuya función es aprehensora para obtener alimento y maceradora. Al inicio del proceso el animal obtiene el alimento y después de ser ligeramente masticado se junta un bolo que es deglutido y transportado a lo largo del esófago hacia el “estómago” [97].

Retículo, rumen y omaso: El “estómago” de los rumiantes muestra el máximo desarrollo evolutivo de los mamíferos pues cada uno de ellos tiene condiciones y funciones únicas. Los compartimentos del pre-estómago (retículo, rumen, omaso), formados por una mucosa escamosa estratificada no glandular que les proveen funciones mecánicas y protectoras, actúan como almacén y retrasan el avance del alimento ingerido pues constituyen las zonas en las que tiene lugar la fermentación microbiana anaerobia (debida a la presencia de protozoos, hongos y bacterias) de la materia vegetal ingerida; así como la absorción de los productos de la fermentación [97].

En el rumen los valores de pH sufren de fluctuaciones que están relacionadas con la concentración de ácidos volátiles que son dependientes de la dieta, la concentración de saliva secretada durante la masticación y la rumia; y la velocidad de absorción de ácidos volátiles. Con todo esto los valores de pH de rumen fluctúan entre 5.4 y 6.9 [97].

Abomaso: Es el último de los compartimientos es conocido como *estomago* verdadero y está formado por una mucosa glandular que funciona de manera similar a la de otros mamíferos no rumiantes y humanos, secretando enzimas digestivas, HCl y moco para desdoblar alimentos complejos. El pH del contenido abomasal es menor de 3 debido a la secreción de ácido clorhídrico [100].

Intestino: El intestino de los rumiantes es de considerable longitud, y es en esta área donde la mayoría de las enzimas digestivas son secretadas. Al igual que en otras especies de mamíferos, el intestino está especializado en la absorción de sustancias nutritivas. El intestino delgado se divide en duodeno, yeyuno e íleon y el intestino grueso en ciego colon y recto [97].

Debido a la naturaleza ácida del compartimiento ruminal, por los procesos de fermentación, los rumiantes producen grandes cantidades de saliva que posee funciones específicas como son facilitar la masticación y deglución del bolo y funcionar como tampón que es probablemente una de sus funciones más importantes, pues debido a su pH de entre 8.1 y 8.3 mantiene el

pH del rumen dentro de los márgenes fisiológicos a los que se encuentran adaptados tejidos y microorganismos. Su influencia como factor alcalinizante depende de su producción, la cual a su vez está relacionada con las horas de rumia, que varían según la naturaleza del alimento. Cuanto mayor es la cantidad de carbohidratos estructurales mayor es el tiempo de rumia [97].

Objetivo general

Generar, caracterizar y optimizar un nuevo sistema de liberación de agentes antioxidantes constituido por nanocápsulas mucoadhesivas cargadas con curcumina mediante la aplicación de técnicas de caracterización *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para obtener una forma farmacéutica para su administración por vía oral en veterinaria.

Objetivos particulares

- Establecer un plan experimental que permita desarrollar la formulación de un sistema nanoparticulado mucoadhesivo cargado con curcumina.
- Optimizar la formulación mediante el seguimiento del plan experimental planteado donde se impliquen las variables críticas del proceso.
- Realizar la caracterización de las propiedades de tamaño y superficie de las nanocápsulas producidas.
- Realizar la evaluación *ex vivo* e *in vivo* de la capacidad mucoadhesiva de las nanocápsulas obtenidas.

Hipótesis

- Las nanocápsulas, constituidas por un núcleo oleoso y cubierta polimérica a base de quitosano tendrán propiedades mucoadhesivas y serán capaces de transportar en su núcleo oleoso a la curcumina, fitofármaco hidrófobo de múltiple aplicación terapéutica y actividad antioxidante promoviendo su absorción en el tracto gastrointestinal y con ello mejorar su biodisponibilidad.



LEDEFAR

Materiales y Métodos



Mario Alberto Cano Vega
Lic. Farmacia

Materiales

Equipo

- Agitador magnético, Modelo Lab Disc White, IKA Instruments.
- Vortex, Modelo K-550-G, Scientific Industries Inc.
- Ultraturrax, Modelo T25 S1, IKA Instruments.
- Purificador de agua, Elix 5 y Milli-Q 5, Millipore.
- Microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM-1200EX
- Centrifuga, Damon/IEC División.
- Potenciómetro, Modelo SevenMulti™, Metler-Toledo.
- Balanza analítica, Modelo HR73, Metler-Toledo.
- Balanza analítica, Modelo AP250D, OHAUS.
- Z-sizer NanoZS®. Malvern.

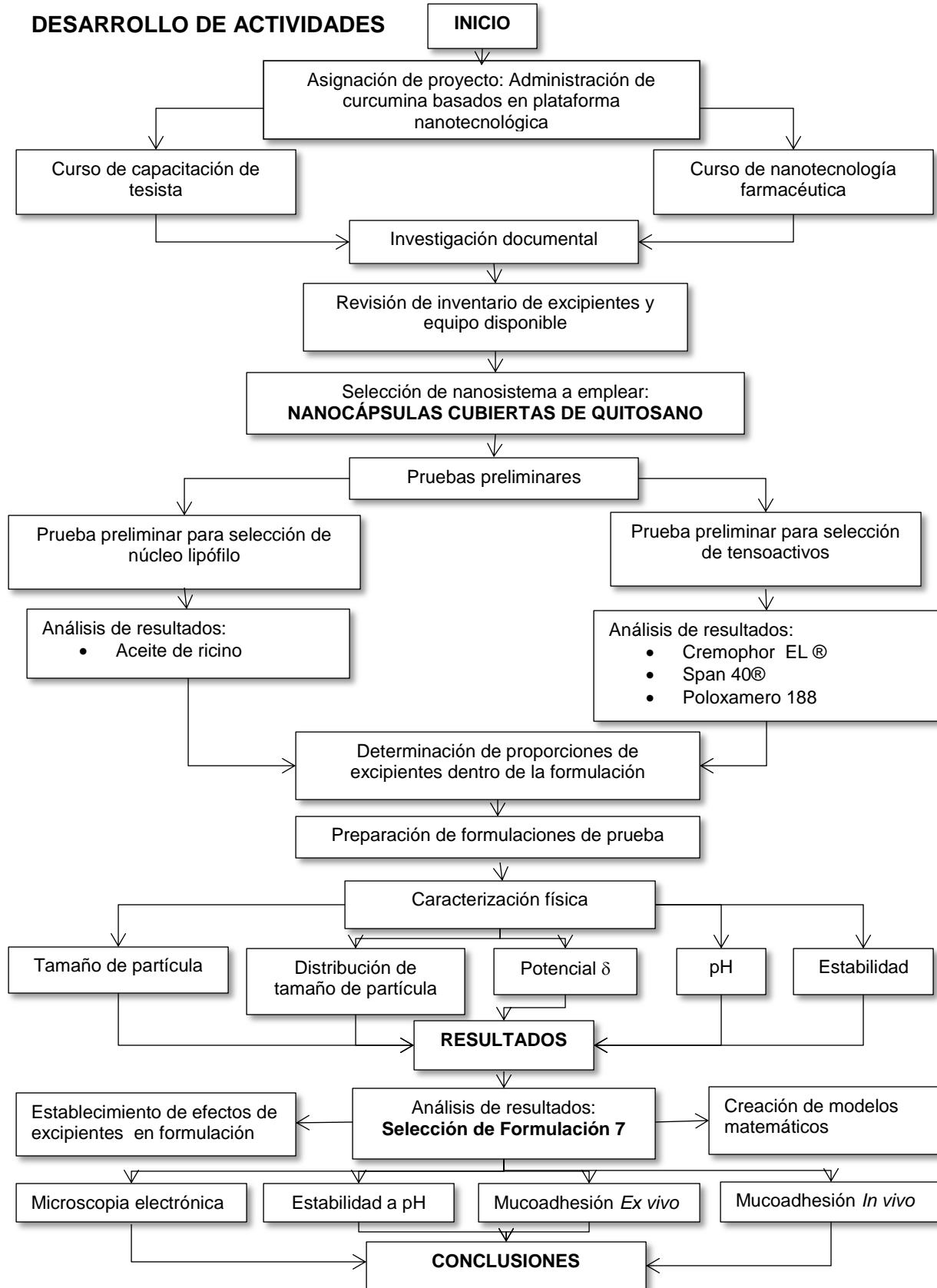
Materias primas

- Curcumina, Sigma-Aldrich®, México
- Span 40, México.
- Cremophor EL®, BASF, Alemania
- Pluronic F68, Sigma-Aldrich, México
- Aceite de Ricino, Sigma-Aldrich®, México
- Aceite de almendras, Laboratorios Saludmex®, México
- Aceite de coco, Droguería Mercurio, México
- Vitamina E, Pisa Agropecuaria, México.
- Aceite de papa, Droguería Mercurio, México
- Aceite de canola, Capullo®, México
- Aceite de olivo, IMMEQ, México
- Aceite de sésamo, IMMEQ, México
- Aceite de trigo, IMMEQ, México
- Quitosano Bajo peso molecular, Sigma-Aldrich, México
- Transcutol HP®, Gattefossé, Francia

Material biológico

- Intestino de borrego
- Ratones BALB/c con 12 semanas de edad.

DESARROLLO DE ACTIVIDADES



Métodos

Selección de excipientes y pruebas preliminares

La selección de excipientes se llevó a cabo mediante una investigación bibliográfica y pruebas preliminares empleando diferentes tipos de tensoactivos y matrices lipófilas. El objetivo fue seleccionar los excipientes que permitieran obtener sistemas nanoparticulados estables y de baja toxicidad con características mucoadhesivas y que pudieran formar parte de los sistemas nanocapsulares.

Preparación de nanocápsulas cargadas con curcumina

La preparación de las nanocápsulas se llevó a cabo mediante el método de emulsificación por homogeneización. Brevemente, se preparó la fase acuosa mezclando quitosano, 2 ml de solución de ácido acético (2 M) y Pluronic F68 (Poloxamero 188) en 25 ml de agua MilliQ (Millipore®). Por otra lado, la fase oleosa consistió en la solución de aceite de ricino, curcumina, Span 80® y Cremophor EL® a su vez disuelto en 300 µL de etanol absoluto. Se agitó en Vortex hasta formar una solución de color naranja translúcida. La fase oleosa se adicionó a la fase acuosa, agitando durante 5 minutos; posteriormente se transfirió a un vaso de precipitados y se homogenizó con Ultraturrax® a 24,000 rpm durante 10 minutos.

Selección del aceite para el núcleo lipófilo

Se probaron diferentes tipos de aceites: aceite de ricino, aceite de papa, aceite de canola, aceite de coco, aceite de almendras, aceite de trigo, aceite de sésamo, aceite de oliva y vitamina E. La Tabla 8 muestra los excipientes y la cantidad de cada uno de ellos en los sistemas nanoparticulados preparados durante el proceso de selección del aceite de origen vegetal que conformaría al núcleo lipófilo. Las cantidades empleadas de cada uno de estos fueron propuestas según lo encontrado en la investigación documental realizada y se mantuvieron constantes en cada uno de los experimentos.

Tabla 8 Formulación de prueba para la selección de aceite

Excipiente	Cantidad
Curcumina	5 mg
Núcleo lipófilo	500 mg
Quitosano bajo peso molecular	25 mg
Lecitina de soya	250 µl
Poloxamero 188	50 mg
Agua milliQ®	25 ml

Adicionalmente, se muestra en la Tabla 9 los principales ácidos grasos que componen, según las referencias bibliográficas, a los aceites vegetales empleados. En el anexo A se muestran las estructuras químicas de cada uno de ellos.

Tabla 9 Principales ácidos grasos que componen a los aceites vegetales. [101-103]

Aceites vegetales	Porcentaje (%) de ácidos grasos en aceites vegetales						
	Mirístico C:14	Palmítico C:16	Palmitoleico C:16:1	Esteárico C:18	Oleico C18:1	Linoleico C:18:2	Linolénico C18:3
Aceite de oliva	-	-	-	-	69.50	7.90	0.60
Aceite de canola	-	3.75	0.25	1.50	59	21.50	-
Aceite de almendras	-	-	-	-	-	12.21	0.93
Aceite de ricino*	-	1	-	1	3	4.2	0.3
Aceite de papa	S.R.	S.R.	S.R.	S.R.	S.R.	S.R.	S.R.
Aceite de sésamo	-	9.1	-	4.30	45.4	40.4	-
Aceite de trigo	-	16	-	-	14	55	7
Aceite de coco	76.23	8.91	-	2.48	6.93	1.49	-

*El ácido ricinoleico representa aproximadamente el 90% de su composición.
S.R. Sin referencia

Los criterios para la selección del mejor aceite fueron baja toxicidad, alta solubilidad del activo y estabilidad de las nanopartículas formadas.

Selección del tipo de tensoactivo

Se observó el efecto del tipo de surfactante en la obtención de nanocápsulas. Se emplearon: lecitina de soya y la mezcla de Span 40® y Cremophor EL®. Permanecieron invariables el aceite de ricino, quitosano, solución de ácido acético 2 M, Poloxamero 188 y agua. Los criterios para la selección de los agentes tensoactivos fueron baja toxicidad, estabilidad de las nanopartículas formadas y facilidad de incorporación durante el proceso de preparación.

A continuación se observan las estructuras químicas de los tensoactivos empleados. La Figura 19 muestra la estructura química de la Fosfatidilcolina, principal componente de la lecitina de soya [104].

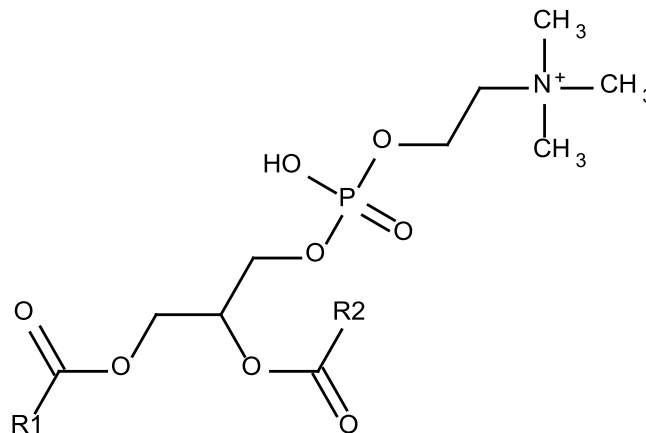


Figura 19 Estructura química de la fosfatidilcolina.

La Figura 20 muestra la estructura química del Span 40® o sorbitan monopalmitato surfactante no iónico de naturaleza lipófila ampliamente utilizado como agente emulsificante y de mojado en farmacia [104].

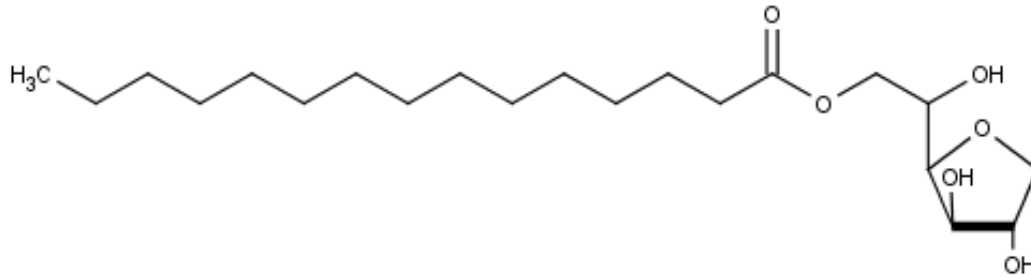


Figura 20 Estructura química del Span 40®.

La Figura 21 muestra la estructura química del Cremophor EL®, grupo de compuestos no iónicos derivados del aceite de ricino, que en la práctica farmacéutica se emplean para la solubilización de fármacos y en veterinaria se le ha encontrado aplicación como emulsificante de aceites en alimentos, mostrándose además que puede aumentar la biodisponibilidad de las sustancias, mejorando por ende su eficacia [104].

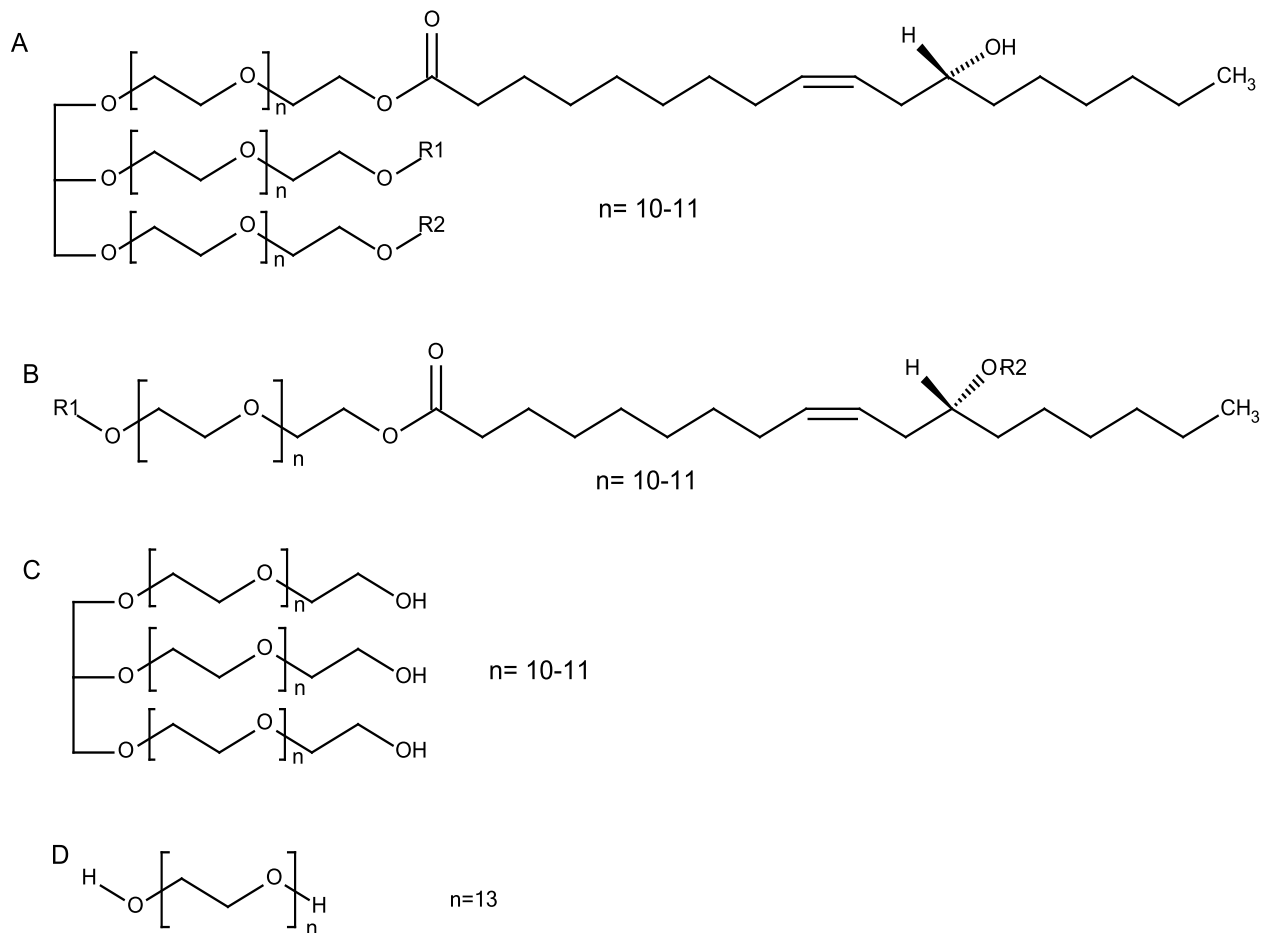


Figura 21 Estructura química de los componentes del Cremophor EL®.

La figura muestra la porción hidrófoba: (a) Esteres de ácido ricinoleico y éteres de polioxietilenglicerol sin diferenciación entre el polioxietileno monoricinoleato de glicerol ($R^1 = R^2 = H$); polioxietilendirricinoleato de glicerol ($R^1 = \text{ricinoleato}; R^2 = H$); Polioxietileno trirricinoleato de glicerol ($R^1 = R^2 = H$) (b) Esteres de ácido ricinoleico y polietilenglicol (PEG) sin diferencia entre el polioxietileno monoricinoleato ($R^1 = R^2 = H$); Polioxietileno dirricinoleato ($R^1 = \text{ricinoleato}; R^2 = H$); polioxietileno trirricinoleato ($R^1 = \text{ricinoleato}; R^2 = \text{ricinoleato etoxilado}$). Porción hidrófila: (c) éter de polioxietileno glicerol; (d) Polietilenglicol [105].

Además, se adicionó a la formulación el poloxámero 188, debido a sus propiedades de emulsificación y solubilización ampliamente descritas y a su amplio uso en sistemas micro y nanoparticulados [106, 107]. La estructura química del poloxámero 188 se muestra en la Figura 22.

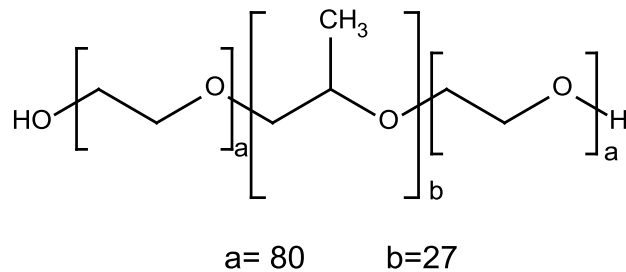


Figura 22 Estructura química del Poloxámero 188.

Determinación de los principales componentes y proporciones dentro de la formulación

Los niveles de aceite de ricino se fijaron en función de los resultados obtenidos en las pruebas de selección del aceite (núcleo lipófilo). Los niveles de Span 40® y Cremophor EL® se seleccionaron de manera arbitraria. El procedimiento de preparación es el descrito en *Preparación de nanocápsulas cargadas con curcumina*.

En la Tabla 10 se muestran las cantidades en gramos de cada uno de los excipientes en la formulación de nanocápsulas cargadas de curcumina

Tabla 10 Proporciones de los excipientes (en gramos) en las formulaciones de nanocápsulas cargadas de curcumina.

Grupo	Formulación	Excipiente (g)					Agua (ml)
		Aceite de ricino	Quitosano	Span 40®	Cremophor EL®	Poloxamero 188	
Sin tenso.	3	0.5000	0.1250	0	0	0.05	25
	15	0.5000	0.1250	0	0	0.05	25
Span 40®	1	0.4167	0.1042	0.1042	0	0.05	25
	16	0.4167	0.1042	0.1042	0	0.05	25
	4	0.3333	0.0833	0.2083	0	0.05	25
	10	0.2500	0.0625	0.3125	0	0.05	25
Cremophor EL®	11	0.4167	0.1042	0	0.1042	0.05	25
	17	0.4167	0.1042	0	0.1042	0.05	25
	5	0.3333	0.0833	0	0.2083	0.05	25
	13	0.2500	0.0625	0	0.3125	0.05	25
Span 40® y Cremophor EL®	6	0.4167	0.1042	0.0521	0.0521	0.05	25
	2	0.2917	0.0729	0.0521	0.2083	0.05	25
	8	0.3333	0.0833	0.1042	0.1042	0.05	25
	12	0.3333	0.0833	0.1042	0.1042	0.05	25
	7	0.2500	0.0625	0.1042	0.2083	0.05	25
	14	0.2917	0.0729	0.2083	0.0521	0.05	25
	9	0.2500	0.0625	0.2083	0.1042	0.05	25
Valor	Mínimo	0.2500	0.0625	0.0000	0.0000	0.05	25
	Máximo	0.5000	0.1250	0.3125	0.3125	0.05	25

En la Tabla 11 se expresan la cantidad (en porcentajes) de cada uno de los excipientes en la formulación de nanocápsulas cargadas de curcumina.

Tabla 11 Proporciones de los excipientes (en porcentaje) en las formulaciones de nanocápsulas cargadas de curcumina.

Grupo	Formula	Excipiente (%)				
		Aceite de ricinio	Quitosano	Span 40	Cremophor EL®	Poloxamero 188
Sin tenso.	3	2.00	0.50	0.00	0.00	0.20
	15	2.00	0.50	0.00	0.00	0.20
Span 40®	1	1.67	0.42	0.42	0.00	0.20
	16	1.67	0.42	0.42	0.00	0.20
	4	1.33	0.33	0.83	0.00	0.20
	10	1.00	0.25	1.25	0.00	0.20
Cremophor EL®	11	1.67	0.42	0.00	0.42	0.20
	17	1.67	0.42	0.00	0.42	0.20
	5	1.33	0.33	0.00	0.83	0.20
	13	1.00	0.25	0.00	1.25	0.20
Span 40® y Cremophor EL®	6	1.67	0.42	0.21	0.21	0.20
	2	1.17	0.29	0.21	0.83	0.20
	8	1.33	0.33	0.42	0.42	0.20
	12	1.33	0.33	0.42	0.42	0.20
	7	1.00	0.25	0.42	0.83	0.20
	14	1.17	0.29	0.83	0.21	0.20
	9	1.00	0.25	0.83	0.42	0.20
Valor	Mínimo	1	0.25	0	0	0.2
	Máximo	2	0.5	1.25	1.25	0.2

El orden de los experimentos fue completamente aleatorio. Se consideraron tres variables de respuesta: Tamaño de partícula (nm), Índice de polidispersión y Potencial ζ (mV)

Caracterización de las nanopartículas cargadas de curcumina

Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial ζ

Se determinó el tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial ζ después de 24 horas de la preparación de las nanocápsulas haciendo uso de un Zetasizer nanoseries, de *Malvern Instruments* por medio de las técnicas de DLS y movilidad electroforética.

pH

Inmediato a la preparación se llevó a cabo la medición con un potenciómetro Seven Multi®, Mettler Toledo. Se dispuso una porción de la suspensión de nanopartículas en un recipiente adecuado y se sumergió el electrodo para la medición de pH. Las determinaciones se realizaron por triplicado. El análisis se efectuó a 20 °C.

Estabilidad

Se evaluó la estabilidad de las nanocápsulas cargadas de curcumina. Se recolectaron alícuotas sin dilución de las suspensiones preparadas, se colocaron en viales de vidrio y se almacenaron en refrigeración a una temperatura promedio de 4°C. Se llevó a cabo una evaluación visual de las nanocápsulas transcurridas 1, 8 y 16 semanas y se consideraron como parámetros de estabilidad su apariencia física.

Microscopia electrónica de transmisión

El análisis morfológico se llevó a cabo con un microscopio electrónico de transmisión JEM-1200-EX, JEOL operando a 120 kV en el Instituto de Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para este análisis, la suspensión de nanocápsulas se diluyó en agua desionizada (1:50 v/v), colocó en una rejilla para muestras y se dejó secar a temperatura ambiente.

Estabilidad en diferentes puntos de pH

Se prepararon soluciones buffer de pH 1 a 10 según se indica en el apartado de soluciones de la USP. En tubos de ensaye diferentes se colocó un volumen constante de la solución buffer de cada valor de pH. Posteriormente se adicionó una alícuota de la suspensión de nanocápsulas de la formulación seleccionada preparada 24 horas antes de la prueba, se agitó e incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Se determinó el tamaño de partícula e índice de polidispersión (Pdl) haciendo uso de un Zetasizer de *Malvern Instruments* por medio de la técnica de DLS.

ESTUDIOS EN ANIMALES

Nota. Todo el trabajo con animales se realizó acorde a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

MUCOADHESIÓN

Prueba de mucoadhesión *Ex vivo* en intestino de borrego.

El intestino de borrego se obtuvo de un animal recién sacrificado, se lavó sumergiendo y sacando de solución salina repetidas veces hasta eliminar restos de alimento del tejido. El tejido limpio se conservó en solución salina fisiológica limpia a temperatura ambiente. El manejo del tejido se realizó cuidadosamente para evitar la ruptura y separación de la capa

mucosa y de esta manera conservar las cualidades del tejido. Se diseccionaron fracciones de aproximadamente 10 cm y con ellas se construyeron pequeños sacos de diálisis. Se tomaron 3 ml de suspensión de nanocápsulas y se vertieron en el interior de los sacos. Se colocaron los sacos en 250 ml de solución salina a 37°C con agitación magnética durante 15 minutos. Finalmente, la suspensión de nanocápsulas fue removida. Se expuso la luz del saco y se observaron los cambios producidos. Como control positivo se utilizó una solución de curcumina en Transcutol HP®, con una concentración de 2 mg/ml, de la cual, igual que la suspensión de nanopartículas, se tomaron 3 ml y colocaron dentro de los sacos. Se repitió el procedimiento anteriormente descrito.

Posteriormente, de las fracciones sometidas a este tratamiento se obtuvieron subfracciones de tejido en forma de pequeños cuadros de aproximadamente 3 x 2 cm, las cuales se colocaron en solución salina fisiológica con agitación magnética, para evaluar la resistencia del proceso de mucoadhesión de forma cualitativa. Se extrajo el tejido a los 5, 10, 15 y 25 minutos para obtener imágenes del proceso de separación de las nanocápsulas del tejido.

En una prueba aparte, se diseccionaron segmentos limpios de intestino de 30 cm de largo. El segmento de intestino se colocó verticalmente y se hicieron pasar a través de él 3 ml de suspensión de nanocápsulas dejando que resbalaran en la luz intestinal por gravedad. Finalmente se disecciono transversalmente el intestino y se observó.

Prueba de mucohesión *In vivo* en ratón BALB/c.

Para este experimento se utilizaron ratones hembra BALB/c. Se administró vía oral 1 ml de suspensión de nanocápsulas; y un control al cual se le administró vía oral 1 ml de suspensión de curcumina (0.4 mg/ml). Ambos grupos se contuvieron en jaula con agua y dieta normal durante 3 horas después de la administración. El sacrificio se realizó con sobredosis de éter etílico. Se llevó a cabo la disección y realizaron las observaciones pertinentes. En ambas pruebas se aprovechó el color característico de la Curcumina como una manera de identificar la permanencia de la curcumina y las nanocápsulas a lo largo del tejido intestinal.

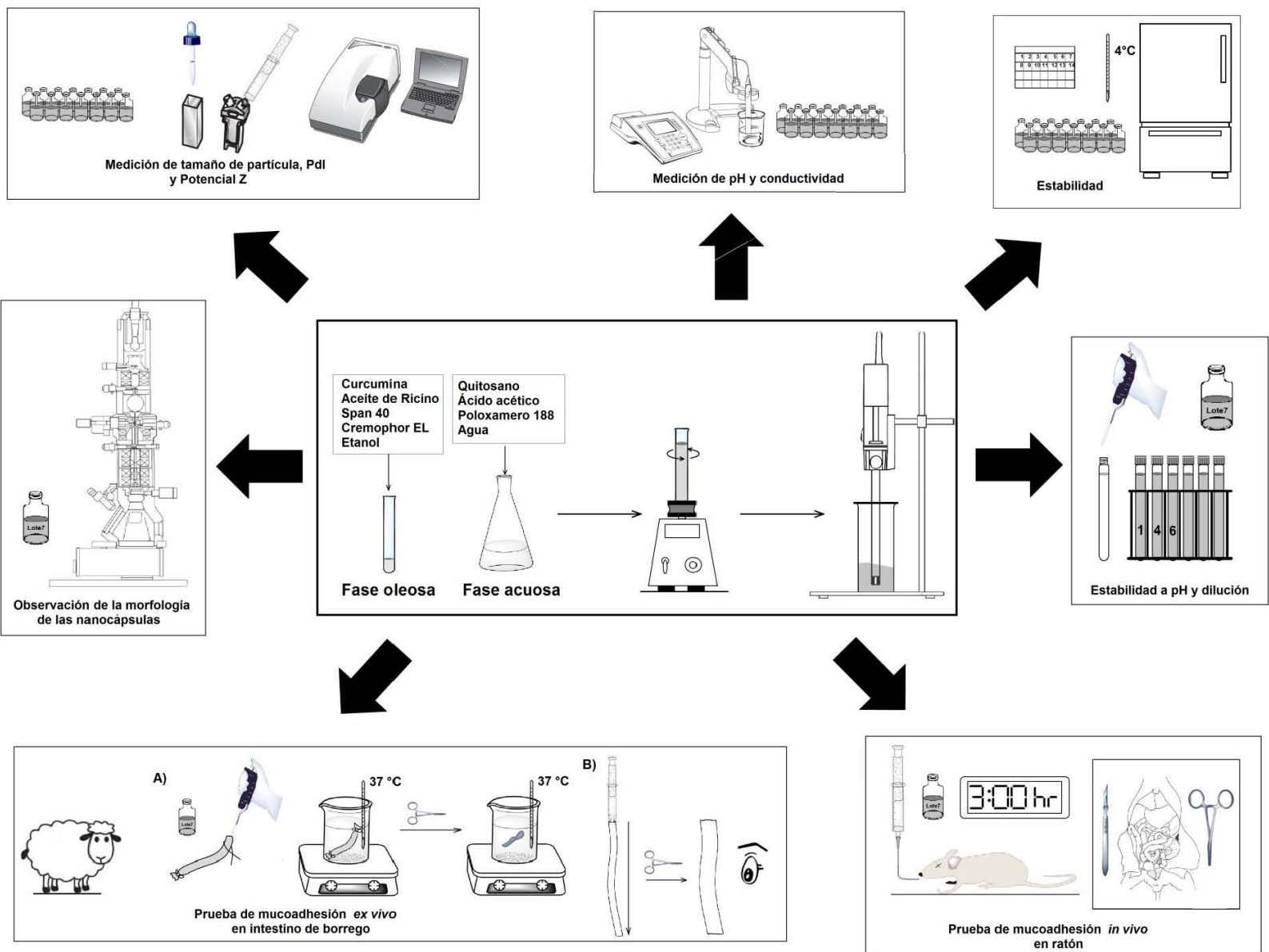


Figura 23 Esquematación de la producción y caracterización de nanocápsulas mucoadhesivas cargadas con curcumina.



LEDEFAR

Resultados y Discusión



Mario Alberto Cano Vega
Lic. Farmacia

Resultados y discusión

Selección de aceite para el núcleo lipófilo

El objetivo de la etapa inicial de experimentación fue analizar la factibilidad de incorporar la curcumina en nanopartículas poliméricas. Como se ha mencionado anteriormente (Tabla 3) la curcumina es insoluble en agua pero soluble en algunos solventes orgánicos y aceites. De esta manera, se planteó el uso de nanocápsulas para facilitar la absorción de la molécula, principalmente, porque este tipo de sistemas consisten en un núcleo líquido de naturaleza oleosa que permite la carga de grandes cantidades de fármaco, y además, permite que dicho fármaco se encuentre disuelto al momento de llegar al sitio de absorción.

Así, en una primera etapa se emplearon para la elaboración de las nanocápsulas diferentes núcleos lipófilos, consistentes en diferentes aceites de origen vegetal, con el propósito de maximizar la cantidad de curcumina que podía incorporarse. El aceite de ricino, aceite de papa, aceite de canola, aceite de coco, aceite de almendras, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de trigo y vitamina E fueron los aceites seleccionados. Se buscó también que los aceites estuvieran comercialmente disponibles, fueran de baja toxicidad y por consiguiente seguros para su administración por vía oral.

Los excipientes y la cantidad de cada uno de ellos en los sistemas nanoparticulados preparados durante el proceso de selección de aceite de origen vegetal que conformaría el núcleo lipófilo fueron propuestas según lo encontrado en la investigación documental realizada y se mantuvieron constantes en cada uno de los experimentos.

En la Figura 24 se muestran las fotografías hechas de los diferentes sistemas nanoparticulados empleando como núcleo lipófilo diferentes aceites de origen vegetal con el objetivo de mostrar la apariencia física de los sistemas nanoparticulados obtenidos en el proceso de selección del aceite.



No. de prueba	Curcumina (mg)	Tipo de aceite	Cantidad de aceite (mg)	Quitosano (mg)	Poloxamero188 (mg)	Lecitina (ml)
1	4.8	Ricino	508.3	24.98	50.71	250
2	4.8	Almendras	504.2	24.98	50.61	250
3	4.6	Coco	518	28.6	48.78	250
4	4.8	Papa	502.9	25.52	48	250
5	4.5	Olivo	498.5	25.4	50.94	250
6	5	Canola	498.7	25.3	49.6	250
7	4.9	Sésamo	512.7	25	49.7	250
8	5.1	Trigo	504.9	25.3	51.7	250
9	5.4	Vitamina E	512	27	50.9	250

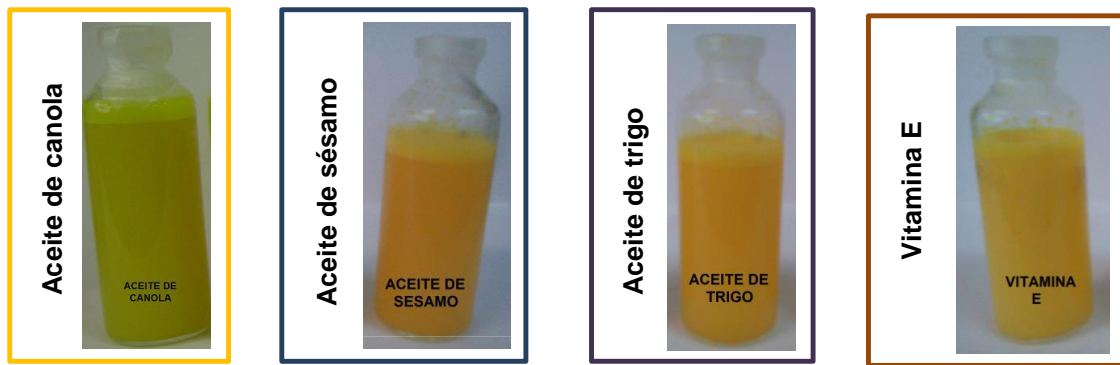


Figura 24 Composición y apariencia física de nanocápsulas con diferentes núcleos oleosos.

Los sistemas nanoparticulados se almacenaron en viales de vidrio cerrados a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por un lapso de 7 días. En esta etapa se evaluó únicamente la apariencia física de cada uno de los sistemas como signo de estabilidad física.

En la Figura 24 se observa que en todos los casos existió separación de fases. Sin embargo, debido a que la formula aquí propuesta no está optimizada, los cambios de coloración del aceite en el sistema nanoparticulado fueron el parámetro más importante para la selección del núcleo oleoso. Un cambio de coloración se interpretó como la presencia de alguna reacción química no deseable dentro del sistema la cual deterioraba las propiedades de estabilidad y organolépticas del sistema.

Adicionalmente, para la selección del núcleo lipófilo se consideraron las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los aceites vegetales; pues aunque su origen natural y baja toxicidad los hace muy útiles para la formulación de formas farmacéuticas de administración por vía oral, estos presentan una importante desventaja debido a su particular susceptibilidad a las reacciones de auto-oxidación, representadas en la Figura 25 [108].

Iniciación	$RH \rightarrow R\cdot + H\cdot$
Propagación	$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$ $ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$
Derivación	$ROOH \rightarrow RO\cdot + \cdot OH$ $RO\cdot + RH + O_2 \rightarrow ROH + ROO\cdot$ $\cdot OH + RH + O_2 \rightarrow H_2O + ROO\cdot$
Terminación	$ROO\cdot + ROO\cdot \rightarrow ROOH + O_2$ $ROO\cdot + R\cdot \rightarrow ROOH$ $R\cdot + R\cdot \rightarrow R-R$
Descomposición del peróxido	$ROOH \rightarrow$ varios compuestos de bajo peso molecular
Polimerización	$ROOH \rightarrow$ varios compuestos de alto peso molecular.

Figura 25 Representación clásica del mecanismo de auto-oxidación de un aceite.

La oxidación de los aceites vegetales se inicia con la formación de radicales libres. Los radicales libres pueden ser fácilmente formados removiendo un átomo de hidrogeno de un grupo metileno después de un carbono con doble enlace. Los radicales libres reaccionan rápidamente con el oxígeno para formar un radical peróxido. El radical peróxido puede atacar otra molécula de ácido graso para remover un átomo de hidrogeno y formar un hidroperóxido y otro radical libre, propagando la reacción de oxidación [109].

La velocidad con que los lípidos se oxidan está limitada por la extracción de un átomo de hidrogeno para generar el radical hidroperóxido; y la facilidad o dificultad con que esto ocurre depende la fuerza de enlace carbono-hidrogeno. En este sentido, los grupos $-CH_2-$

que siguen a un doble enlace carbono-carbono poseen una menor fuerza de enlace carbono-hidrogeno; y la debilidad de este enlace aumenta si al grupo $-CH_2-$ le sigue otro doble enlace carbono-carbono (dobles enlaces conjugados); por lo que la extracción de un átomo de hidrogeno se facilita en los lípidos que poseen este tipo de estructura [109].

Como se observa en la Tabla 9, la mayoría de los aceites vegetales empleados están compuestos principalmente por ácido linoleico y ácido oleico que cuentan en su estructura con enlaces dobles (ácido oleico) y dobles enlaces conjugados (ácido linoleico) que los hacen los más susceptibles a sufrir las reacciones de auto-oxidación anteriormente descritas. A nivel experimental el cambio de coloración y la marcada inestabilidad física de las formulaciones exploratorias se asumió como una evidencia de que el fenómeno anteriormente descrito tuvo lugar.

También es importante tomar en cuenta que la velocidad de las reacciones de auto-oxidación se puede ver modificada por la presencia de metales de transición (por ejemplo Fe^{2+} , Fe^{3+}), luz UV y calor, que sirven como catalizadores en la descomposición de los hidroperóxidos dando lugar a especies más reactivas que aceleran la oxidación de los lípidos, situándose en la superficie de las nuevas gotas debido a su actividad superficial [108] degradando así a los aceites hasta obtener aldehídos, cetonas o ácidos que cuentan en su estructura química con 3 y hasta 11 carbonos [109].

Debido a que cada molécula tiene propiedades fisicoquímicas características, como su reactividad química, dimensiones, polaridad (hidrofilicidad/hidrofobicidad), coeficiente de partición, estabilidad térmica y actividad superficial; es importante considerar las reacciones de auto-oxidación porque provocan cambios en las estructuras químicas de los aceites que constituyen el núcleo de las nanocápsulas transformándolos en moléculas diferentes con nuevas propiedades fisicoquímicas que tienen un fuerte impacto en la estabilidad de las nanocápsulas producidas [74, 108]. Además, las nuevas moléculas formadas tras el proceso de auto-oxidación de los aceites vegetales poseen un fuerte y desagradable aroma y provocan cambios de coloración en el aceite deteriorando las propiedades organolépticas de la formulación.

Asimismo, es necesario considerar que en un sistema donde el tamaño de partícula se ve reducida la velocidad de oxidación del lípido aumenta porque incrementa el área superficial

de contacto de los lípidos del núcleo, exponencialmente en sistemas nanoparticulados, con el medio circundante favoreciendo con ello la posibilidad del fenómeno de oxidación lipídica.

Por otra parte, la presencia de emulsificantes y la carga eléctrica que estos proporcionan a la superficie, juega un rol importante en la estabilidad oxidativa del núcleo de las partículas. Una superficie eléctricamente cargada tiene en mayor o menor medida, según la densidad de carga y el signo e intensidad del potencial eléctrico, la capacidad de atraer iones con carga contraria del medio circundante que pueden ser “simples” iones de origen mineral como son Ca^{2+} , Na^+ y Cl^- o iones capaces de promover la oxidación de los lípidos como son el Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^+ o Cu^{2+} [110].

Ante este fenómeno es importante destacar que inclusive la calidad de los excipientes empleados en la fabricación de las nanocápsulas tendrá un fuerte impacto sobre su estabilidad, debido a que hasta la presencia de pequeñas cantidades de metales de transición pueden acelerar la oxidación lipídica promoviendo la ruptura de hidroperóxidos dando lugar a especies más reactivas. De esta manera, para mejorar la estabilidad se hace entonces necesario el uso de tensoactivos no iónicos y aceites con bajo contenido de peróxidos y metales de transición [108].

Así, el mejor aceite para desarrollar sistemas nanocapsulares fue aquel que resultó estable fisicoquímicamente durante el mayor tiempo posible en el medio dispersante. Además, dicho aceite no debió presentar interacciones químicas con los tensoactivos seleccionados. Finalmente, se consideraron también las propiedades organolépticas y de seguridad, haciendo al excipiente aceptable para su uso como excipiente farmacéutico en veterinaria.

En lo que respecta a los aceites de almendras, coco, papa, olivo y canola se observó cambio de coloración de un amarillo ligero a uno de mayor intensidad, signo claro de la oxidación de los mismos. De todos los aceites probados, el aceite de ricino y la vitamina E fueron los que durante todo el periodo de estudio conservaron tanto sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas como las de la curcumina. Esto puede ser debido a la mejor encapsulación y la uniformidad de la cubierta polimérica y a las propiedades intrínsecas como antioxidantes, en el caso de la vitamina E [74].

Con el fin de mantener la estabilidad de las nanocápsulas y reducir el número de componentes necesarios para la formulación se analizaron las ventajas y desventajas del aceite de ricino y la vitamina E. La Tabla 12 muestra las características del aceite de ricino y la vitamina E considerados para la selección del núcleo oleoso óptimo.

Tabla 12 *Propiedades del Aceite de Ricino y Vitamina E consideradas para la selección de núcleo lipófilo para las nanocápsulas cargadas de curcumina.*

Factor	Aceite de ricino	Ref.	Vitamina E	Ref.
Costo	1, 108 MXP (1 Litro)	[111]	4, 408 MXP (525 ml)	[112]
Estabilidad	El aceite de ricino es estable y no se arranca a menos que se someta a un fuerte calentamiento. A una temperatura de calentamiento de 300 °C comienza a polimerizarse.	[104, 113]	La exposición a la luz UV y al oxígeno provoca la lenta descomposición de la vitamina E. La vitamina E es estable al calentamiento en ausencia de oxígeno, a los ácidos fuertes y a la luz visible. Se debe evitar el contacto con álcalis y agentes oxidantes.	[114]
Toxicidad	La administración oral de aceite de ricino puede provocar náusea, vómito, cólico y diarrea. La LD50 (rata) >4950 mg/kg.	[115]	La administración de grandes cantidades de Vitamina E puede provocar hepatotoxicidad, fatiga, debilidad, dolor de cabeza, náusea, diarrea, y dolor abdominal. La LD50 (ratón) >4000 mg/kg	[116]

En este sentido, se seleccionó al aceite de ricino como el más adecuado para la formulación de las nanocápsulas, principalmente por la mayor estabilidad de este aceite que se ve reflejado en la también mayor estabilidad de la primera formulación, y por las ventajas de facilidad de manejo que nos permite exponerlo al aire y al calor sin efectos en las propiedades físicas y químicas del aceite; y finalmente el mucho menor costo del aceite de ricino comparado con la vitamina E. Así, para el resto de los ensayos, la formulación contuvo como núcleo oleoso al aceite de ricino.

Selección del tipo de tensoactivo

Otro factor de importancia durante la etapa de formulación fue la selección de los tensoactivos. En este caso, se comparó la actividad de estabilización de la lecitina y el Cremophor EL® en combinación con Span 40®.

La lecitina mostró una reducida capacidad para estabilizar el núcleo lipófilo. Aunada a la reducida estabilidad de las nanocápsulas producidas con el uso de este tensoactivo, se hizo visible una gran complicación desde el punto de vista tecnológico, pues la naturaleza y las propiedades químicas de la lecitina con que se trabajó, complicó la solubilización de la misma, caso contrario a lo encontrado en la literatura con lecitinas menos purificadas y con mejor solubilidad en etanol [117]. Para evitar problemas técnicos, se realizó un cambio en la formulación original utilizando la mezcla de tensoactivos no iónicos Span 40® y Cremophor EL®.

Los surfactantes o tensoactivos no iónicos presentan además importantes ventajas en lo que respecta a compatibilidad con la mayoría de los excipientes usados en formulaciones farmacéuticas, estabilidad y baja toxicidad, ya que al no existir interacciones electrostáticas se reduce considerablemente la probabilidad de otro tipo de interacciones físicas o químicas que puedan comprometer la integridad de las formulaciones [118]. La mezcla propuesta de Span 40® y Cremophor EL® facilitó el proceso de preparación y dio lugar a sistemas más estables. Las ventajas aportadas por el uso de este par de tensoactivos desde el punto de vista de estabilidad serán discutidas más adelante.

Determinación de los componentes y proporciones dentro de la formulación

Con la mezcla de tensoactivos Cremophor EL® y Span 40®, se procedió a realizar un barrido de condiciones para buscar la proporción adecuada en la que estos estabilizantes conducían a la obtención de nanosistemas. Para esto, los niveles para cada uno de los componentes (factores) se establecieron arbitrariamente según la información documental y los resultados de las pruebas preliminares.

La concentración de poloxamero 188 se controló a una que permitiera la acción de este como estabilizante de la superficie y no como emulsificante principal [104]. Con la adición de poloxamero 188 también se persiguió disminuir la tensión interfacial entre el agua y el aceite. Este efecto es importante durante el proceso porque facilita que las partículas de aceite se dividan en otras más pequeñas y adquieran el tamaño nanométrico deseado [74].

Como se mencionó en los métodos, se obtuvieron diferentes formulaciones con diversas condiciones. La caracterización física de estas formulaciones se llevó a cabo tomando como

variables de respuesta el tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial ζ , pH final de la formulación y la estabilidad física. El volumen final de cada formulación fue de 25 ml.

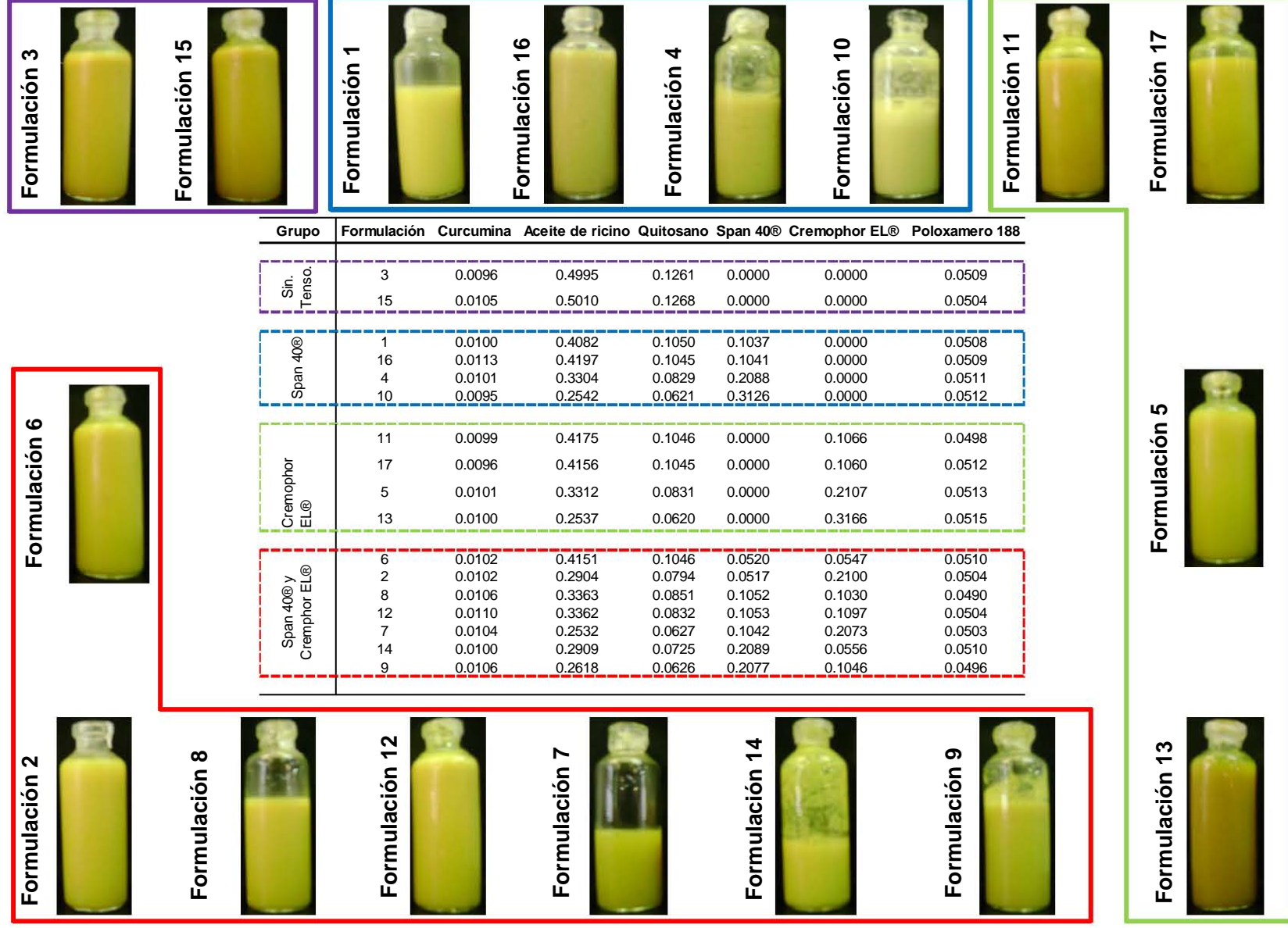
Como una primera aproximación, se calificó únicamente la apariencia física de las nanocápsulas obtenidas, evaluando principalmente la aparición de efecto Tyndall² [119] para identificar sistemas coloidales, que se evaluó al diluir la muestra. Se muestra en la Figura 26 una imagen de cada uno de los sistemas a manera de referencia visual. Nuevamente, fue fácil identificar diferentes tonalidades de amarillo, debido a la diferencia en el tamaño de partícula de las nanocápsulas. Este mismo cambio de tamaño es una de las causas responsables de las variaciones en la estabilidad de los sistemas. Los fenómenos de inestabilidad de las nanocápsulas finalmente se manifestaron en una separación de fases o formación de flóculos, clara evidencia del tamaño macro de las gotículas de aceite presentes y un exceso de tensoactivos.

En este contexto, se pudo observar que el sistema 7 fue el que mejor conservó su apariencia original (amarillo-opalescente), sin presentarse fenómenos de separación de fases ni formación de flóculos, además, basándonos en la coloración se puede pensar que la curcumina permaneció estable durante el tiempo que duró el estudio. Otra de las características de esta formulación, para considerar la proporción de excipientes y sus condiciones de preparación como viables, fue el marcado efecto Tyndall que se presentó tras la dilución de la muestra. Los estudios de caracterización, a nivel nanométrico, de esta formulación arrojaron resultados positivos postulándola como la formulación óptima con los excipientes propuestos para la administración de curcumina.

Estas propiedades de las nanocápsulas coinciden con las obtenidas por Zanotto-Filho y col. [120], quienes obtuvieron nanocápsulas recubiertas con poli (ϵ -caprolactona) cargadas de curcumina por el método de deposición interfacial, con tamaños de partícula alrededor de los 200 nm y una coloración opalescente y amarilla. Esto es una buena aproximación, ya que en nuestro caso el método empleado es libre de solventes orgánicos y la tecnología utilizada presenta una mayor facilidad de escalamiento.

² Las partículas coloidales poseen la propiedad de reflejar y refractar la luz. El efecto Tyndall es aquel que se lleva a cabo por la dispersión de un haz de luz por partículas coloidales. Este fenómeno es más intenso cuanto menor sea la longitud de onda del rayo incidente y cuanto mayor sea el tamaño de las partículas coloidales.

Figura 26 Composición y apariencia física de las formulaciones producidas.



En la siguiente tabla se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica de cada uno de experimentos realizados:

Tabla 13 Características físicas y de superficie después de 24 horas de la preparación de las formulaciones obtenidas.

Grupo	Formulación	Diámetro Promedio (d.nm)	Pdl	pZ (mV)	pH
Sin tensoactivos	3	1201	0.587	66.9	4.03
	15	879.7	0.582	64.8	4.13
Cremophor EL®	11	507.9	0.543	35.2	4.02
	17	697.5	0.745	31.2	4.01
	5	346.4	0.425	31.6	3.89
	13	217.2	0.297	30.3	3.83
Span 40®	1	2363	0.152	63.6	4.01
	16	3528	1	63.4	4.01
	4	7981	0.569	63.6	3.93
	10	3333	0.02	66	3.84
Span 40® y Cremophor EL®	6	1336	0.381	61.1	3.99
	2	217.8	0.282	55.4	3.89
	8	655.3	0.516	65.7	3.96
	12	350.1	0.539	64.8	3.93
	7	168.9	0.377	55.7	3.80
	14	2726	0.662	62.3	3.85
	9	1361	0.929	61.3	3.81

Para obtener un modelo matemático que explique el comportamiento de cada una de las variables de respuesta en función de los componentes en la formulación se utilizó la

aproximación de los Modelos Lineales Generales³ [121, 122]. El procedimiento de modelos lineales generalizados consiste en construir un modelo estadístico que describa el impacto de uno o más factores X en una o más variables dependientes Y [123].

El tratamiento estadístico se llevó a cabo utilizando las variables en su forma codificada con el fin de obtener influencias no dimensionales.

Tabla 14 Factores codificados y niveles del experimento de exploración.

Factor	Unidades	Nivel	
		Mínimo (-1)	Máximo (+1)
Cantidad de aceite de ricino (A)	g	0.25	0.5
Cantidad de span 40® (S)	g	0	0.3125
Cantidad de Cremophor EL® (C)	g	0	0.3125

Nuevamente, las variables de respuestas fueron las características de tamaño y superficie de las nanocápsulas.

En sistemas nanoparticulados, el tamaño de partícula es un aspecto crítico, que debe ser controlado y caracterizado debido a que partículas con tamaños mayores a 1 μm son retenidos por las placas de Peyer⁴ [124]. Nanopartículas de hasta 200 nm son más adecuadas para la administración vía oral debido a que difunden sistemáticamente permitiendo de esta manera su absorción [82, 125]. Además, el tamaño de partícula juega un papel de vital importancia respecto a la estabilidad de los sistemas, ya que al disminuir el tamaño mayor es la entalpía de los sistemas, conduciendo a sistemas termodinámicamente más inestables y con ello al uso de mayor cantidad de tensoactivos. La Tabla 15 muestra el análisis de varianza del modelo estimado para la variable de respuesta 1/tamaño de partícula.

³En estadística, el modelo lineal generalizado (MLG) es una flexible generalización de la regresión de mínimos cuadrados ordinaria. Relaciona la distribución aleatoria de la variable dependiente en el experimento con la parte sistemática (no aleatoria) a través de una función llamada la función de enlace.

⁴ Las Placas de Peyer son nódulos linfáticos que se localizan en la lámina propia del intestino delgado. Estos nódulos poseen una estructura con un centro constituido principalmente por linfocitos B, una periferia por linfocitos T y macrófagos.

Tabla 15 Análisis de Varianza para 1/Tamaño de partícula

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	4.864E-5	9	5.4044E-6	115.40	<u>0.0000</u>
Residuo	2.80991E-7	6	4.68319E-8		
Total (Corr.)	4.8921E-5	15			

Los resultados del análisis de varianza, muestran un valor- $p < 0.05$ indicando que al menos un factor en el modelo esta significativamente relacionado con la variable dependiente (1/tamaño de partícula). La R^2 indica que el modelo ajustado explica el 99.4256 por ciento de la variabilidad de 1/Tamaño de partícula.

La ecuación obtenida para describir el inverso de la respuesta (1/Tamaño de partícula) es entonces:

$$1/Tamaño\ de\ partícula = -0.000510412 - 0.00998907*A - 0.00892425*S - 0.0183593\ A*S - 0.0117318*A*C - 0.0101974*S*C - 0.0111709*A*S*C + 0.00606726*A^3 + 0.0061911*S^3 + 0.00604668*A^3*S.....\ Ec.\ 2$$

Donde A es el aceite de ricino, S es el Span 40® y C es el Cremophor EL®.

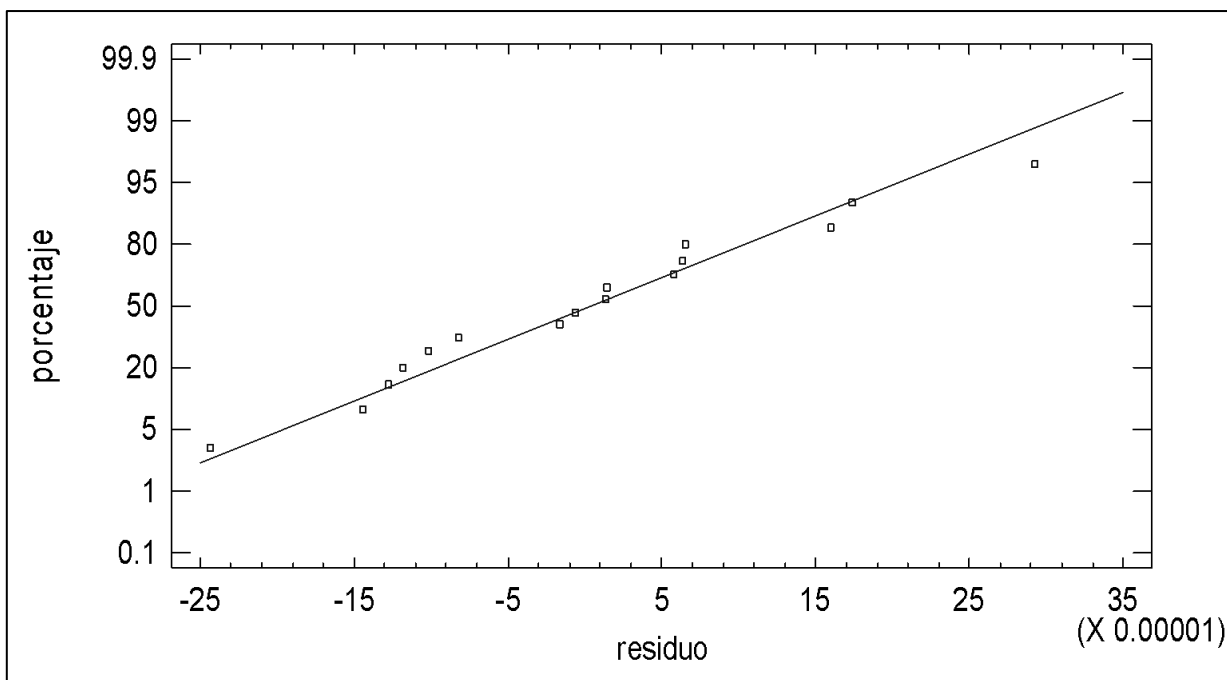


Figura 27 Gráfico de probabilidad normal para $1/\text{Tamaño de partícula}$.

En la Figura 27 se muestra el Gráfico de probabilidad normal para el inverso de tamaño de partícula. Este tipo de gráfico nos permite establecer si los residuales (valor experimental-valor estimado por el modelo) están asociados a errores sistemáticos o errores aleatorios. Se espera que los residuales estén asociados a errores aleatorios porque implica que los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales establecidas no tienen sesgo, por lo que pueden descartarse fallas sistemáticas en los procesos de operación. Si se demuestra que los residuos se ajustan a la distribución normal, que es la que con mayor frecuencia describe fenómenos reales; se considera que los datos son confiables y por lo tanto también el modelo obtenido. El gráfico obtenido en este caso, señala que la tendencia de los resultados puede ser completamente descrita con el modelo obtenido, ya que los residuales se ajustan a una distribución normal.

Complementario a esta observación, se analizó el comportamiento de los residuales en el experimento (Figura 28). En este caso, se observó que no existe ninguna tendencia en la distribución de los residuos. Sin embargo, existen tres puntos aberrantes para los cuales se sugiere en un trabajo subsecuente su reevaluación.

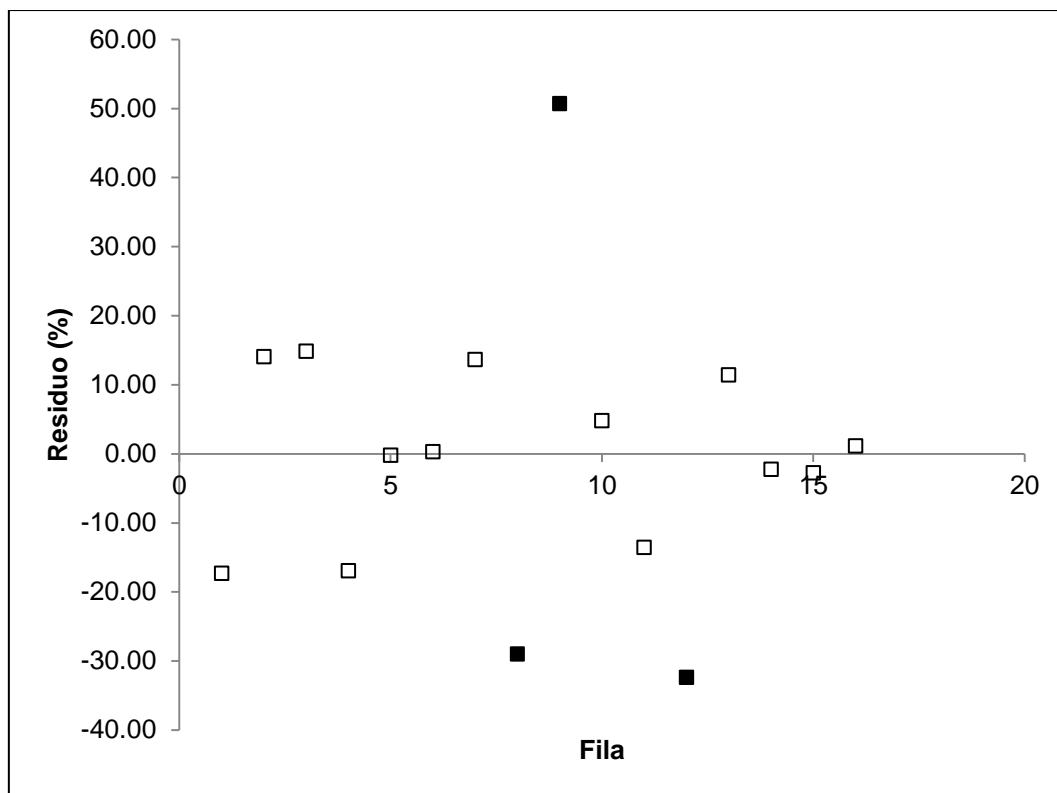


Figura 28 Gráfico de residuos para 1/Tamaño de partícula.

Con la finalidad de identificar los factores que tienen un menor nivel de significancia ($p < 0.05$), lo cual implica que tiene una probabilidad mayor a 0.95, se realizó un análisis de la suma de cuadrados que se muestra en la Tabla 16. Se observa que el Span 40® y el aceite de ricino son los factores que poseen una mayor probabilidad de influencia en el tamaño de las nanocápsulas. Las probabilidad de influencia de las interacciones entre los factores estudiados son también importantes, destacando las existentes entre el Aceite de ricino y el Span 40®, seguida de la interacción entre el aceite de ricino y el Cremophor EL®. Esta conclusión es lógica, pues el tamaño de partícula depende principalmente de la estabilización de las gotículas de aceite y no del aceite per se. Dicha estabilización se alcanza con la disminución de la tensión interfacial debida a la presencia de los dos tensoactivos, que de acuerdo al análisis también interaccionan entre ellos para modificar el tamaño de partícula.

Tabla 16 Resultados del análisis de la Suma de Cuadrados Tipo III para el inverso de tamaño de partícula.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón -F	Valor-P
Aceite de ricino	1.0223E-5	1	1.0223E-5	218.29	0.0000
Span 40	1.19405E-5	1	1.19405E-5	254.96	0.0000
Aceite de ricino*Span 40	5.5176E-6	1	5.5176E-6	117.82	0.0000
Aceite de ricino*Cremophor EL	5.4835E-6	1	5.4835E-6	117.09	0.0000
Span 40*Cremophor EL	4.1136E-6	1	4.1136E-6	87.84	0.0001
Aceite de ricino*Span 40*Cremophor EL	4.5665E-6	1	4.5665E-6	97.51	0.0001
Aceite de ricino^3	4.6898E-6	1	4.6898E-6	100.14	0.0001
Span 40*Span 40*Span 40	7.6667E-6	1	7.6667E-6	163.71	0.0000
Aceite de ricino*Aceite de ricino*Aceite de ricino*Span 40	2.9909E-6	1	2.9909E-6	63.86	0.0002
Residuo	2.80991E-7	6	4.68319E-8		
Total (corregido)	4.8921E-5	15			

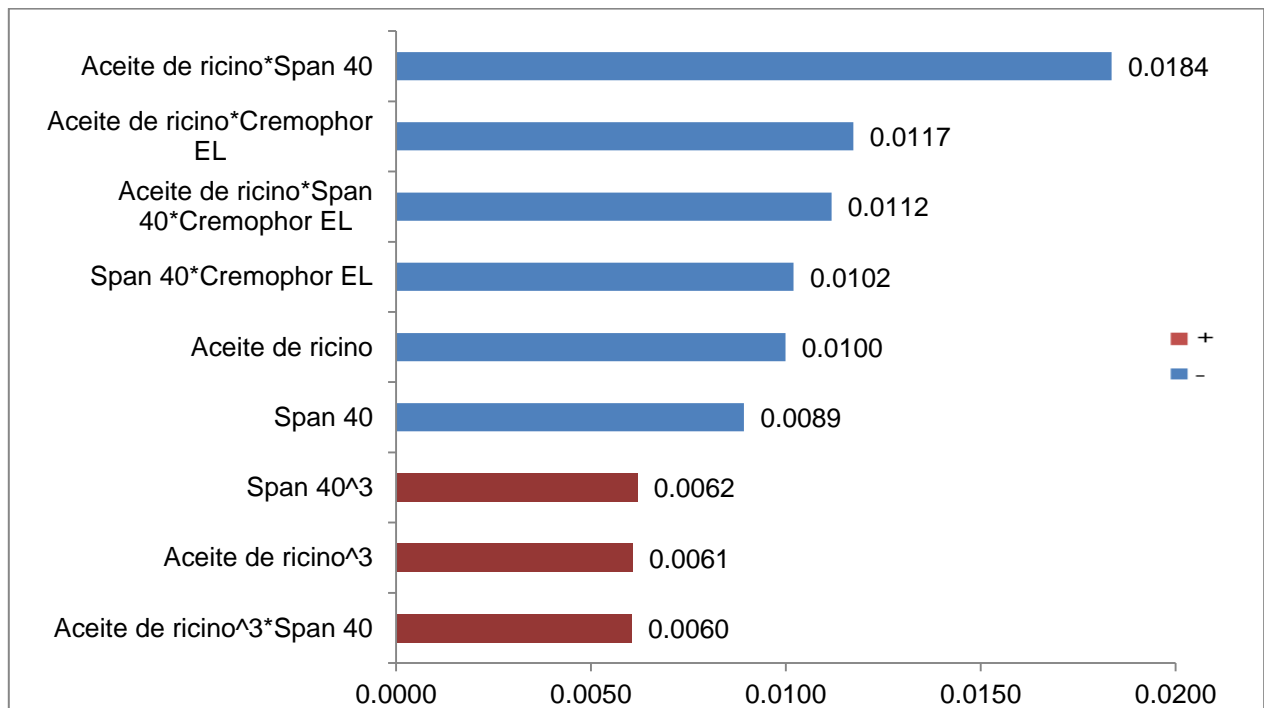


Figura 29 Diagrama de Pareto para el inverso de tamaño de partícula.

Comparación de las variables que afectan al inverso del tamaño de tamaño de partícula. Los valores que se muestran corresponden a los coeficientes en la ecuación de las variables mostradas. Cada efecto tiene un nivel de significancia ($p < 0.05$)

En la Figura 29 se observa el peso de la influencia de los factores implicados en el modelo determinado sobre la respuesta de tamaño de partícula que en este caso se transformó al inverso del tamaño de partícula para facilitar la obtención del modelo matemático. El factor que tiene una influencia preponderante sobre el inverso del tamaño de partícula es la interacción del aceite de ricino y Span 40® y además observamos que los factores que le siguen en importancia también están relacionados con el aceite de ricino y el Span 40®, por lo tanto en base a esto deducimos que estos dos componentes de la formulación son los que están determinando el comportamiento del tamaño de partícula de la formulación.

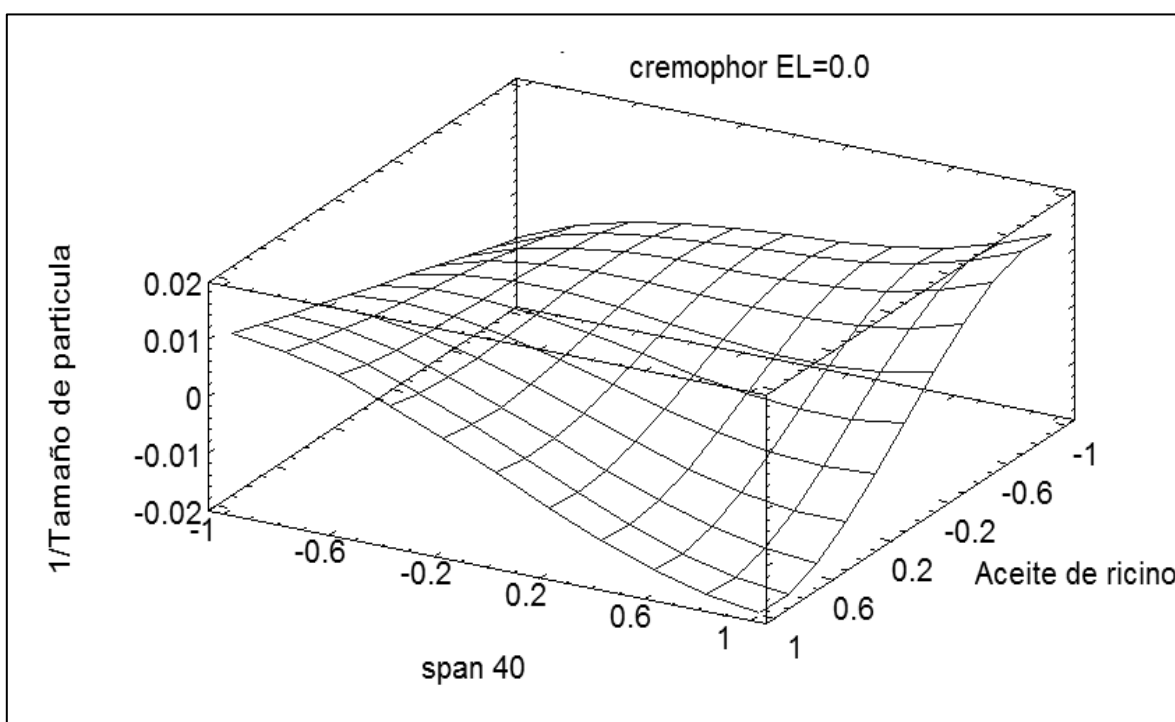


Figura 30 Gráfico de superficie de respuesta para 1/Tamaño de partícula.

La figura muestra el gráfico de superficie de respuesta de los factores Aceite de ricino-Span 40 obtenido con el modelo ajustado.

Previo al análisis de la Figura 30, se debe aclarar que para este experimento valores negativos no tienen un significado práctico y en este caso se atribuyen al error de predicción del modelo generado por lo que no se consideran válidos.

La Figura 30 relaciona los factores Aceite de ricino-Span 40®, que según el análisis estadístico, Figura 29, son los factores más influyentes en el tamaño de partícula de las nanocápsulas producidas. Se observa que el aumento de concentración de aceite de ricino

y Span 40® en la formulación genera, en ambos casos, un aumento considerable en el tamaño de partícula. Este último fenómeno se debe a la inestabilidad física de las formulaciones producidas cuando se aumenta la concentración de ambos excipientes.

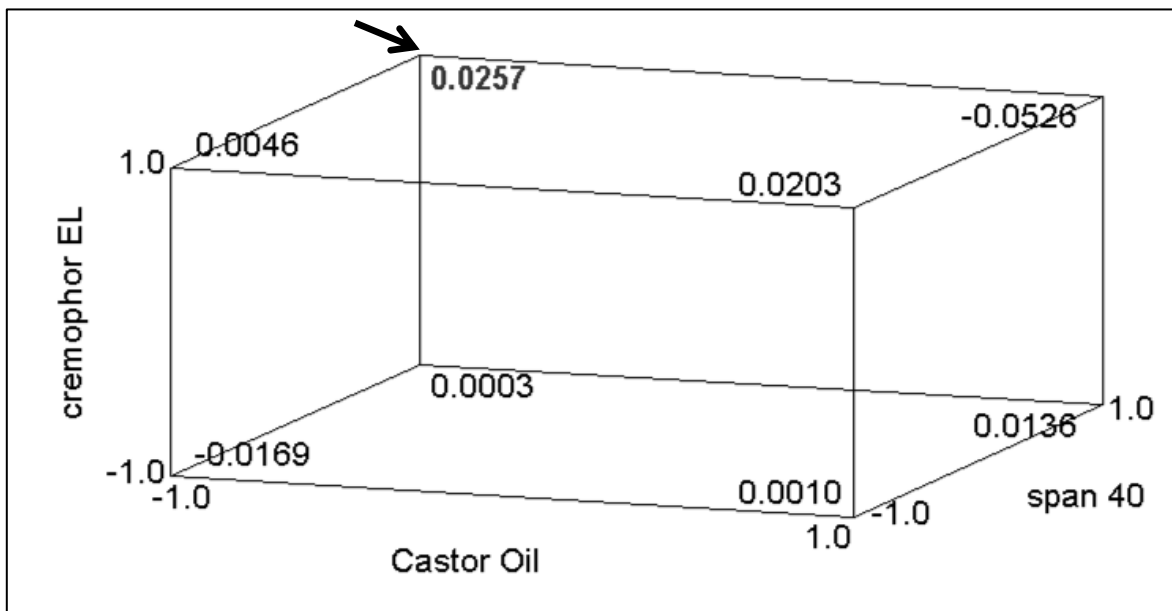


Figura 31 Gráfico cúbico de respuesta para 1/Tamaño de partícula.

En rojo se señala el valor mínimo de tamaño de partícula y el vértice que representa la combinación de cada uno de los componentes que según el modelo matemático da lugar a este resultado.

En la Figura 31 se puede observar que, para minimizar el tamaño de partícula, es necesario emplear la menor concentración de Aceite de ricino (0.25 g) y la mayor concentración de Span 40® (0.3125 g) y Cremophor EL® (0.325 g). Por otra parte, se observó también que el uso de Cremophor EL® como único tensoactivo a la mayor concentración, dio lugar a nanocápsulas de tamaño menor que, según los datos experimentales oscilaban entre 200 y 700 nm aproximadamente. Los tamaños de partícula obtenidos con el uso de este tensoactivo en la formulación fueron menores que aquellos sistemas que no poseían algún tensoactivo y a los que únicamente poseían Span 40® como agente estabilizante y se distinguió que a mayor concentración de Cremophor EL® el tamaño de partícula era menor, sin que esto significara que la estabilidad de los sistemas era mayor.

El modelo experimental, como se discutió anteriormente, demostró que al emplear la máxima concentración de Cremophor EL® y Span 40 se minimiza el tamaño de partícula. Sin embargo, se observó experimentalmente que las formulaciones donde la concentración

de Cremophor EL® era mayor con respecto a la de Span 40® los sistemas tenían tamaños de partícula dentro del rango considerado aceptable, y eran físicamente estables. Por su parte en los sistemas donde la proporción de Span 40® era mayor con respecto al Cremophor EL®, el tamaño de partícula tendía a incrementar y la estabilidad física disminuía claramente debido a la formación de flóculos.

La caracterización de los experimentos realizados dio lugar a resultados positivos sobre la base de composición de la formulación 7, el cual demostró ser físicamente estable a lo largo del tiempo. El tamaño de partícula de este sistema fue aproximadamente de 169 nm con un índice de polidispersión de 0.377. Durante la investigación bibliográfica se encontraron reportadas nanopartículas recubiertas con diferentes polímeros, como quitosano, alginato, policaprolactona y polibutilcianoacrilato cargadas con curcumina de tamaños de partícula de entre 100 y 400 nm y con índices de polidispersión menores a 0.3 lo que indica una distribución de tamaño de partícula unimodal [120, 126-129]. Se observa que el tamaño de partícula de la formulación elegida se encuentra dentro del rango de tamaño nanométrico en que diferentes investigadores han producido nanopartículas de curcumina con fines distintos. No obstante, comparando los sistemas obtenidos con aquellos reportados en la literatura se observa que el índice de polidispersión es mayor en nuestros sistemas, probablemente por el tipo de tecnología aplicada.

El índice de polidispersión es una medida de la anchura de la distribución del tamaño de las nanopartículas y es un aspecto muy importante, desde el punto de vista teórico en la caracterización de las nanopartículas [82]. A continuación se observa el análisis de varianza para el log (Pdl):

Tabla 17 Análisis de Varianza para log (Pdl)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	9.9488	5	1.9898	308.80	0.0000
Residuo	0.0451	7	0.0064		
Total (Corr.)	9.9939	12			

Los resultados del análisis de varianza para la transformación log (Pdl) en la Tabla 17 muestra un valor-P menor que 0.05, que a un nivel de confianza del 95% indica que al

menos un factor en el modelo esta significativamente relacionado con la variable dependiente. La R^2 indica que el modelo ajustado explica el 99.5487 por ciento de la variabilidad de log (Pdl).

La ecuación que mejor describe la respuesta log (Pdl) es:

$$\text{Log (Pdl)} = -0.37544 + 0.483695*S - 0.359062*A*S - 2.21478*S^2 - 2.37408*S^3 + 0.202112*A^2*S \dots \text{Ec. (3)}$$

Dónde, A es el aceite de ricino, S es el Span 40 y C el Cremophor EL.

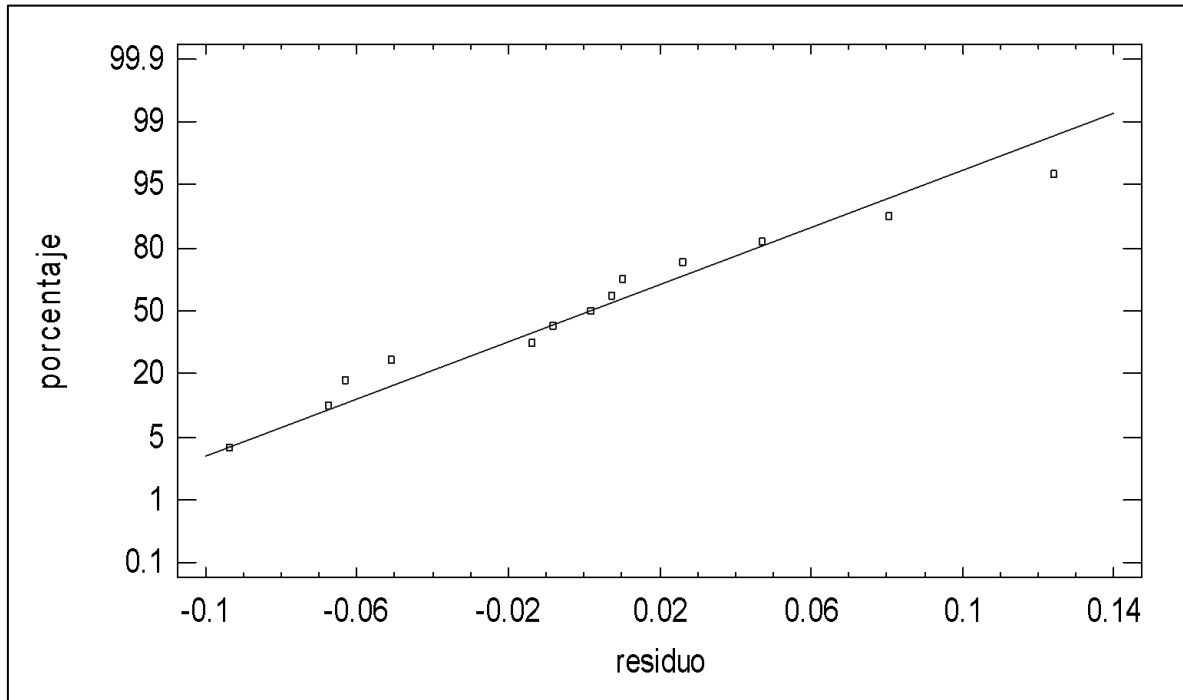


Figura 32 Gráfico de probabilidad normal para log (Pdl).

En la Figura 32 se muestra el Gráfico de probabilidad normal para el log (Pdl). De la misma manera que en la variable de respuesta tamaño de partícula se espera que los residuales (valor experimental-valor estimado por el modelo) se ajusten a la distribución normal que significa que estos se encuentran asociados a errores aleatorios y por lo tanto no existe sesgo que pueda asociarse a fallas sistemáticas en los procesos de operación, por lo que los resultados son confiables. El gráfico obtenido en este caso, señala que la tendencia de

los resultados puede ser completamente descrita con el modelo obtenido, ya que la mayoría de ellos sigue a la distribución normal.

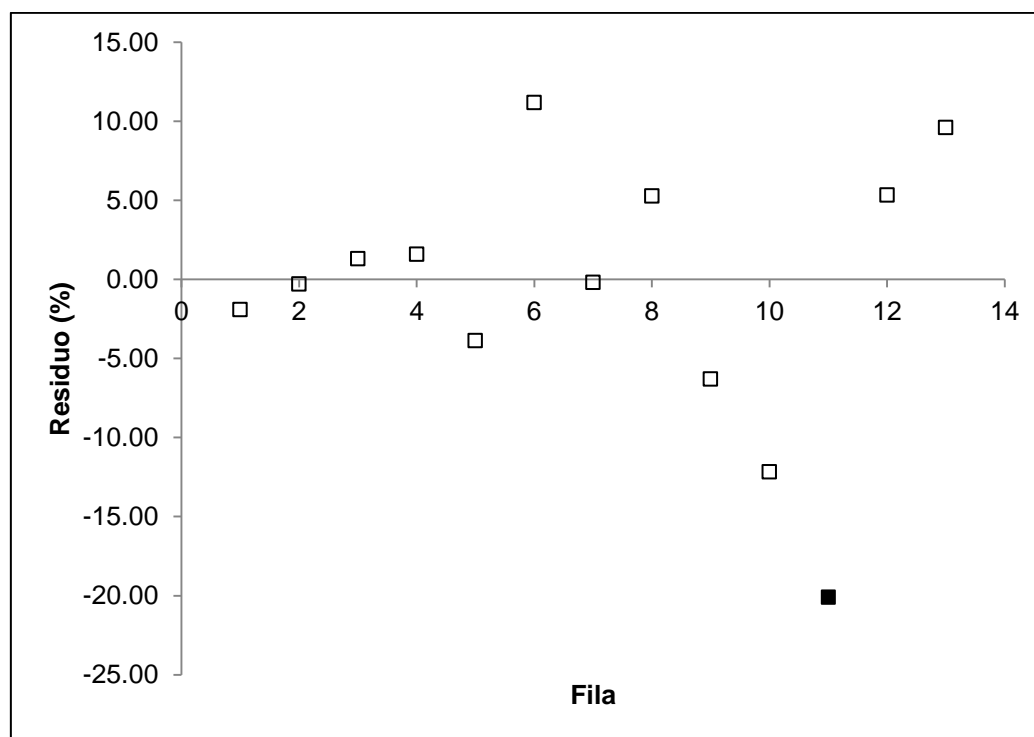


Figura 33 Gráfico de residuos para log (Pdl).

En la Figura 33, que muestra los residuales en función del experimento realizado, se observa que no existe ninguna tendencia en la distribución de los datos. Sin embargo, se observan al menos un punto aberrante, identificado por el saturado color negro, y que corresponde al experimento 11 de los datos analizados. Se sugiere la reevaluación de esta propiedad en un trabajo subsecuente.

El análisis de la suma de cuadrados de la Tabla 18 muestra que el Span 40® es el factor que, con un nivel de significancia ($p < 0.05$), posee la mayor probabilidad de afectar el índice de polidispersión de las nanocápsulas puesto que aparece como único factor e incluso se considera en las interacciones entre los factores. Al igual que en el análisis realizado para el tamaño de partícula esta conclusión es lógica, pues el tamaño de partícula depende principalmente de la estabilización de las gotículas de aceite y no del aceite per se. Como se ha mencionado anteriormente, la estabilización de las nanocápsulas se alcanza con la disminución de la tensión interfacial debida a la presencia de los tensoactivos y su deposición sobre la superficie de la gotícula de aceite, y según este análisis el Span 40 tiene

particular importancia en el proceso. Más adelante se analizará la relación entre el nivel de concentración de Span 40 y las variaciones en el tamaño de partícula e índice de polidispersión observadas.

Tabla 18 Suma de Cuadrados Tipo III para log [Pdl].

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Span 40	0.1303	1	0.1303	20.23	0.0028
Aceite de ricino*Span 40	0.4167	1	0.4167	64.67	0.0001
Span 40*Span 40	5.7241	1	5.7241	888.37	0.0000
Span 40*Span 40*Span 40	2.3297	1	2.3297	361.56	0.0000
Aceite de ricino*Aceite de ricino*Span 40	0.0423	1	0.0423	6.56	0.0375
Residuo	0.0451	7	0.0064		
Total (corregido)	9.9939	12			

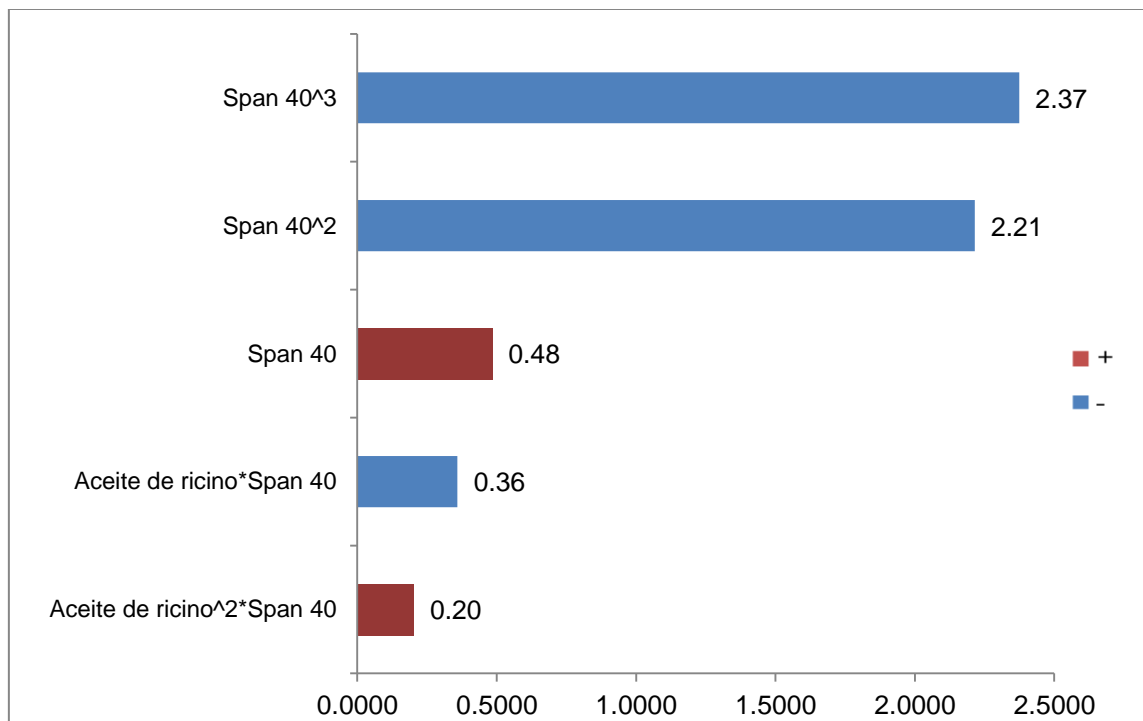


Figura 34 Diagrama de Pareto para el log (Pdl).

Comparación de los factores que afectan al log (Pdl). Los valores que se muestran corresponden a los coeficientes en la ecuación de las variables mostradas. Cada efecto tiene un nivel de significancia ($p < 0.05$).

En la Figura 34 se observa que el Span 40® es el factor que posee una mayor influencia en el control tanto del tamaño de partícula como del índice de poli dispersión. En este gráfico se observa que el Span 40® elevado a diferentes potencias es el factor de mayor peso. En este caso las interacciones con aceite de ricino poseen un efecto menos marcado que en la respuesta anterior, mientras que el Cremophor EL® parece no afectar significativamente esta variable de respuesta pues no se considera en el modelo matemático obtenido.

El análisis completo de esta variable de respuesta, el índice de polidispersión, debe considerar que el tamaño de partícula y su distribución están influenciados no solo por la proporción de los componentes que se emplean en la formulación, sino también por los fenómenos de inestabilidad que se presentan en la mayoría de los experimentos y que en todos los casos son procesos completamente aleatorios que afectan significativamente los resultados de esta respuesta y que no se pueden controlar experimentalmente.

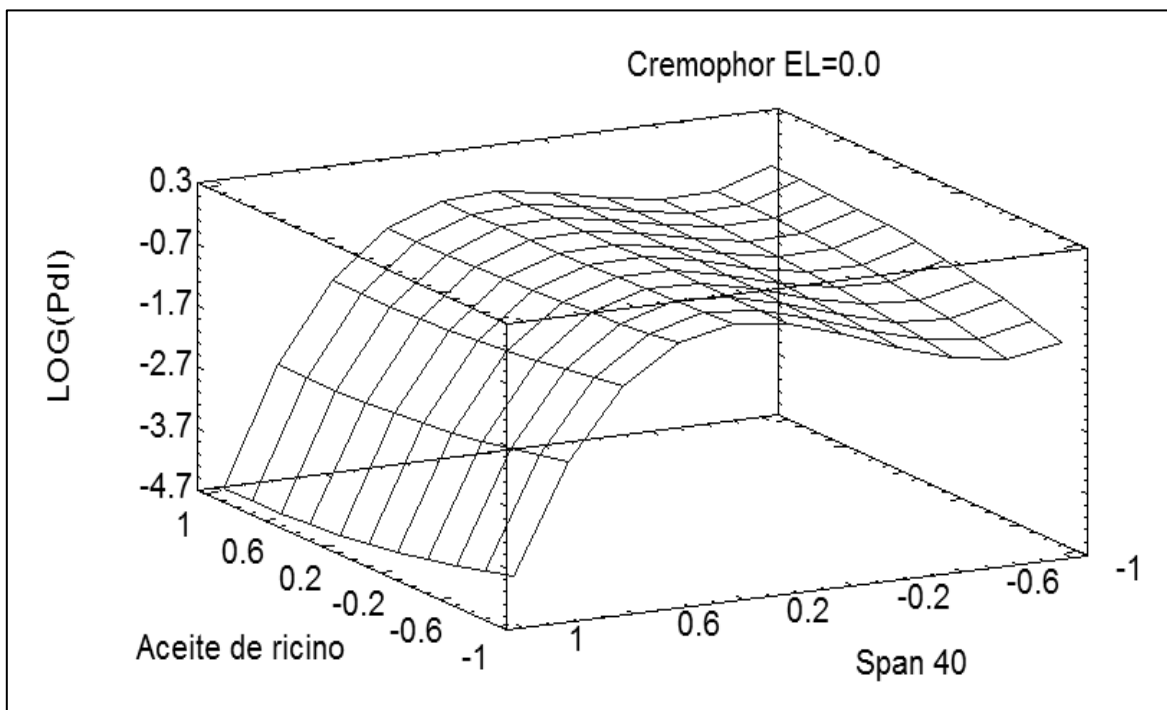


Figura 35 Gráfico de superficie de respuesta para log [Pdl].

La figura corresponde al gráfico de superficie de respuesta de los factores Aceite de ricino-Span 40 obtenido con el modelo ajustado.

De acuerdo a la Figura 35, a un nivel intermedio de concentración de Cremophor EL® el uso de una mayor cantidad de Span 40® da lugar a índices de polidispersión menores en ambos

niveles de concentración de aceite de ricino (nivel máximo o mínimo). Sin embargo, experimentalmente se observó que el uso de grandes cantidades de Span 40® da lugar a sistemas inestables, que transcurrido el tiempo presentan incluso fenómenos de separación de fases, probablemente por la producción de micelas de Span 40® que se forman a altas concentraciones de este agente estabilizante.

Para el análisis de los dos grupos restantes, Cremophor EL® y la mezcla de tensoactivos Span 40® y Cremophor EL®, se presenta la siguiente tabla con las medidas de dispersión de cada grupo.

Tabla 19 Promedio y desviación estándar de Pdl para cada grupo.

Grupo	Índice de polidispersión			
	\bar{x}	Desv. Est.	Máximo	Mínimo
Sin tensoactivos	0.5845	0.0035	0.587	0.582
Cremophor EL	0.5025	0.1903	0.745	0.297
Span 40	0.4353	0.2866	1	0.02
Mezcla de tensoactivos	0.5266	0.2175	0.929	0.282

Como se observa en la Tabla 19, en los experimentos donde se utilizó Span 40® como único tensoactivo se observaron índices de polidispersión menores, seguido del Cremophor EL®, la mezcla de tensoactivos (Cremophor EL® y Span 40®) y finalmente los experimentos llevados a cabo sin el uso de tensoactivos.

Sin embargo, la desviación estándar de los resultados obtenidos es mayor al hacer uso de Span 40® como único agente estabilizante. Como se ha indicado, el uso de grandes cantidades de Span 40® da lugar a sistemas inestables que tienden a formar flóculos. Cuando se hace uso de tensoactivos para estabilizar emulsiones o sistemas coloidales, solo una fracción de la cantidad total agregada del tensoactivo forma una capa que rodea a la gota de aceite; mientras que la cantidad restante permanece en la fase acuosa formando micelas. Las micelas son agregados de moléculas de tensoactivos en las cuales las cadenas no polares se posicionan hacia el interior mientras que los grupos polares forman el exterior de las micelas.

La concentración total de tensoactivo adicionado y su distribución en la superficie de las gotículas de aceite y las micelas tienen un impacto significativo en la distribución de las moléculas y partículas dentro de un sistema coloidal y en este trabajo experimental en particular es probable que las micelas de Span 40® hayan funcionado como agente floculante. El Span 40® (Figura 20) posee grupos polares –OH que le aportan a la molécula una carga parcialmente negativa. En consecuencia, las micelas que en solución forma el Span 40® poseerán esta misma carga parcial negativa sobre su superficie.

Debido al alto valor positivo de potencial ζ que presentó la superficie cubierta de quitosano de las nanocápsulas que poseían Span 40® como único agente estabilizante, las fuerzas de repulsión entre las nanocápsulas era mayor que las fuerzas de atracción por lo que estaban estabilizadas electrostáticamente evitando la agregación entre ellas pero no con las micelas de Span 40®, cuya carga superficial de signo opuesto a la carga superficial de la nanocápsula provocó que atrajeran a las nanocápsulas permitiendo que a cierta concentración de micelas de Span 40® las nanocápsulas se aproximaran más entre sí y formaran agregados denominados flóculos (Figura 36). El fenómeno de floculación precede en muchas ocasiones al de coalescencia que es un fenómeno de estabilidad grave en emulsiones y sistemas coloidales [74, 118]. El tamaño final de estos flóculos y la distribución de su tamaño es un fenómeno que no se puede controlar.

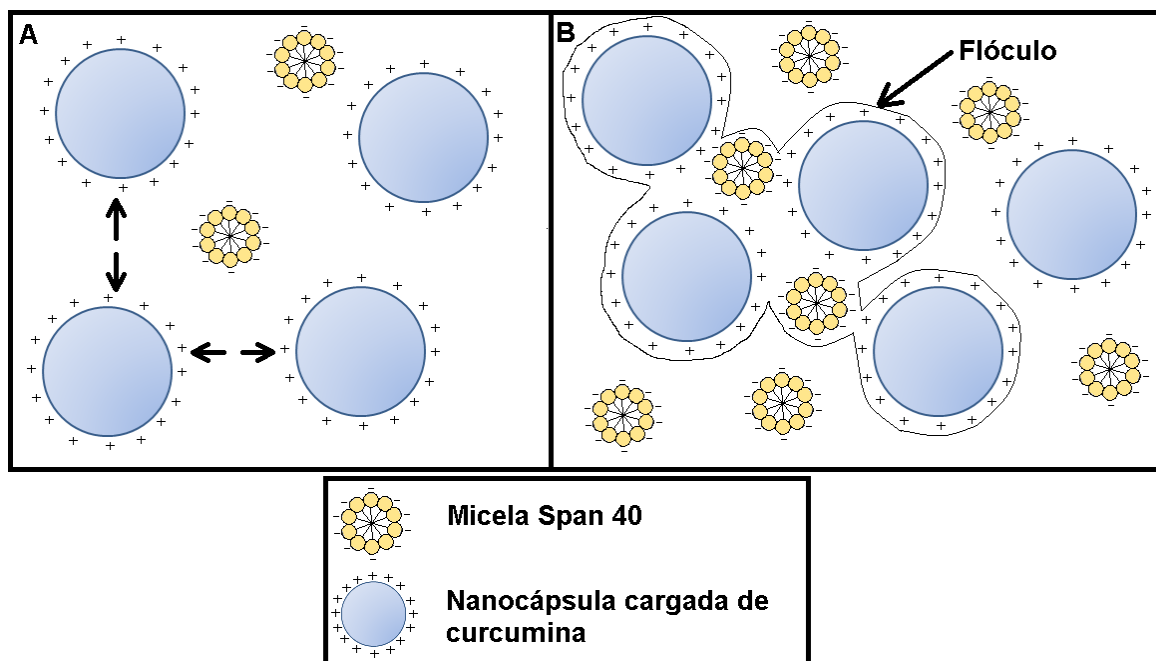


Figura 36 Representación esquemática de la floculación de nanocápsulas cargadas de curcumina y cubiertas con quitosano.

En la figura A las flechas representan la repulsión entre partículas dada por la carga superficial positiva de estas, que favorece su estabilidad. Se observa que la concentración de micelas de Span 40® en la Figura B es mayor generando atracción con las nanocápsulas y dando lugar a la formación de floculos.

El análisis realizado anteriormente del tamaño de partícula de cada uno de los experimentos, demostró que el uso de Cremophor EL® a concentraciones mayores daba lugar a tamaños de partícula menores. Sin embargo, el análisis del índice de polidispersión deja ver que, en promedio, la distribución de tamaño de partícula generada por el uso de este tensoactivo no es uniforme lo que se refleja en valores de índices de polidispersión mayores a 0.3.

Por otra parte, aunque la mezcla de ambos tensoactivos, Span 40® y Cremophor EL®, dentro de las diferentes formulaciones dio lugar a un experimento (Formulación 2) que mostró un tamaño de partícula de 217.8 nm y un índice de polidispersión con un valor de 0.282, menor de 0.3 que corresponde al límite aceptable, se distinguieron en la mayoría de los casos distribuciones de tamaño de partícula no uniformes (Tabla 13). Es importante aclarar que la Formulación 2 no fue físicamente estable a lo largo del tiempo.

De manera experimental, la no uniformidad en el tamaño de partícula se atribuyó principalmente a dos causas relacionadas, la primera con el proceso de obtención de las nanocápsulas y la segunda, ya mencionada, se relaciona con la concentración de los tensoactivos, principalmente Span 40®, presente entre las gotículas de aceite y el agua circundante, lo que dio origen a la desestabilización de las nanocápsulas producidas.

La primera situación que muy probablemente influyó los altos valores de polidispersión de tamaño encontradas en el presente estudio está relacionada a la aplicación tecnológica utilizada para su fabricación. Como se mencionó en los métodos, para la fabricación de las nanocápsulas se hizo uso de un homogeneizador de alta velocidad, el cuál en el proceso de emulsificación condujo irremediablemente a la aparición de espuma dentro del sistema, lo que representó un impacto considerable con respecto a la distribución de tamaño de las nanocápsulas obtenidas.

La producción de espuma durante la preparación de las nanocápsulas se observó en todos los experimentos. Este fenómeno tuvo como consecuencia que una parte del líquido sometido a homogenización pasara a tomar parte de las paredes de las burbujas formadas. Aunque las paredes de las burbujas de la espuma son paulatinamente drenadas y vuelven al líquido donde se originaron, el tiempo de permanencia fuera del seno del líquido sometido a homogenización impide la homogenización completa y correcta del tamaño de partícula de las nanocápsulas producidas [130]. Adicional a la falta de homogenización se ha propuesto que la formación de burbujas de gas dentro del líquido de la suspensión de nanocápsulas genera estrés mecánico que las daña [131].

El segundo factor, relacionado con la estabilidad física de las nanocápsulas, afecta de manera importante sus propiedades como son su tamaño y distribución de tamaño de partícula. Los problemas de estabilidad asociados con las nanocápsulas han sido ampliamente investigados y se pueden clasificar en problemas de estabilidad física y problemas de estabilidad química [74].

Aunque la adición de agentes tensoactivos busca revertir la tendencia que tiene el núcleo oleoso de las nanocápsulas a separarse de la fase acuosa, el uso de un solo tensoactivo puede no ser suficiente para evitar este fenómeno. El análisis realizado de la variable de respuesta correspondiente al tamaño de partícula permitió dilucidar que una mayor

concentración de Span 40® incrementaba el tamaño de partícula, que en todos los casos alcanzaba dimensiones micrométricas. La formación de floculos y de una delgada crema en la superficie y espuma persistente, esta última resultado del proceso de homogenización, se observaron pasados algunos instantes después de la fabricación. Por su parte, el Cremophor EL® como único tensoactivo dio lugar a sistemas con tamaños de partícula menores pero igualmente inestables, en los cuales se observó el fenómeno de *creaming* apenas unos instantes después de la preparación.

Los procesos de desestabilización no son independientes uno de otro por lo que cada uno puede influenciar o ser influenciado por otro. El incremento de tamaño de partícula puede deberse a la formación de flóculos que pueden comportarse como una sola entidad física. Estos procesos pueden llevarse a cabo simultáneamente o en cualquier orden y generalmente preceden al fenómeno coalescencia de las partículas que es finalmente el proceso de inestabilidad más serio de todos [74].

Desde la perspectiva de la caracterización de las nanocápsulas, se ha propuesto que fenómenos de inestabilidad como el *creaming* pueden impedir una correcta medición por parte del zetasizer haciendo imposible obtener medidas reproducibles [131]. De la misma manera, la posibilidad de que las nanocápsulas formen flóculos que actúen como una sola entidad, así como el fenómeno de coalescencia que da lugar a partículas más grandes puede ser una causa de tamaños de partícula mayores a los deseados con distribuciones de tamaño de partícula no uniformes. Por esta razón se prefiere el uso de la mezcla de Cremophor EL®, Span 40® y Poloxamero 188, para la estabilización de las nanocápsulas que da lugar a partículas del tamaño nanométrico deseado y estables a lo largo del tiempo. Posiblemente la distribución del tamaño de partícula puede mejorarse ajustando las condiciones del proceso empleado para su preparación.

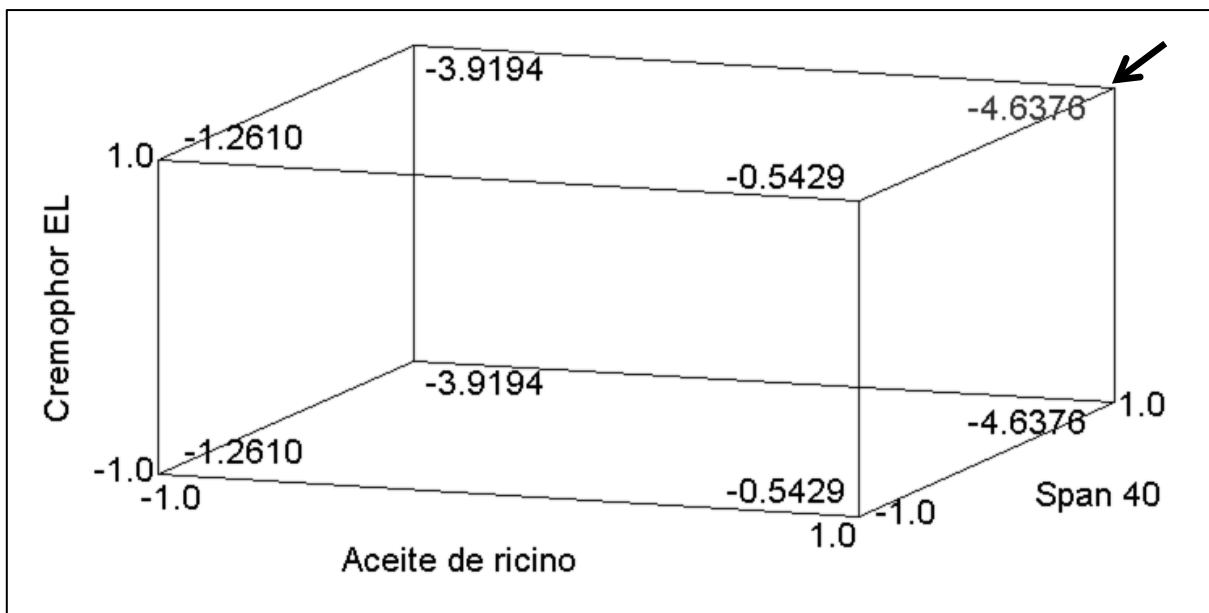


Figura 37 Gráfico cúbico de respuesta para $\log [Pdl]$.

En rojo se señala el valor mínimo de $\log [Pdl]$ (que significa tamaño menor índice de polidispersión) y el vértice que representa la combinación de cada uno de los componentes que según el modelo matemático da lugar a este resultado.

Según la Figura 37 para obtener el menor índice de polidispersión se hace necesario el uso de la mezcla de tensoactivos Span 40® y Cremophor EL® a las mayores concentraciones. Se observa nuevamente que la combinación de ambos tensoactivos es la mejor manera de obtener nanocápsulas estables y con las características de tamaño de partícula y distribución de tamaño de partícula deseables.

Con respecto a esta variable de respuesta, la formulación 7 mostró un índice de polidispersión de 0.38, que no se encuentra dentro del límite aceptable y que es alto en comparación con los índices de polidispersión obtenidos en otros experimentos [120, 126-129].

Finalmente, las respuestas del potencial ζ de cada experimento, indicativo de la carga superficial de las nanocápsulas, se ajustaron a los componentes usados en el diseño experimental. A continuación se muestra el análisis de varianza realizado para esta respuesta:

Tabla 20 Análisis de Varianza para Potencial ζ

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2983.05	7	426.15	80.06	0.0000
Residuo	47.906	9	5.3229		
Total (Corr.)	3030.96	16			

La Tabla 20 muestra valores- $p < 0.05$, indicando que al menos un factor en el modelo esta significativamente relacionado con la variable dependiente en un 95 % de confianza. La R^2 indica que el modelo ajustado explica el 98.4194 por ciento de la variabilidad del Potencial ζ .

De esta manera, la ecuación que mejor describe la respuesta Potencial ζ es:

$$\text{Potencial } \zeta = 63.086 - 11.6829*A + 13.3296*S + 14.1617*A*S + 28.6115*S*C + 17.1706*A*S*C + 15.1443*A^3 + 18.9464*S^3 \dots \text{Ec. (4)}$$

Dónde, A es el aceite de ricino, S es el Span 40® y C el Cremophor EL®.

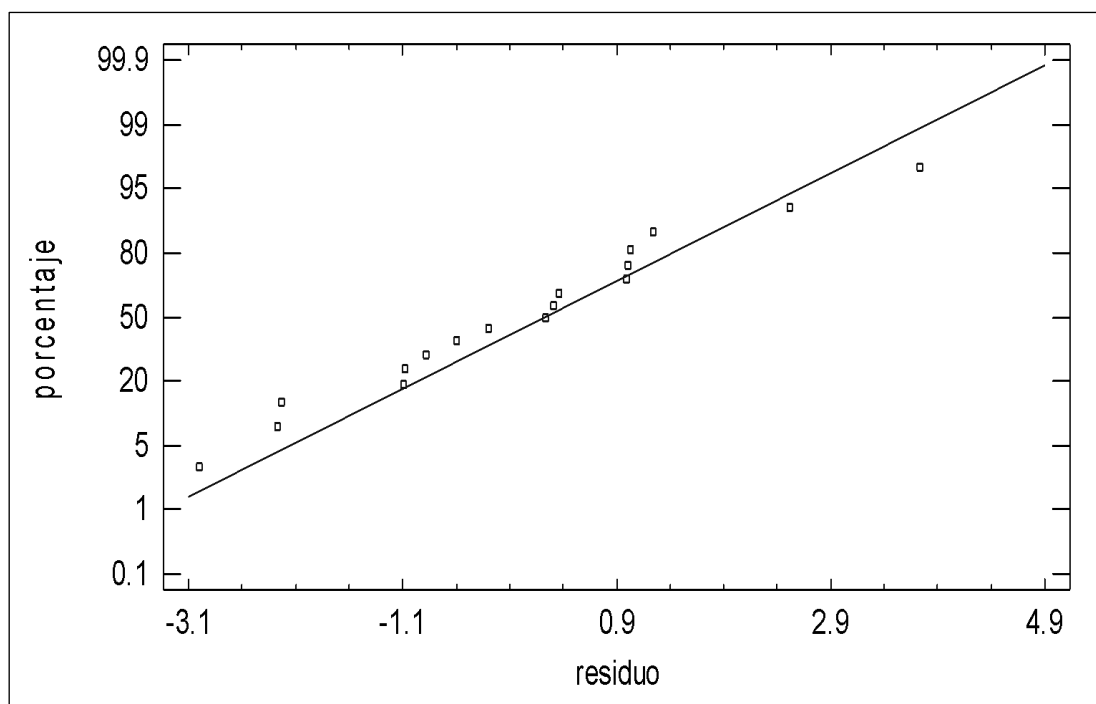


Figura 38 Gráfico de probabilidad normal para Potencial ζ .

En la Figura 38 se muestra el Gráfico de probabilidad normal para el Potencial ζ . De la misma manera que en las variables de respuesta anteriores se espera que los residuales (valor experimental-valor estimado por el modelo) se ajusten a la distribución normal que significa que estos se encuentran asociados a errores aleatorios por lo que los resultados son confiables. El gráfico obtenido en este caso, señala que la tendencia de los resultados puede ser completamente descrita con el modelo obtenido, ya que la mayoría de ellos sigue a la distribución.

En la Figura 39, que muestra los residuales en función del experimento realizado, se observa que no existe ninguna tendencia en la distribución de los datos. Sin embargo, se observan al menos un punto aberrante, identificado en el gráfico por el saturado color negro, que corresponde a la fila 4 de los datos analizados y para el cual se sugiere una redeterminación en un trabajo subsecuente.

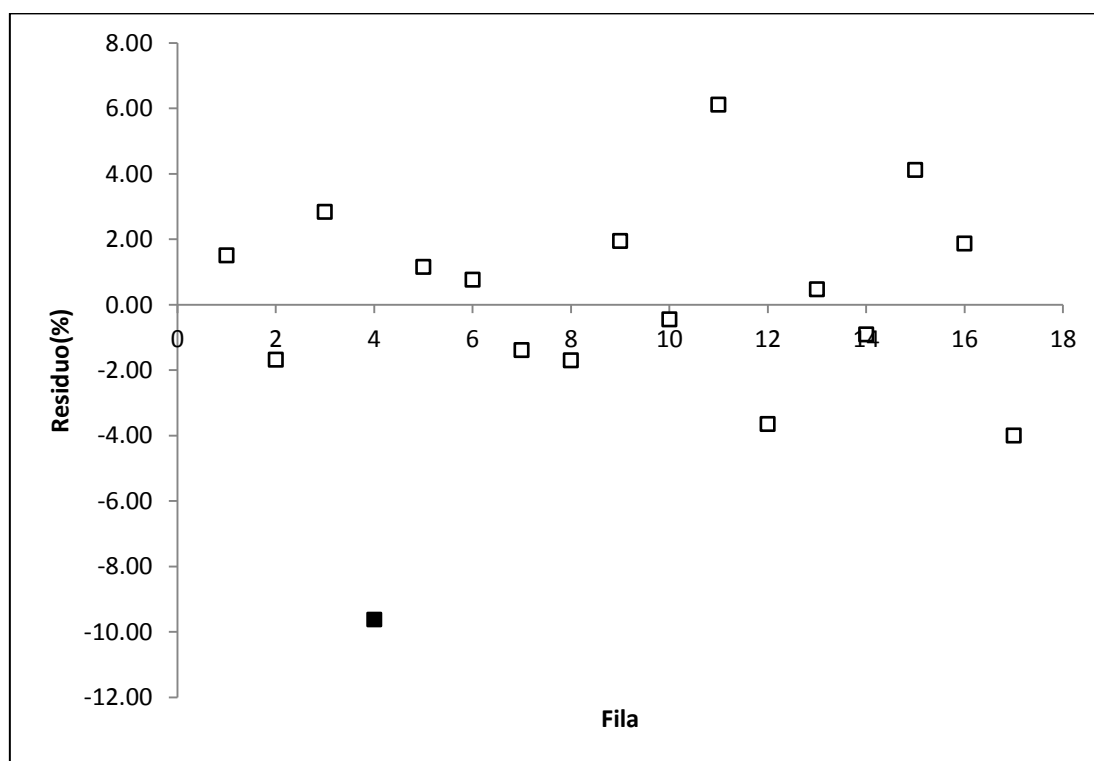


Figura 39 Gráfico de residuos para Potencial ζ .

El análisis de la suma de cuadrados de la Tabla 21 muestra que, con un nivel de significancia ($p < 0.05$), la interacción entre el Span 40® y el Cremophor EL® posee la mayor probabilidad de influenciar el valor de potencial ζ de las nanocápsulas. Esta

conclusión es lógica, pues el potencial ζ se ve modificado por la presencia de los tensoactivos no iónicos empleados para generar la disminución de la tensión interfacial y estabilización del núcleo oleoso de las nanocápsulas. Más adelante se analizará la relación entre la concentración de Span 40 y Cremophor EL y las variaciones en el potencial ζ observadas.

Tabla 21 Suma de Cuadrados Tipo III para potencial ζ

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Aceite de ricino	73.6305	1	73.6305	13.83	0.0048
Span 40	63.8085	1	63.8085	11.99	0.0071
Aceite de Ricino*Span 40	141.738	1	141.738	26.63	0.0006
Span 40*Cremophor EL	540.937	1	540.937	101.62	0.0000
Aceite de ricino*Span 40*Cremophor EL	348.819	1	348.819	65.53	0.0000
Aceite de ricino*Aceite de ricino*Aceite de ricino	172.774	1	172.774	32.46	0.0003
Span 40*Span 40*Span 40	215.528	1	215.528	40.49	0.0001
Residuo	47.906	9	5.3229		
Total (corregido)	3030.96	16			

En la Figura 40 se observa que la interacción entre las variables Span 40® y Cremophor EL® tienen el mayor efecto en la respuesta indicando que el aumento o disminución de la concentración de cualquiera de estos y su interacción provoca igualmente un considerable aumento o disminución del valor observado de potencial ζ de las nanocápsulas. Igualmente se observa, un efecto considerable de la interacción entre el aceite de ricino y el Cremophor EL®, seguido de la interacción entre los tres factores aceite de ricino, Cremophor EL® y Span 40® que en todos los casos tiene un acentuado efecto sobre el valor de Potencial ζ . Se observa pues que el tamaño de partícula está afectado principalmente por la concentración de tensoactivos.

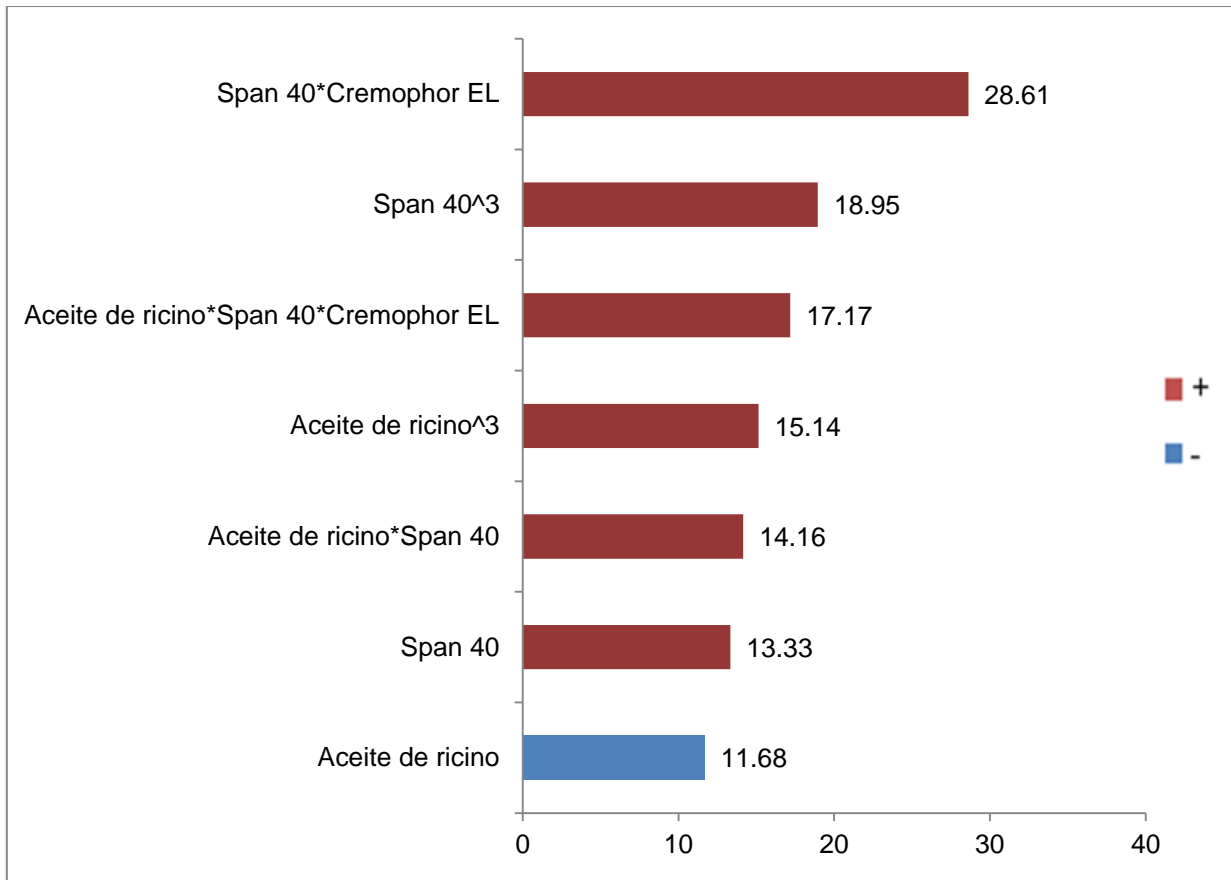


Figura 40 Diagrama de Pareto para Potencial ζ .

Comparación de los factores que afectan al Potencial ζ . Los valores que se muestran corresponden a los coeficientes en la ecuación de las variables mostradas. Cada efecto tiene un nivel de significancia ($p < 0.05$)

De acuerdo a la literatura, un potencial ζ idóneo es aquel que se encuentra fuera del intervalo -30 a +30 mV, que es donde se puede asegurar una larga estabilidad de las partículas en cuestión por efecto de las repulsiones electrostáticas.

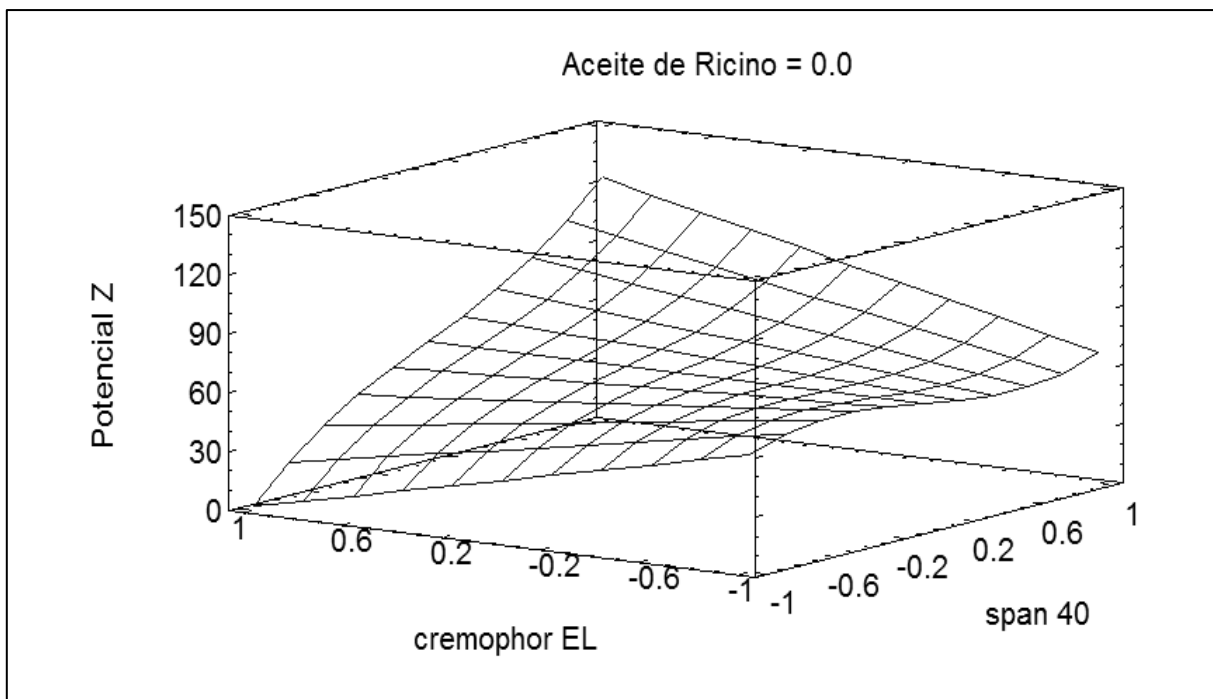


Figura 41 Gráfico de superficie de respuesta para Potencial ζ .

La figura corresponde al gráfico de superficie de respuesta obtenido con el modelo ajustado.

En la Tabla 13 se puede observar que todos los experimentos presentaron valores de potencial ζ mayores a 30 mV, adecuados para dar lugar a nanocápsulas estables por repulsión electrostática [82]. Como se puede ver en la Figura 41, el modelo establecido indica que incluso en la ausencia de ambos tensoactivos, Span 40® y Cremophor EL® se obtuvo un alto valor de potencial ζ que demuestra que las nanocápsulas presentaban en su superficie además del poloxamero 188, grupos funcionales con carga positiva que acusaban la presencia de quitosano constituyendo un recubrimiento que otorgaba al sistema la capacidad de estabilización electrostática.

La cualidad del quitosano como agente estabilizante de aceites y disolventes orgánicos en fase acuosa ya ha sido estudiada anteriormente. En un estudio realizado por Schulz y col. [132] se demostró la capacidad estabilizante del quitosano al observar la producción de emulsiones múltiples, agua/aceite/agua (w/o/w), sin la adición de un tensoactivo. Se demostró que, a pesar de no contar con una gran cantidad de grupos hidrófobos, el quitosano tiene la cualidad de adsorberse a la interfaz aceite/agua proveyendo estabilidad mecánica y electrostática; proporcionando además la capacidad de controlar el tamaño de partícula manipulando la proporción quitosano/aceite.

En el análisis anterior se propuso, la existencia de interacción entre la superficie del núcleo oleoso de la nanocápsula y los grupos hidrófobos presentes en la estructura química del quitosano. Los datos obtenidos del uso de Span 40® como agente tensoactivo dan lugar al planteamiento de una forma de interacción adicional a la ya planteada que involucra nuevamente al quitosano y la posibilidad de interacción con los tensoactivos no iónicos como son el Span 40® y el Poloxamero 188, este último tensoactivo presente en todos los sistemas a concentración constante.

Con respecto a este tema, Pepić y col. [133] presentaron un estudio en el cual encontraron que, en solución acuosa, el quitosano y los tensoactivos no iónicos, en este estudio Poloxamero 407, interactúan principalmente debido al efecto electrostático. Más precisamente, el efecto electrostático propuesto se debe a que los oxígenos electronegativos del poloxamero interactúan con las cadenas electropositivas del quitosano dando lugar a una interacción electrostática dipolo-ion; observando además que esta interacción es independiente de la concentración del quitosano. Es también importante mencionar que, según Pepić y col., no se descarta la posible existencia del efecto hidrófobo en la interacción del quitosano con tensoactivos no iónicos.

Así pues, es posible que este mismo fenómeno se haya llevado a cabo entre los oxígenos electronegativos de los grupos hidroxilo (-OH) presentes en la estructura química del Span 40® (Figura 20) y las cadenas electropositivas del quitosano, favoreciendo de esta manera la adsorción del quitosano a la superficie del núcleo oleoso. Adicionalmente, la adsorción del quitosano a la superficie de la nanocápsula puede estar favorecida como se ha mencionado anteriormente por la interacción del Poloxamero 188 y el quitosano por lo que incluso en el *grupo control*, donde se supuso una interacción hidrófoba entre los grupos hidrófobos del quitosano y la superficie oleosa del núcleo, ambas interacciones pudieron llevarse a cabo simultáneamente.

Hasta ahora, se discutió la importancia de los tensoactivos no iónicos para la adsorción del quitosano a la superficie de la nanocápsula, pero también es importante enfatizar que la presencia de tensoactivos no iónicos es un factor que afecta la medida del potencial ζ ; que en general tienden a reducir el valor de este parámetro [82]. Como se puede observar en la Figura 41, los experimentos que tienen únicamente Cremophor EL® y Poloxamero 188

dentro de su composición, a diferencia de los grupos anteriores, presentaron una marcada disminución del valor de potencial ζ .

Aunque, al igual que en los grupos anteriores el valor de potencial ζ positivo es mayor a 30 mV, la considerable disminución del potencial ζ en este grupo se debió entonces a un tercer factor que hasta entonces no estaba presente en la composición de las nanocápsulas, que en este caso es el Cremophor EL®.

Este emulsificante/solubilizante de estructura compleja (Figura 21) posee largas cadenas hidrófobas que aseguran afinidad al núcleo oleoso de la nanocápsula y cadenas hidrófilas que se extienden a la fase acuosa. El impedimento estérico que por sus estructuras químicas ofrece el Cremophor EL® adicional al que también aporta el Poloxamero 188 fue posiblemente la causa del reducido valor de potencial ζ , que se dio como consecuencia de los fenómenos que a continuación se proponen: a) el quitosano o los iones presentes en el medio no se asocian a la superficie de la nanocápsula en igual cantidad que en los grupos anteriores debido al impedimento estérico existente o b) disminuya el efecto de la carga superficial positiva del quitosano debido a que los grupos funcionales positivamente cargados se alejan de la capa más expuesta de la nanocápsula.

Para entender mejor este fenómeno, es importante considerar el modelo de la doble capa eléctrica sobre el cual se fundamenta la medición del potencial ζ . Según el modelo explicado por Stern las partículas cargadas positivamente, como las nanocápsulas producidas, necesitan ser neutralizadas y para ello atraen iones negativos formando una capa inmovilizada adyacente sobre la superficie (capa rígida). Sin embargo, estos iones no son suficientes para neutralizar toda la carga, por lo que la carga remanente es neutralizada por una capa difusa que se extiende en la disolución donde se alcanza el equilibrio en las concentraciones de los iones. El potencial próximo a la superficie de la partícula disminuye al aumentar su distancia respecto a la superficie y llega finalmente a cero en el seno de la disolución [134, 135].

La Figura 42 esquematiza la estructura, distribución de los iones y una aproximación hipotética del valor de potencial de la doble capa originada alrededor de la nanocápsula construido considerando los supuestos del modelo propuesto por Stern anteriormente descrito. En esta representación es importante destacar el plano de corte, el cual es una

superficie imaginaria que separa la capa rígida de la capa difusa. Es importante porque el potencial en el plano de corte es lo que se denomina potencial ζ .

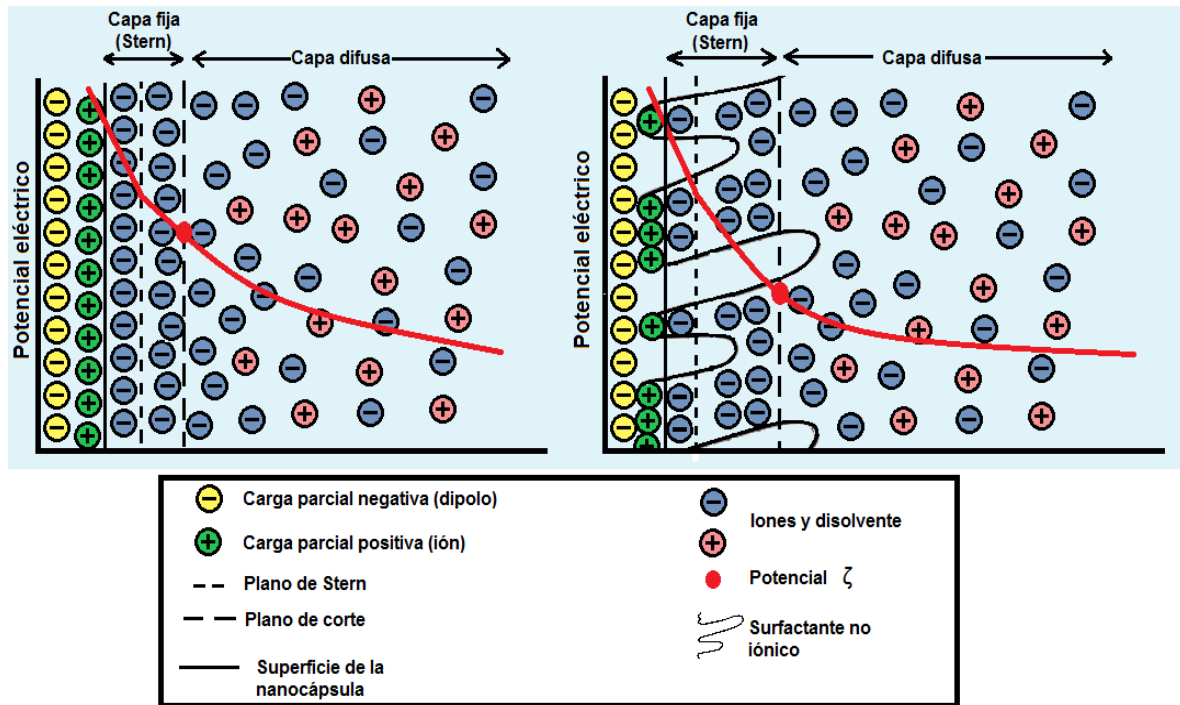


Figura 42 Localización del plano de corte con relación al plano de Stern sobre la superficie de una nanocápsula.

Representación de la distribución de iones sobre una superficie lisa (izquierda) y en una superficie cubierta con un tensoactivo no iónico con sus cadenas hidrófilas extendidas hacia el medio (derecha) donde se localiza en línea punteada (- -) el plano de Stern con relación al plano de corte (— —).

De esta manera, para las partículas que poseen una superficie lisa (Figura 42-izquierda) el plano de corte se encuentra solo algunas capas de iones después de la superficie. El potencial ζ en este plano es ligeramente menor que el potencial de Stern y el potencial en la superficie de la partícula. En contra parte, cuando la superficie está recubierta por una espesa capa de surfactante no iónico como el Cremophor EL® y el Poloxamero 188, que es permeable a las moléculas del disolvente y a pequeños iones, el plano de corte se aleja desplazándose hacia afuera de la doble capa eléctrica (Figura 42-derecha), debido a que se modifican las características de adsorción de los iones presentes como Na^+ , Cl^- , H^+ o OH^- . En este caso, el potencial ζ disminuye considerablemente [136, 137].

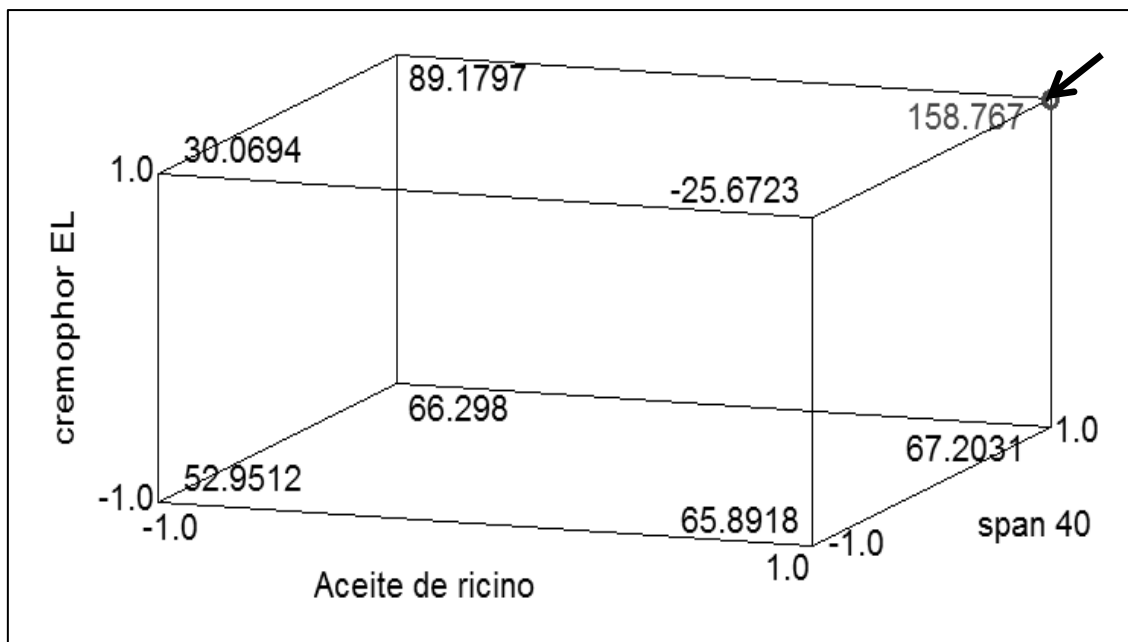


Figura 43 Gráfico cúbico y de superficie de respuesta para Potencial ζ .

En rojo se señala el valor máximo de potencial ζ y el vértice que representa la composición de cada uno de los componentes que según el modelo matemático da lugar a este resultado.

Aunque el uso de Cremophor EL® dio lugar a tamaños de partícula menores y los valores observados de potencial ζ con el uso de Cremophor EL® se encuentra por encima de 30 mV, indicando con esto la posibilidad de obtener sistemas estabilizados por repulsión electrostática, se observa en la Figura 43 que, según el modelo matemático ajustado, la combinación de Span 40® y Cremophor EL® a concentraciones altas del diseño experimental daría lugar a un valor de potencial ζ mayor maximizando con ello la estabilización electrostática de este sistema.

Experimentalmente se observó que los sistemas en cuya composición se hacía una combinación de estos dos agentes tensoactivos y el Poloxamero 188 a concentración constante en cada uno de estos sistemas daban lugar a sistemas estables con valores de potencial ζ que en la mayoría de los casos se encontraban por encima de 30 mV.

Con respecto a esta propiedad de las nanopartículas, el sistema 7 presentó un potencial ζ de +55.7 mV a pH de aproximadamente 3.8 que es aceptable si se tiene como referencia que los valores de potencial ζ de las nanopartículas de quitosano reportadas en la literatura se encuentran entre 29.11 y 78 mV [127, 129]. En ambos casos se observan valores de

potencial ζ mayor a 30 mV explicando su estabilidad [82]. El valor observado de potencial ζ de las nanocápsulas producidas en este trabajo de tesis hace notar que la carga superficial de las nanocápsulas producidas es positiva y explica su alta estabilidad, que se debe a la repulsión por cargas eléctricas de la superficie de las nanocápsulas.

En este punto es importante hacer notar que el sistema nanoparticulado obtenido no solo se encuentra estabilizado por la carga superficial positiva que a pH ácido presenta el quitosano que se encuentra adsorbido a la superficie de las nanocápsulas si no también estéricamente por los tensoactivos no iónicos empleados, Cremophor EL®, Span 40® y Poloxamero 188 (Figura 44).

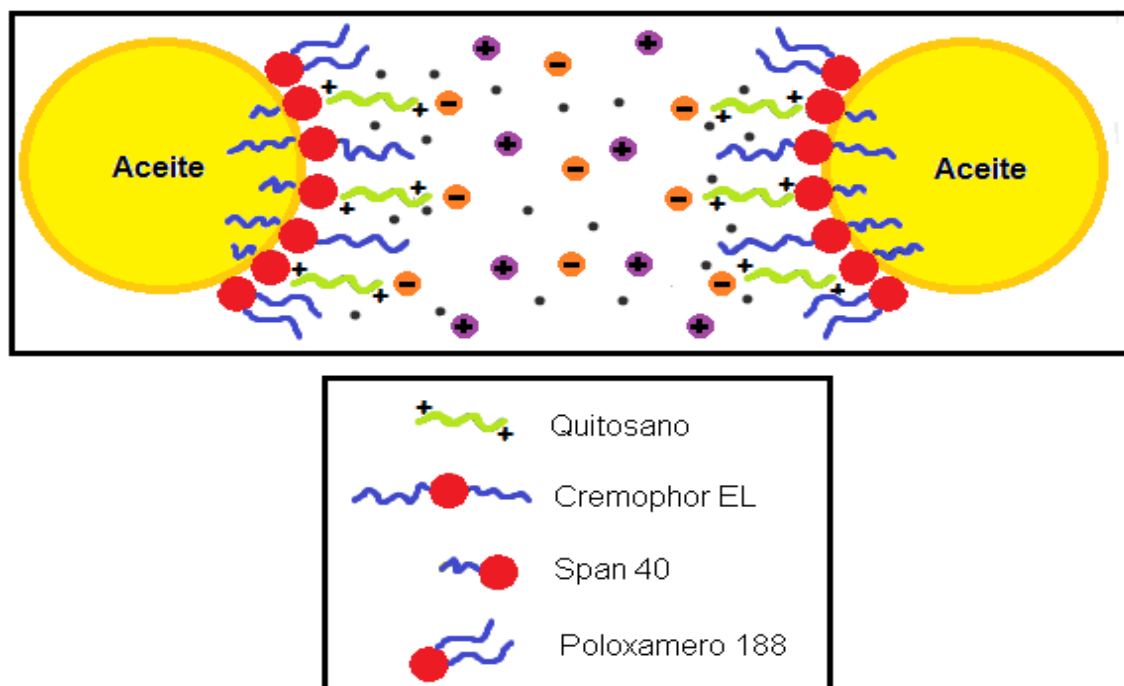


Figura 44 Representación esquemática de las nanocápsulas cargadas de curcumina producidas.

Se observa esquematizada la estructura de cada uno de los tensoactivos y como se asocian a la superficie del quitosano, contribuyendo cada uno a la estabilidad física del núcleo oleoso mediante mecanismos electrostáticos y estéricos.

Se observa que los diferentes emulsificantes y el polímero adsorbido a la superficie del aceite aportan al sistema fuerzas repulsivas electrostáticas y estéricas que contrarrestan las fuerzas de atracción de Van der Waals previniendo de esta manera que las gotas de

aceite que constituyen el núcleo de la nanocápsula se acerquen entre sí dando lugar a fenómenos de floculación o coalescencia.

A manera de resumen de la parte estadística de esta sección, en la Tabla 22 se muestran agrupados los modelos matemáticos obtenidos para cada una de las variables de respuesta consideradas para este experimento, sus valores de R² y su % de error relativo.

Tabla 22 Resumen del análisis estadístico a cada una de las variables de respuesta estudiadas.

Respuesta	Modelo determinado	R ²	%Error relativo
Tamaño de partícula	$1/Size = -0.000510412 - 0.00998907*A - 0.00892425*S - 0.0183593 A*S - 0.0117318*A*C - 0.0101974*S*C - 0.0111709*A*S*C + 0.00606726*A^3 + 0.0061911*S^3 + 0.00604668*A^3*S$	0.9943	14.8
Pdl	$\text{Log (Pdl)} = -0.37544 + 0.483695*S - 0.359062*A*S - 2.21478*S^2 - 2.37408*S^3 + 0.202112*A^2*S$	0.9959	20.1
Potencial ζ	$\text{Potencial } \zeta = 63.086 - 11.6829*A + 13.3296*S + 14.1617*A*S + 28.6115*S*C + 17.1706*A*S*C + 15.1443*A^3 + 18.9464*S^3$	0.9842	6.1

* Dónde, A es el aceite de ricino, S es el Span 40 y C el Cremophor EL.

%Error relativo= (residuo máximo observado/valor observado)*100

El análisis realizado de estos modelos nos permitió distinguir los factores críticos del proceso de obtención de nanocápsulas con esta formulación. Se observa que el Span 40® se considera en todos los modelos y tiene una fuerte influencia sobre las respuestas de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial ζ. Debido a que la formulación analizada es compleja, aunque los valores de R² son aceptables, se observan altos valores de % de error relativo. Sin embargo, los modelos obtenidos aportan información útil durante el desarrollo experimental y puede considerarse su uso para investigaciones posteriores.

Estabilidad

A lo largo del análisis se ha hecho énfasis en la estabilidad de las nanocápsulas producidas, que es un tema crítico dentro del desarrollo de una formulación farmacéutica. Como parte del desarrollo de las nanocápsulas cargadas de curcumina, las 17 formulaciones producidas del diseño experimental se contuvieron en viales de vidrio y almacenaron a una temperatura de 4°C por un lapso de 16 semanas (ver Métodos).

Las características fisicoquímicas como son tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial ζ no se determinaron debido a que la calidad y validez de la medición de estas cualidades se ven disminuida debido a los fenómenos de inestabilidad física presente en la mayoría de los experimentos. De esta manera, únicamente se observó la apariencia física a lo largo del tiempo de almacenamiento como signo de estabilidad.

Tabla 23 Estabilidad física de los 17 experimentos, sin dilución, almacenados a 4°C. El fondo morado identifica el grupo en el cual no se hizo uso de Cremophor EL® o Span 40®, el verde a aquellos en los cuales se usó Span 40®, el azul a aquellos en los cuales se usó Cremophor EL® y en rojo aquellos sistemas en los cuales se empleó una mezcla de ambos tensoactivos. En rojo brillante, la formulación 7, que demostró ser el más estable durante la prueba.







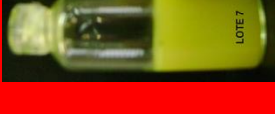

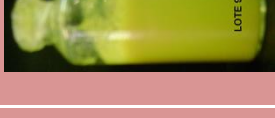







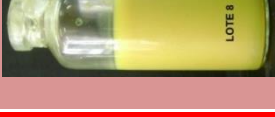
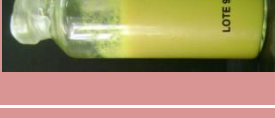
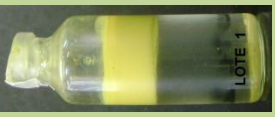







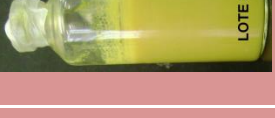
















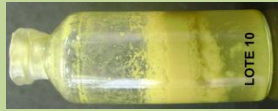







Tiempo	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3	Fórmula 4	Fórmula 5	Fórmula 6	Fórmula 7	Fórmula 8	Fórmula 9
1 semana									
8 semanas									
16 Semanas									

Tabla 23 Continuación.

Tiempo	Fórmula 10	Fórmula 11	Fórmula 12	Fórmula 13	Fórmula 14	Fórmula 15	Fórmula 16	Fórmula 17
1 semana								
8 semanas								
16 Semanas								

La Tabla 23 muestra las fotografías de cada uno de los experimentos almacenados durante 1, 8 y 16 semanas. Las formulaciones 3 y 15, estabilizadas únicamente por poloxamero 188, mostraron una ligera separación de fases a partir de la primera semana de preparación, siendo este fenómeno completamente evidente en la octava semana de almacenamiento. Sin embargo es importante destacar que el sobrenadante mantenía coloración amarilla.

Los experimentos 1, 4, 10 y 16 que contenían Span 40® como único estabilizante mostraron la formación de agregados de partículas aunque no separación de fases inmediata a la preparación. Sin embargo, este último fenómeno se observó después de 8 semanas y mostró ser muy drástico en las formulaciones 10 y 16 mientras que en la formulación 1 comenzaba a manifestarse. Tras 16 semanas de almacenamiento, el fenómeno de separación de fases se evidenció en todos los sistemas y fue especialmente grave en los sistemas 1 y 16 donde el sobrenadante se observó completamente traslucido.

Los experimentos donde el Cremophor EL® había sido el único agente estabilizante mostraron separación de fases a partir de la primera semana de preparación. Transcurridas 16 semanas de almacenamiento el fenómeno era completamente evidente; aunque a diferencia de los experimentos con Span 40® como agente estabilizante, el sobrenadante mantenía el color amarillo característico de la curcumina.

Finalmente, los sistemas en los cuales se empleó la mezcla de Span 40® y Cremophor EL® demostraron ser más estables a lo largo del tiempo. Aunque la mayoría de los experimentos después de 8 semanas mostraron separación de fases, destaca la formulación 7, que permaneció invariable a lo largo de las 16 semanas de almacenamiento. La mayor estabilidad física que demostraron estos experimentos, en especial la formulación 7, se debe al efecto combinado de la presencia de tensoactivos no iónicos que brinda protección estérica y la carga positiva que presenta el quitosano a pH ácido que estabiliza electrostáticamente y que brindan al sistema excelentes características físicas y de estabilidad.

El análisis completo de estas propiedades fisicoquímicas de los experimentos permitió observar que la combinación de los tensoactivos posee un efecto favorable en la producción de nanocápsulas dando lugar a tamaños de partícula aceptables, mejores

índices de polidispersión, valores de potencial ζ adecuados y en consecuencia nanocápsulas con mayor estabilidad física a lo largo del tiempo.

Finalmente se concluyó que la formulación 7 poseía las características de estabilidad, tamaño de partícula y potencial ζ adecuadas, dando lugar con ello a nanocápsulas que podían ser sometidas a pruebas adicionales para observar su tamaño y morfología en TEM, demostrar su resistencia a cambios en el pH, efecto que sufrirán como consecuencia de la administración por vía oral; y demostrar también su capacidad mucoadhesiva en sistemas biológicos para con ello caracterizar su última y más importante cualidad de desempeño.

Microscopía electrónica de transmisión

La Figura 45 muestra la micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión que demostró la existencia de nanocápsulas de forma esférica no regular (esquina inferior derecha) con una estimación aproximada de tamaño de partícula de 180 ± 11.8 nm que confirmó las determinaciones realizadas mediante la técnica de DLS llevada a cabo en el Z-sizer Nano ZS® de Malvern®. Se observó también la formación de agregados de partículas (centro y esquina superior izquierda) que denota inestabilidad de las nanocápsulas o necesidad de un proceso de secado rápido para evitar la aglomeración.

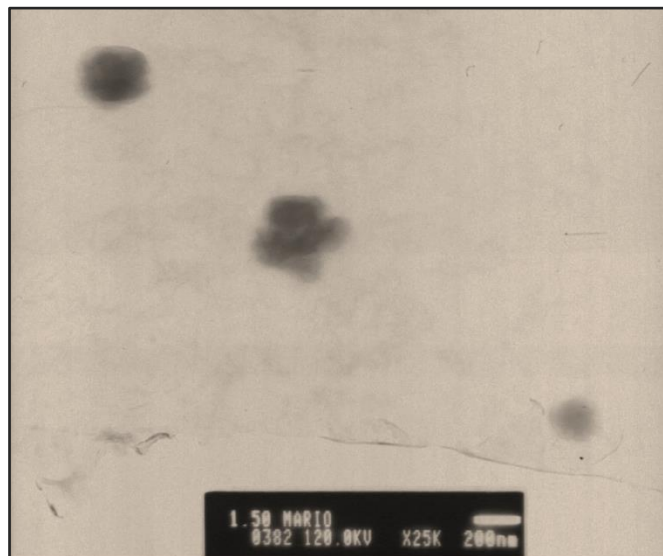


Figura 45 Micrografía obtenida por TEM de las nanocápsulas de la Formulación 7.

Estabilidad en diferentes puntos de pH

Con el objetivo de investigar el efecto del pH en las nanocápsulas recubiertas con quitosano preparadas por el método de homogenización, las nanocápsulas fueron diluidas

e incubadas durante 2 horas en soluciones buffer con diferentes valores de pH (ver Métodos).

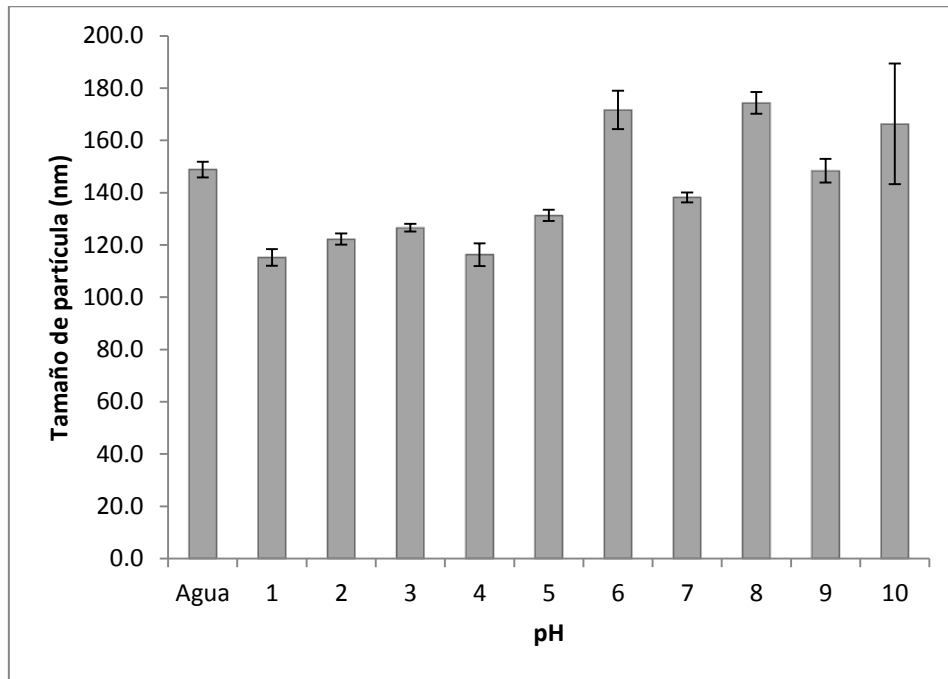


Figura 46 Tamaño de partícula de nanocápsulas cubiertas de quitosano bajo diferentes valores de pH.

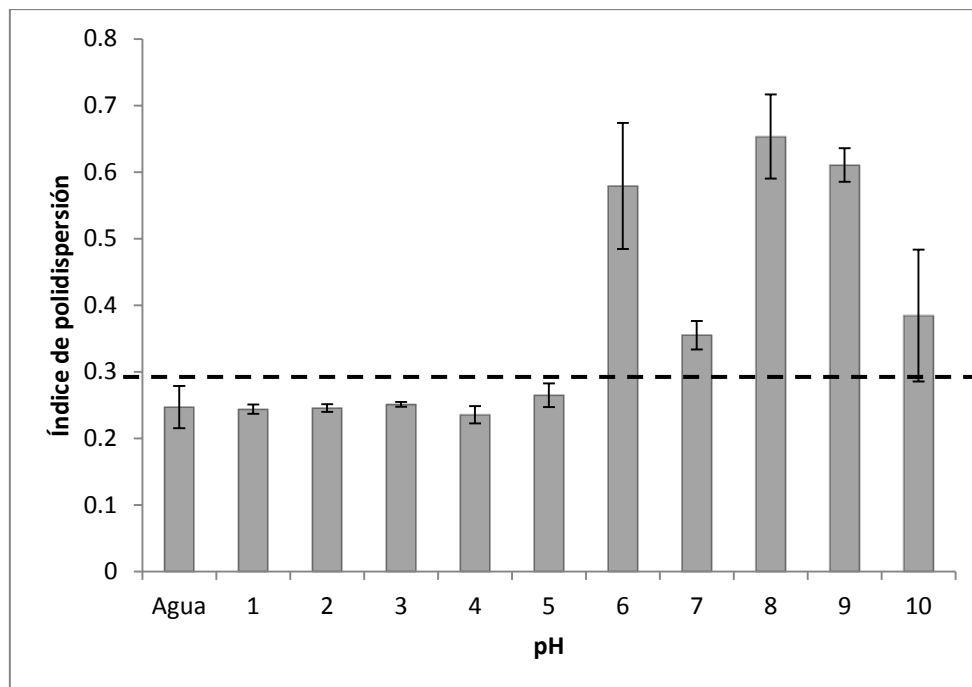


Figura 47 Índice de polidispersión de nanocápsulas cubiertas de quitosano bajo diferentes valores de pH.

Se observan los valores de índice de polidispersión según el pH del medio. Con una línea punteada se indica el valor de índice de polidispersión considerado óptimo para un sistema nanoparticulado.

Los resultados de estos experimentos mostraron que las nanocápsulas diluidas en agua desionizada presentaron un tamaño de partícula de 148.9 ± 3.0 nm con un aceptable índice de polidispersión de 0.247 ± 0.032 . En la Figura 46 se observa que las nanocápsulas dispuestas en soluciones buffer ácidas, en un rango de pH de 1 a 5, fueron estables exhibiendo un tamaño de partícula de entre 115 y 131 nm e índices de polidispersión menores a 0.3 como se distingue en la Figura 47.

Por otra parte, en la Figura 46, se distingue también que a partir de valores de pH de 6 se observa un ligero incremento en el tamaño de partícula, 138 a 171 nm y, en la Figura 47, se distingue también una considerable modificación de los valores de índice de polidispersión que en todos los casos resultaron ser mayores a 0.3. Los valores de pH básicos generan inestabilidad en las nanocápsulas cubiertas con quitosano, provocando que las partículas se aglomeren, dando lugar a variaciones cada vez mayores de la distribución de tamaño de partícula.

Las observaciones realizadas concuerdan con trabajos llevados a cabo por otros investigadores quienes se percataron de que el pKa del quitosano varía entre 6 y 7 dependiendo del grado de acetilación y peso molecular del quitosano empleado [138, 139].

El quitosano es una base débil que bajo condiciones ácidas, $\text{pH} < 6$, sufre la protonación de los grupos amino ($-\text{NH}_2$) presentes en su estructura proporcionándole carga positiva [139]. En estas condiciones el quitosano es soluble en agua e interactúa con la superficie de la gota de aceite parcialmente negativa (debido al Span 40®) distribuyéndose sobre su superficie y ofreciendo un efecto estabilizante electrostático evitando con ello la agregación de las nanocápsulas.

Por otro lado, en un medio donde el pH se encuentra más cercano a la neutralidad ($\text{pH} 6$) y a pH más básico, los grupos amino del quitosano que recubre la superficie de las nanocápsulas se encuentran en su forma isoelectrónica provocando que el quitosano sea insoluble en agua [139] reduciendo las fuerzas electrostáticas repulsivas para finalmente

quedar únicamente estéricamente protegidas, lo cual reduce la velocidad de aglomeración de las partículas considerablemente pero no evita completamente este fenómeno [140]. El fenómeno de aglomeración que sufrieron las nanocápsulas fue el responsable del incremento de tamaño de partícula promedio así como del incremento de los índices de polidispersión.

Un efecto interesante que se observa en los valores de índice de polidispersión observados a valores de pH de 7 y 10 (Figura 47) es la aparente disminución del fenómeno de agregación de las nanocápsulas y al menos a pH de 7 la dispersión entre medidas es menor. Según el análisis anterior, los valores de pH del medio provocan que el quitosano este no ionizado y sea insoluble por lo que el fenómeno de agregación observado debió ser el mismo, aunque no fue así.

En este sentido un estudio realizado por Santander-Ortega y col. [140] demostró que una moderada o alta salinidad del medio dispersante, que en nuestro estudio pudo deberse al tipo de sales empleadas y en particular a la concentración de iones Na^+ y K^+ en las soluciones buffer, puede mejorar la estabilidad de los sistemas coloidales incluso cuando estas se encuentran a un pH en el cual el polímero de recubrimiento se encuentra en su punto isoeléctrico. En este caso la estabilidad de los sistemas coloidales, que no se explica ni por la teoría clásica de DLVO ni por la existencia de repulsión estérica entre las cadenas del polímero, se debe a que los contraiones hidratados se ordenan localmente cerca de la superficie de la partícula, que debe ser hidrófila, originando fuerzas repulsivas de corto alcance que evitan que las partículas se agreguen y que son conocidas con el nombre de fuerzas de hidratación. La magnitud de la fuerza de repulsión depende de la hidrofiliidad de la superficie de la nanocápsula y la concentración y el grado de hidratación de los iones acumulados en la superficie de la nanocápsula. Durante el experimento realizado por Santander-Ortega y col. [140] también se demostró que independientemente del pH del medio un ion como el Ca^{2+} muestra un efecto de re-estabilización más grande que el Na^+ , debido a que el ion calcio se encuentra más hidratado que el ion sodio.

Debido a que la cubierta polimérica de quitosano eléctricamente cargada, a $\text{pH} < 6$, confiere hidrofiliidad a la superficie de las nanocápsulas lipídicas, las fuerzas de hidratación deben ser consideradas como fenómeno que aporta estabilidad en medios con alta concentración de sales a las nanocápsulas generadas [140]. En el caso contrario, a pH de 6 o mayor, el

quitosano se encuentra eléctricamente neutro y la hidrofiliidad de la nanocápsula está dada por los segmentos PEO del Poloxamero 188 (Figura 22) y del Cremophor EL® (Figura 21) [140].

Estudios In vivo y Ex vivo

Se sabe que la mayoría de las partículas que se administran por vía oral no son retenidas y experimentan un tránsito directo a través del tracto gastrointestinal. El uso de polímeros mucoadhesivos ha sido empleado como una manera de aumentar el tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal [141].

La prueba de mucoadhesión *ex vivo* en intestino de borrego arrojó resultados positivos acerca de esta cualidad de desempeño del sistema nanoparticulado seleccionado (Formulación 7). Las imágenes de la Figura 48 muestran los resultados de la primera parte de la prueba de mucoadhesión en intestino de borrego.

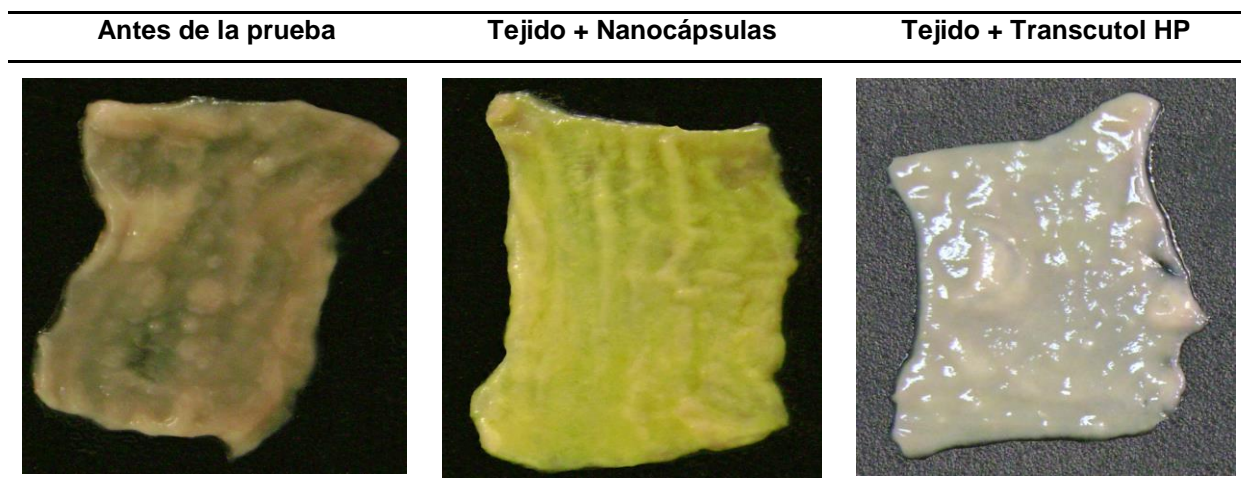


Figura 48 Apariencia física del tejido después de contacto con Nanocapsulas y Transcutol HP.

En la Figura 48 se compara el uso de Transcutol HP®, un agente solubilizante de fármacos en formulaciones farmacéuticas y que sirve en este experimento como control, y la formulación 7 de nanopartículas. Se observa claramente que el tejido en contacto con la formulación 7 tiene adsorbida a su superficie las nanopartículas presentando una tonalidad amarilla intensa característica del sistema nanoparticulado, mientras que el Transcutol HP® presenta solo una ligera coloración amarilla característica de la curcumina.

Durante el desarrollo experimental se observó que al finalizar la prueba la mayor parte de la solución formada de Transcutol HP® se eliminó al extraer la solución salina del interior del tubo. Se visualiza pues que este agente solubilizante no tiene capacidad de adsorberse en el tejido intestinal a diferencia de la formulación 7 que tiene claramente una amplia permanencia en este.

La Figura 49 muestra las características del tejido sometido al método descrito, según el cual se diseccionó el saco de intestino formado que entró en contacto con la suspensión de nanopartículas y se colocó de nuevo en el medio en agitación y a 37°C. Se realizaron las correspondientes observaciones a los 5, 10, 15 y 25 minutos que se representan en la Figura 49.




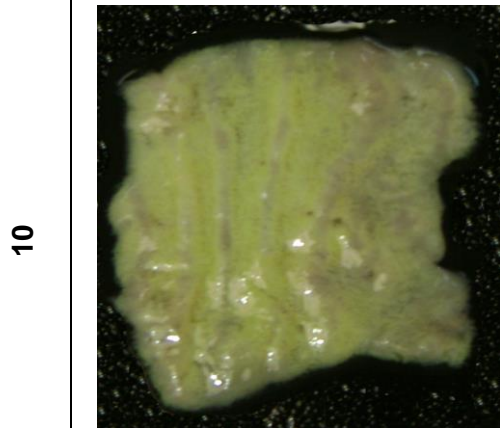
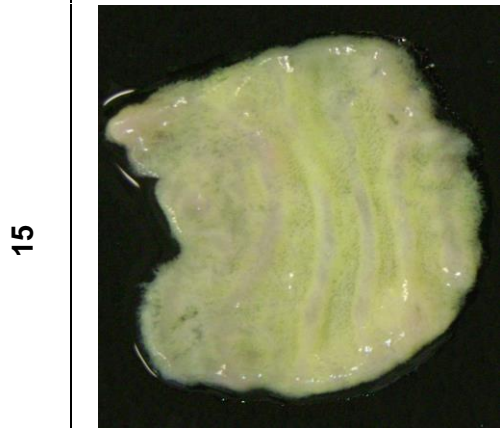
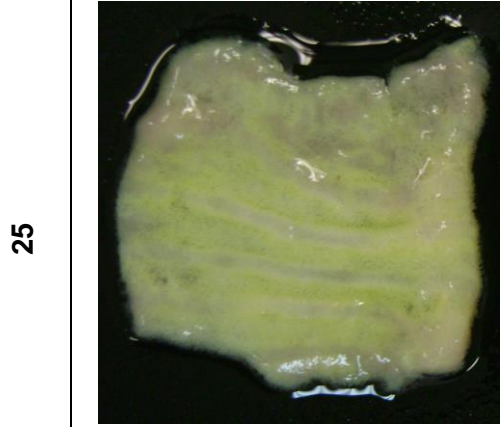
Tiempo (min)	Antes de la prueba	0	5
Imagen			
Tiempo (min)	10	15	25
Imagen			

Figura 49 Apariencia física del tejido intestinal de borrego después de la prueba de mucoadhesión.

Se observa en el primer cuadro "Control" que el intestino del borrego tiene textura plegada de tonalidad rosácea antes de cualquier contacto con la formulación de prueba. Después de realizado el contacto de la formulación seleccionada con el intestino según el método descrito se observa una coloración amarilla intensa más o menos uniforme característica de las formulaciones que se aprecia en el cuadro correspondiente al tiempo "0".

Después de 5 minutos de agitación la coloración amarilla se ve disminuida considerablemente pero no desaparece. La tonalidad adquirida se conservó a lo largo de los siguientes puntos de muestreo sin cambios considerables hasta los 25 minutos en que se finalizó la prueba.

La segunda prueba de mucoadhesión *ex vivo* en intestino de borrego permitió visualizar también resultados positivos de la formulación seleccionada al evidenciar que tras un paso rápido por un segmento de intestino, se observan restos de la suspensión de nanopartículas a lo largo del tejido.

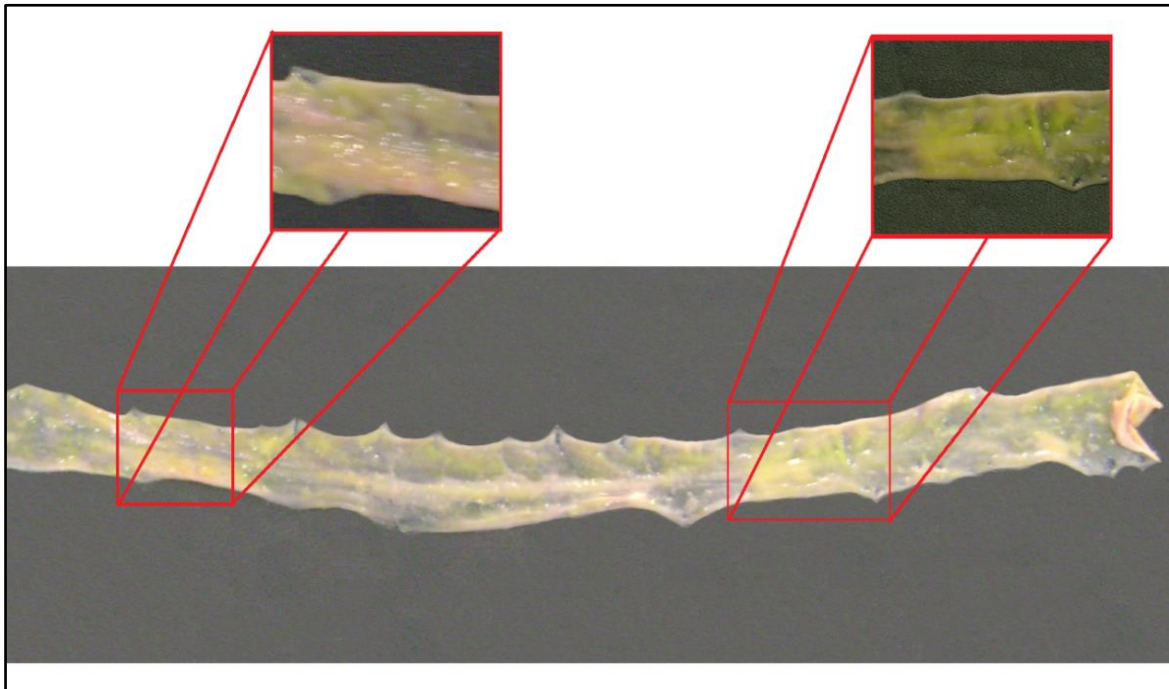


Figura 50 Apariencia física de un segmento de intestino de borrego después de contacto con la formulación 7.

La Figura 50 muestra la suspensión de nanopartículas adherida a la superficie del tejido después de la prueba. Se observa que aunque el tiempo de contacto es reducido, el sistema tiene capacidad de adherirse a la mucosa.

Esta capacidad de mucoadhesión del quitosano en sistemas farmacéuticos ha sido ampliamente estudiada y demostrada. En un estudio realizado por Ping He y col. [142], se mostró la mucoadhesión de micropartículas de quitosano producidas por el método de spray dry, que de acuerdo a los experimentos de caracterización poseían un diámetro de aproximadamente 3-12 μm . La demostración de la capacidad de mucoadhesión de las micropartículas de quitosano, se realizó empleando segmentos de intestino de rata y se aplicó una técnica similar a la descrita en este proyecto de tesis. Como se expone en sus resultados observaron que alrededor del 50% de las micropartículas se adherían a la superficie del tejido.

Por otra parte, Dudhani y col. [143] demostraron la mucoadhesividad de nanopartículas de quitosano cargadas de catequina y marcadas con fluoresceína en intestino aislado de cerdo. Las nanopartículas obtenidas fueron debidamente caracterizadas. El tamaño de estas fue de aproximadamente 124 nm con un potencial ζ de 24 mV a pH=5. En este estudio se observó una permanencia de entre el 32 y 40% del total adicionado de nanopartículas que fue determinado con el método analítico correspondiente.

Además, en estudios anteriores en que se ha medido el tiempo de adhesión de microesferas en intestino de cerdo aislado con diferentes polímeros como el carbopol, quitosano y metilcelulosa se ha confirmado que el quitosano posee una capacidad de adhesión superior con respecto a los otros dos polímeros [143].

La siguiente prueba realizada *in vivo* en ratones hembra adultos mostró igualmente resultados positivos acerca de la capacidad mucoadhesiva del sistema nanoparticulado seleccionado. Las siguientes imágenes muestran la distribución del sistema nanoparticulado en el tubo digestivo de los animales de prueba.

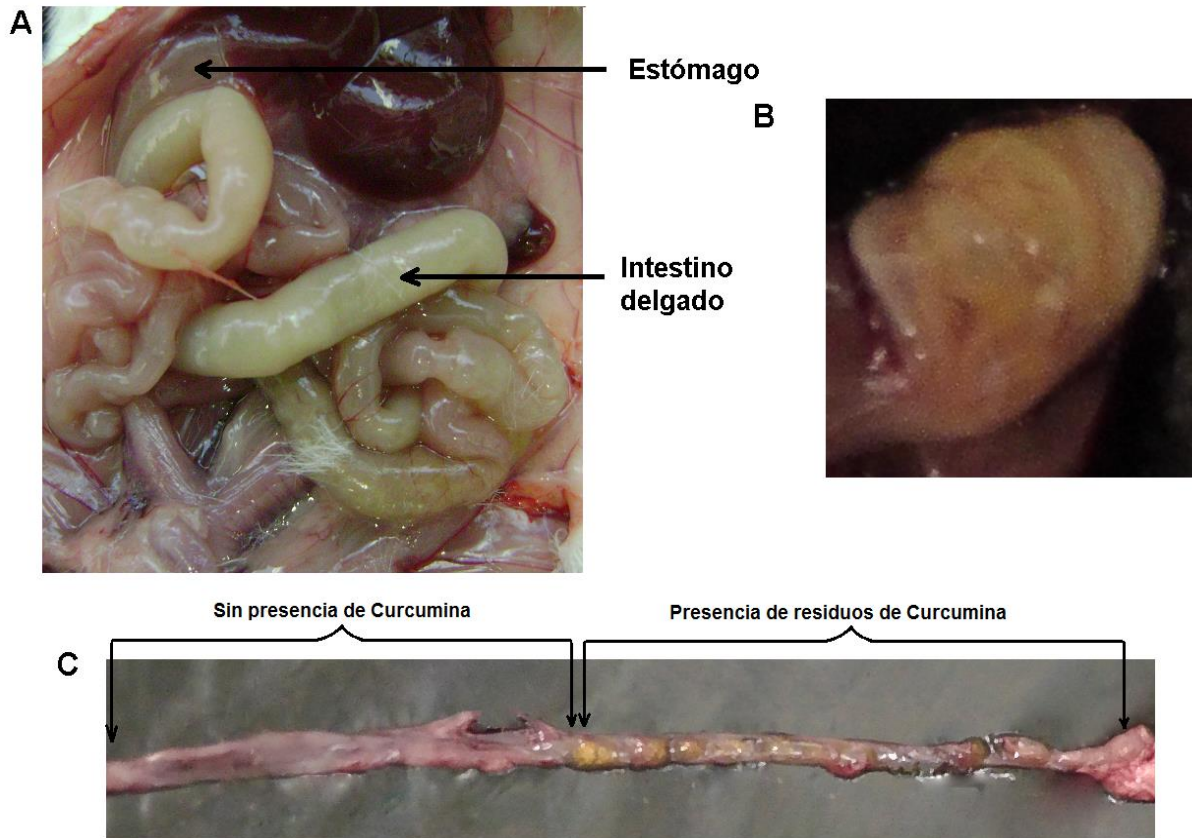


Figura 51 Tracto gastrointestinal de ratón abierto 3 horas después de administración por vía oral de una suspensión de curcumina en agua.

Se observa en la Figura 51-A la apariencia del tubo digestivo del ratón al cual se administró una suspensión de curcumina en agua. Así mismo, se observan también restos del colorante en estómago del animal de prueba (Figura 51-B), mientras que en el intestino solo se observan residuos de la suspensión de curcumina en la parte final del tubo digestivo, sin mostrar una coloración considerable a lo largo del intestino (Figura 51-C). La curcumina por sí misma no tiene un tiempo de permanencia considerable en el intestino por lo que el tiempo que está en contacto con este se reduce y con ello el tiempo disponible para ser absorbida.

La cantidad de residuos de curcumina encontrados en el estómago del ratón administrado con una suspensión de curcumina en agua (Figura 51-C) después de transcurridas 3 horas de espera no indica mucoadhesión. En un estudio realizado por Tamez-Treviño y col.[144] para determinar la velocidad de tránsito intestinal en el ratón BALB/c se distinguió que tras

la administración de un colorante vegetal a ratones adultos por vía oral, después de los primeros 90 minutos parte del colorante alcanza la primera mitad del intestino y después de 2 horas comienza a ser eliminado a través de las heces. Se encontró también que a las 3 horas aun había colorante en el estómago del ratón por lo que se concluye que el colorante se libera del estómago de manera intermitente. Esta misma situación es el que probablemente se presentó en el experimento realizado con la suspensión de curcumina.

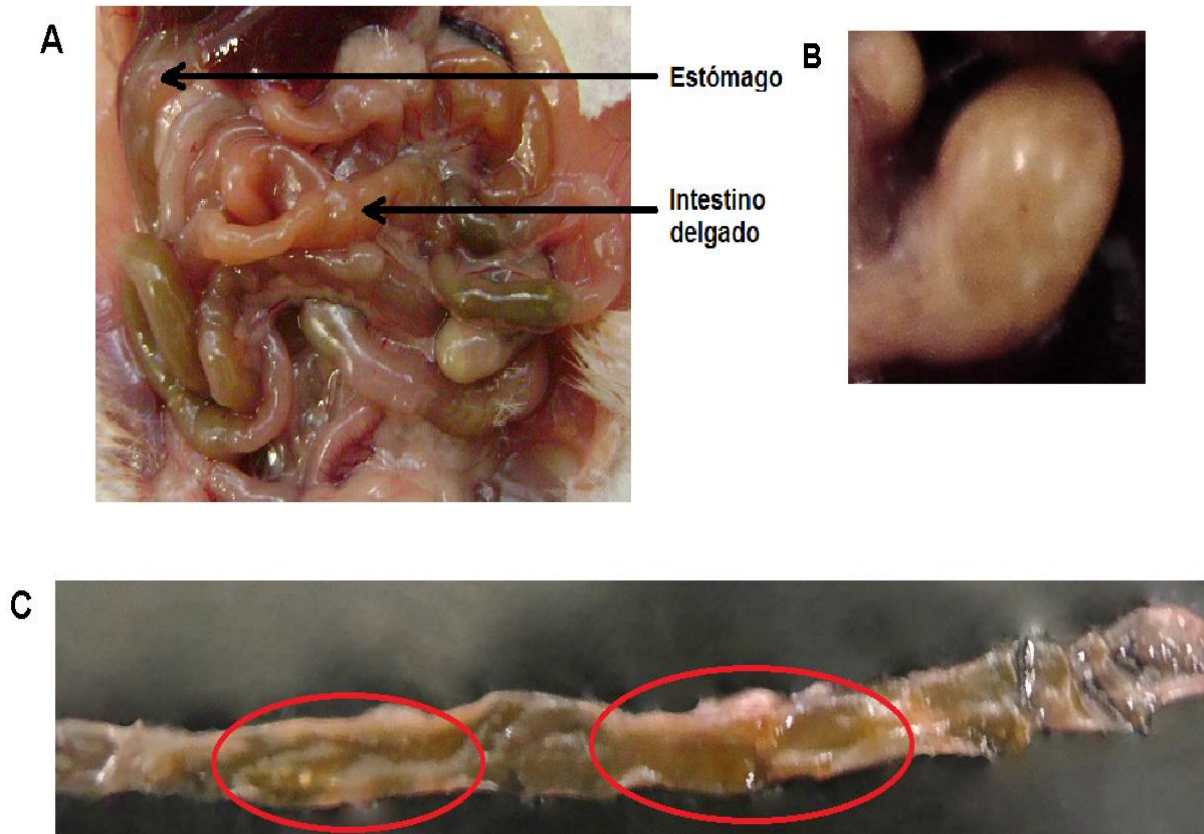


Figura 52 Tracto gastrointestinal de ratón abierto 3 horas después de la administración por vía oral de suspensión de nanopartículas cargadas de curcumina.

La Figura 52-A muestra la apariencia del tubo digestivo del ratón al cual se administró la suspensión de nanocápsulas cargadas de curcumina. En este se observa restos del sistema coloidal a lo largo de todo el tubo digestivo (Figura 52-C), que significa un mayor tiempo de permanencia del sistema lo que eventualmente pudiera generar una mayor absorción y en consecuencia biodisponibilidad de la curcumina.

Al igual que en el experimento al cual solo se administró la suspensión de curcumina se distinguen restos de la suspensión de nanopartículas al observarse un color amarillo característico en el estómago del animal de prueba (Figura 52-B). Según Tamez-Treviño y col. [144] se observó que después de 10 horas de administrado un colorante vegetal, se encuentran restos en el intestino grueso pero no en el intestino delgado y el estómago. La verificación de la mucoadhesividad en el estómago de la suspensión de nanopartículas obtenidas requiere la administración de la formulación seleccionada y un tiempo de espera antes del sacrificio de aproximadamente 24 horas después de una única toma. Esta prueba no se realizó en este trabajo de tesis.

La explicación del fenómeno de mucoadhesión del quitosano que se observa en el experimento ha sido descrita por diferentes autores. Cuando el valor de pH de una solución de quitosano está por debajo de su pKa ($\text{pH} < 6.2$), el quitosano se encuentra positivamente cargado y es soluble en agua (Figura 53) [145].

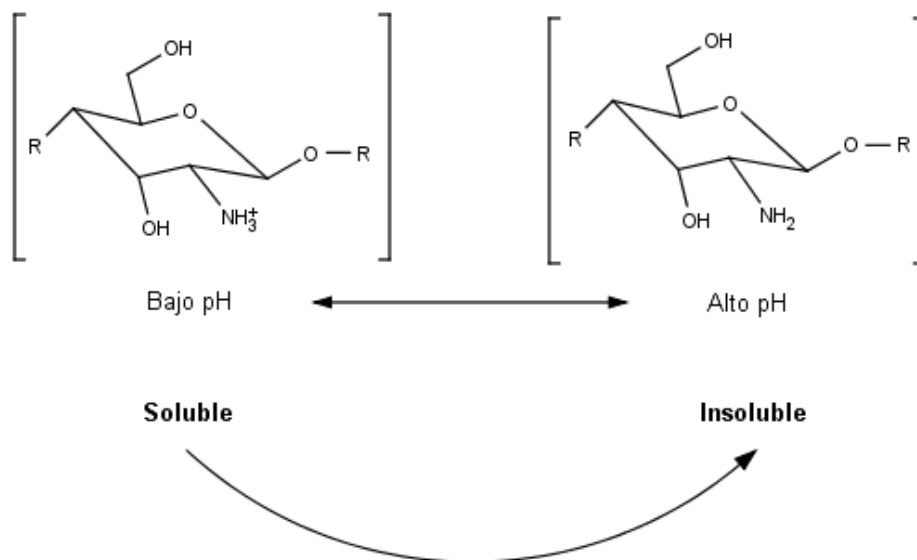


Figura 53 Representación esquemática de la ionización del quitosano [146].

Los principales componentes de todos los geles mucosos son mucina (no más de 5% de su peso), carbohidratos, lípidos, sales inorgánicas (alrededor del 1% de su peso) y agua. El agua representa aproximadamente el 95% de su peso, lo que hace de esto un sistema altamente hidratado [86, 147].

La mucina es el principal componente del mucus y le proporciona apariencia de moco y adhesividad. Los principales aminoácidos que componen la mucina son serina, treonina y prolina. Los oligosacáridos que forman parte de estas glicoproteínas tienen residuos de galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico (Figura 54) [147].

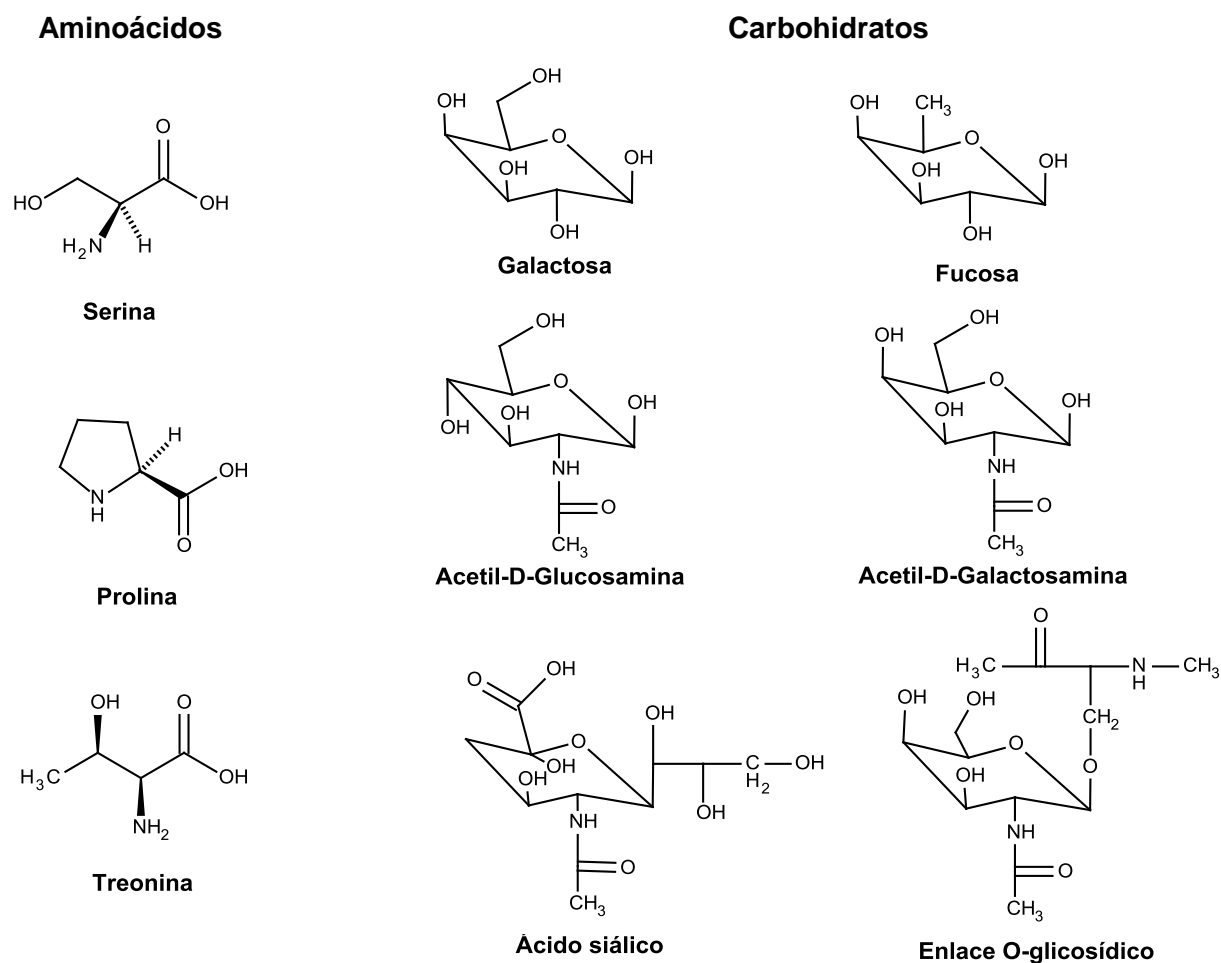


Figura 54 Estructuras químicas de los principales aminoácidos y carbohidratos que forman la mucina [147].

La carga positiva que adquiere el quitosano ionizado puede ser atraída por la carga negativa del ácido siálico y grupos fosfato presentes en la mucina del intestino [148]. Esto proporciona al sistema un tiempo de contacto más prolongado entre el sistema coloidal y la capa de mucosa que mejora la absorción de los fármacos [149].

De esta manera, la mucoadhesión del quitosano puede ser explicada mediante la teoría electrónica que sugiere que tanto el material mucoadhesivo como la membrana mucosa poseen cargas eléctricas opuestas y cuando ambos materiales se ponen en contacto la transferencia de electrones se debe a diferencias en su estructura electrónica dando como resultado la formación de una doble capa eléctrica en la interface con la subsecuente adhesión debido a las fuerzas de atracción.

Las pruebas *in vivo* son ilustrativas debido a que enfrentan al sistema coloidal a las condiciones fisiológicas y el estrés producido al ser ingerido por la vía oral. Es bien conocido que existen diferentes factores que afectan la adhesión a la mucosa del tracto gastrointestinal una vez que un sistema disperso es ingerido.

Según la caracterización *in vitro* de las nanocápsulas producidas, las nanocápsulas obtenidas para este trabajo de tesis cumplieron con los estándares de tamaño y potencial zeta que las hace óptimas para su administración y mostraron durante las pruebas *in vivo* y *ex vivo* comportamiento mucoadhesivo adecuado.

Aunque las nanocápsulas diseñadas en este trabajo, presentaron excelentes propiedades mucoadhesivas durante su caracterización, en los modelos *in vivo*, se obtiene solo información general sobre la captación, distribución y adhesión de las partículas ingeridas. Sin embargo, las diferencias entre especies y animales limitan la extrapolación a otros modelos y la comparación entre estos [150].

Para el desarrollo de una forma farmacéutica para la administración por vía oral se deben considerar las condiciones agresivas del medio gastrointestinal, la dilución que sufrirá al entrar en contacto con los líquidos que allí se encuentran e incluso los posibles fenómenos de degradación debido a la presencia de enzimas o bacterias [151]. En este sentido se ha observado que la cubierta polimérica formada de quitosano que funciona como protección al núcleo lipófilo puede sufrir degradación en el tracto gastrointestinal, que ocurre predominantemente en el intestino aunque este fenómeno puede variar entre especies [146]. Esto es particularmente complejo para especies como los rumiantes donde las condiciones fisiológicas de cada uno de los estómagos (retículo, rumen, omaso y abomaso) (Figura 18) es diferente y están diseñados para la degradación microbiana de las sustancias digeridas [151].

Según los parámetros considerados anteriormente y las pruebas realizadas, el abomaso podría considerarse adecuado para el fenómeno de mucoadhesión del quitosano pues presenta sobre su superficie la mucina necesaria para el fenómeno de mucoadhesión y al pH ácido del abomaso el quitosano se encontraría cargado positivamente favoreciendo el fenómeno mucoadhesivo.

Es importante considerar que las nanopartículas que se administran por vía oral a un organismo vivo tienen limitaciones que incluyen la posibilidad de adherirse a superficies no específicas. Es probable que en lugar de llegar a una capa de moco que se encuentra firmemente adherida y que se elimina lentamente, las nanopartículas mucoadhesivas queden atrapadas en una capa de moco débilmente adherida y sean susceptibles a una rápida eliminación [150].

Los estudios de caracterización de la mucoadhesión *In vivo en ratones BALB/c* de las nanocápsulas desarrolladas en este trabajo de tesis fueron favorables en el intestino de este modelo animal por lo que esta misma situación podría presentarse en el intestino de esta especie animal. En este sentido se ha demostrado que el quitosano asociado a un dispositivo de vehiculización, como son las nanocápsulas, aumenta la absorción de compuestos pobremente solubles en agua, aunque esta propiedad dependerá de la presencia de mucus sobre la superficie y las propiedades fisicoquímicas del quitosano como son el peso molecular y el grado de acetilación del polímero empleado [152, 153].

Un aspecto que es importante para el buen desempeño de las nanocápsulas cubiertas de quitosano es el pH. Al menos desde un punto de vista teórico, desde el inicio de la administración por vía oral, la saliva podría ofrecer un obstáculo importante debido a su pH de entre 8.1 y 8.3 y al cual el quitosano se encontraría eléctricamente neutro. Sin embargo, la alta concentración de sales y en consecuencia de iones presentes en la saliva, principalmente Na, P, Cl, K, y en menor medida Ca y Mg, podrían según los estudios de caracterización favorecer la estabilidad de las nanocápsulas, permitiendo su llegada al rumen.

Finalmente, aunque las pruebas de caracterización han aportado valiosos resultados en cuanto a las propiedades físicas y de desempeño de la formulación de nanocápsulas propuestas se propone como continuación de este estudio someter a las nanocápsulas a

las condiciones que en el rumen imperan pues, como se ha mencionado anteriormente aunque las pruebas *in vitro* son una buena aproximación del comportamiento que tendrán estos sistemas farmacéuticos, solo *in vivo*, se obtiene información sobre la captación, distribución y adhesión de las partículas ingeridas.



LEDEFAR

Conclusiones



Mario Alberto Cano Vega
Lic. Farmacia

Conclusiones

En función del trabajo experimental realizado como parte del desarrollo farmacéutico, de las técnicas de caracterización aplicadas y el análisis realizado de los resultados se obtuvo una suspensión farmacéutica de nanocápsulas constituidas por un núcleo oleoso con capacidad de almacenar en su interior curcumina, fármaco hidrófobo de múltiple aplicación terapéutica. La formación de las nanocápsulas fue posible gracias a la incorporación de tensoactivos no iónicos y presentaron un tamaño de partícula promedio de 168 nm con índices de polidispersión de 0.377, valor mayor a 0.3 considerado como aceptable.

Las nanocápsulas obtenidas demostraron ser tolerantes a la dilución en agua y soluciones amortiguadoras y fueron estables a pH menores a 6, además de presentar un interesante fenómeno de reestabilización cuando los valores de pH se encontraban por arriba de 6.

Las nanocápsulas obtenidas mostraron ser estables físicamente durante un periodo de almacenamiento de 16 semanas de almacenamiento a 4 °C demostrando con ello la estabilidad electrostática y estérica proporcionada por los componentes seleccionados para su formulación.

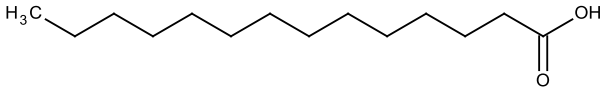
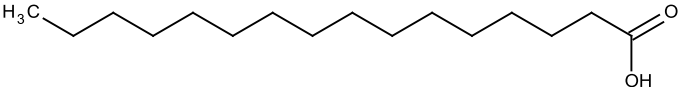
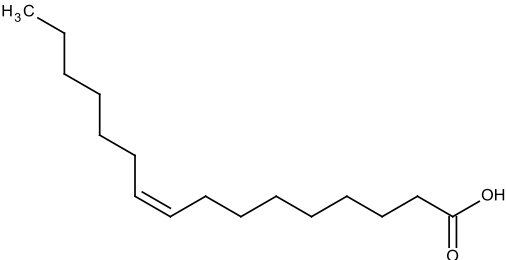
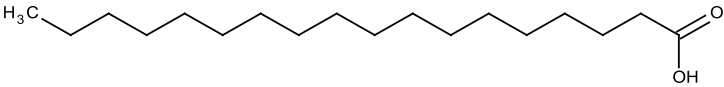
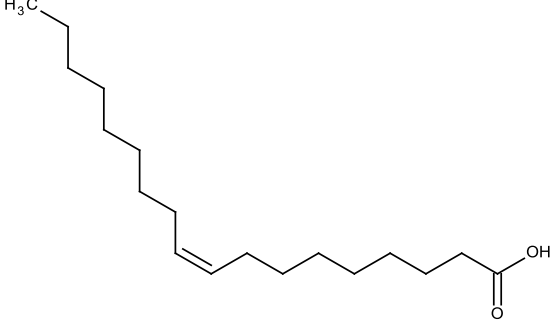
Finalmente, el recubrimiento con quitosano de las nanocápsulas les proporcionó capacidad mucoadhesiva, mostrando un excelente desempeño después de la administración vía oral.

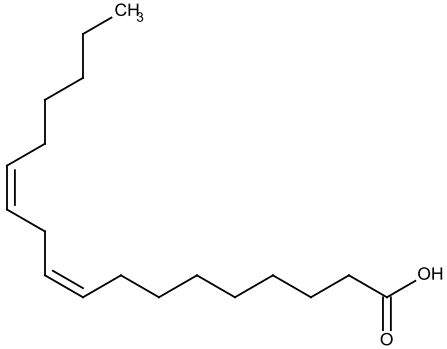
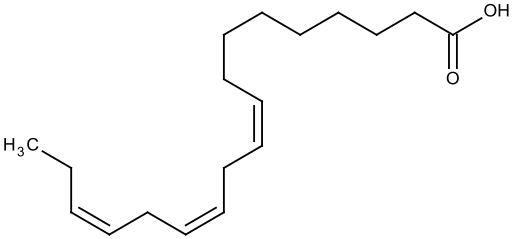
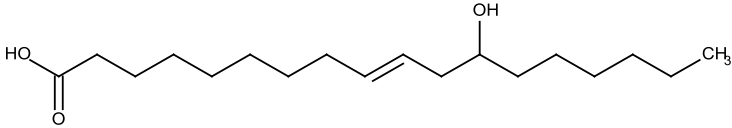
Anexo

A. Ácidos grasos presentes en los aceites vegetales.

La siguiente tabla muestra la Fórmula condensada y formula desarrollada de los principales ácidos grasos presentes en los aceites vegetales empleados durante la experimentación.

Tabla 24 Fórmula condensada y formula desarrollada de los principales ácidos grasos presentes en los aceites vegetales empleados durante la experimentación.

Ácido graso		Fórmula condensada	Fórmula desarrollada
Ácido mirístico	C:14	$C_{14}H_{28}O_2$	
Ácido palmítico	C:16	$C_{16}H_{32}O_2$	
Ácido palmitoleico	C:16:1	$C_{16}H_{30}O_2$	
Ácido esteárico	C:18	$C_{18}H_{36}O_2$	
Ácido oleico	C:18:1	$C_{18}H_{34}O_2$	

Ácido linoleico	C:18:2	$C_{18}H_{32}O_2$	
Ácido linolénico	C:18:3	$C_{18}H_{30}O_2$	
Ácido ricinoleico	--	$C_{18}H_{34}O_3$	

B. Disolventes residuales en principios activos, excipientes y medicamentos.

La Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) ha definido los límites de contenido de disolventes que pueden subsistir en los principios activos, los excipientes y los medicamentos después de la fabricación. Los disolventes residuales han sido evaluados según su posible riesgo para la salud humana, y clasificados en una de las tres categorías que se describen en la siguiente tabla [154]:

Tabla 25 Clasificación de disolventes residuales en fármacos, excipientes y medicamentos [154].

Clase	Características
Clase 1	Disolventes residuales que deberán evitarse: <ul style="list-style-type: none"> • Sustancias carcinógenas conocidas para los seres humanos. • Riesgos relacionados con el medio ambiente.
Clase 2	Disolventes residuales que deben limitarse: <ul style="list-style-type: none"> • Sustancias carcinógenas y no genotóxicas, o posibles

<p>Clase 3</p>	<p>agentes causantes de otras toxicidades irreversibles tales como neurotoxicidad o teratogenicidad en los animales.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Disolventes que se piensa que son causantes de otras toxicidades significativas, pero reversibles. <p>Disolventes con bajo potencial tóxico para los seres humanos; no es necesario un límite de exposición basado en la salud. Los residuales de Clase 3 puede tener una “Exposición diaria permitida” de hasta 50 mg o más por día.</p>
----------------	--

Referencias

- [1] H. Hatcher, R. Planalp, J. Cho, F.M. Torti, S.V. Torti, Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials, *Cell. Mol. Life Sci.*, 65 (2008) 1631-1652.
- [2] J.B. Gutiérrez, *Calidad de vida, alimentos y salud humana: Fundamentos científicos*, in, Ediciones Díaz de Santos, España 2005.
- [3] B. Adinew, *Phytochemistry of Turmeric: an overview*, *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education*, 21 (2012) 888-897.
- [4] M.D. Mesa, M.C. Ramírez-Tortosa, C.M. Aguilera, A. Ramírez-Boscá, A. Gil, Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides, in, *Ars Pharmaceutica*, 2000, pp. 307-321.
- [5] A. Maxia, C. Lancioni, L. Mura, P.D. Mongiano, *Plantas usadas en la práctica etnoveterinaria en el Nuorese (Cerdeña, Italia)*, in, 2005, pp. 155-161.
- [6] B.M. Flores, *Medicina etnoveterinaria: Una síntesis bibliográfica.*, in, *Vétérinaires sans frontières*, 2004.
- [7] C. McCorkle, *An introduction to ethnoveterinary research and development*, *Journal of Ethnobiology*, 6 (1986) 129 -149.
- [8] A.J. Ruby, G. Kuttan, K. Dinesh Babu, K.N. Rajasekharan, R. Kuttan, *Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids*, *Cancer Letters*, 94 (1995) 79-83.
- [9] V. Menon, A. Sudheer, *Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin in: B. Aggarwal, Y.-J. Surh, S. Shishodia (Eds.) The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, Springer US, 2007, pp. 105-125.
- [10] R.A. Sharma, A.J. Gescher, W.P. Steward, *Curcumin: The story so far*, *European Journal of Cancer*, 41 (2005) 1955-1968.
- [11] I. Stankovic, *Curcumin. Chemical and Technical Assessment (CTA)*, in: *Chemical and Technical Assessment*, FAO, 2004.
- [12] M. Bernabé-Pineda, M.a.T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, E. González-Vergara, A. Rojas-Hernández, *Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60 (2004) 1091-1097.
- [13] S.S. Sasaki, K. Sat, M. Abe, N. Sugimoto, T. Maitani, *Components of turmeric oleoresin preparations and photo-stability of curcumin*, *Jpn. J. Food Chem.*, 5 (1998).
- [14] 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.
- [15] A. Tawatsin, S. D.Wratten, R.R. Scott, U. Thavara, Y. Techadamrongsin, *Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors*, *Journal of Vector Ecology*, 26 (2001) 76-82.
- [16] A. Apisariyakul, N. Vanittanakom, D. Buddhasukh, *Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae)*, *Journal of Ethnopharmacology*, 49 (1995) 163-169.
- [17] J. Lutomski, B. Kedzia, W. Debska, *Effect of an alcohol extract and of active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi (author's transl)*, *Planta medica*, 26 (1974) 9-19.
- [18] Z.L. ZJ, L. Zhang, D. Dezube, CSCrumpacker, A. Pardee, *Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication.*, *Proc Natl Acad Sci*, 90 (1993) 1839-1842.
- [19] A. Mazumder, K. Raghavan, J. Weinstein, K.W. Kohn, Y. Pommier, *Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin*, *Biochemical Pharmacology*, 49 (1995) 1165-1170.

- [20] F. Kiuchi, Y. Goto, N. Sugimoto, N. Akao, K. Kondo, Y. Tsuda, Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids., *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 41 (1993) 1640-1643.
- [21] S. Luper, A review of plants used in the treatment of liver disease: part two., *Altern Med Rev.*, 4 (1999) 178-188.
- [22] Rasyid, Lelo, The effect of curcumin and placebo on human gall-bladder function: an ultrasound study, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 13 (1999) 245-249.
- [23] M. Hussain, N. Chandrasekhara, Biliary proteins from hepatic bile of rats fed curcumin or capsaicin inhibit cholesterol crystal nucleation in supersaturated model bile., *Indian J Biochem Biophys*, 31 (1994) 407-412.
- [24] K. Soudamini, R. Kuttan, Chemoprotective effect of curcumin against cyclophosphamide toxicity, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54 (1992) 213-217.
- [25] U. Deshpande, S. Gadre, ASRaste, D. Pillai, S. Bhide, A. Samuel, Protective effect of turmeric (*Curcuma longa* L.) extract on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats., *Indian J Exp Biol*, 36 (1998) 573-577.
- [26] I. Donathus, Interaction between curcumin and paracetamol. Studies on the pharmacological and toxicological aspects of paracetamol metabolism., in, *Universitاس Gadjah-Mada, Indonesia* 1994.
- [27] V.K. Goud, K. Polasa, K. Krishnaswamy, Effect of turmeric on xenobiotic metabolising enzymes, *Plant Food Hum Nutr*, 44 (1993) 87-92.
- [28] J. B.Gutiérrez, Calidad de vida, alimentos y salud humana: Fundamentos científicos, in, *Ediciones Díaz de Santos* 2005.
- [29] S. Nelson, P. Pearson, Covalent and noncovalent interactions in acute lethal cell injury caused by chemicals, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 30 (1990) 169-195.
- [30] P. Nicotera, G. Bellomo, S. Orrenius, The role of calcium in cell killing, *Chemical Research in Toxicology*, 3 (1990) 484-494.
- [31] R. Parshad, K. Sanford, F. Price, V. Steele, R. Tarone, G. Kelloff, C. Boone, Protective action of plant polyphenols on radiation-induced chromatid breaks in cultured human cells., *Anticancer Res*, 18 (1998) 3263-3266.
- [32] N. Sreejayan, M. Rao, Free radical scavenging activity of curcuminoids, *Arzneimittelforschung.*, 46 (1996) 169-171.
- [33] M. Subramanian, Sreejayan, M. Rao, T. Devasagayam, B. Singh, Diminution of singlet oxygen-induced DNA damage by curcumin and related antioxidants., *Mutat Res*, 311 (1994) 249-255.
- [34] M.K. Unnikrishnan, M.N.A. Rao, Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin, *Mol Cell Biochem*, 146 (1995) 35-37.
- [35] A.C. Pulla Reddy, B.R. Lokesh, Effect of dietary turmeric (*curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver, *Food and Chemical Toxicology*, 32 (1994) 279-283.
- [36] J. Quiles, C. Aguilera, M. Mesa, M. Ramírez-Tortosa, L. Baró, A. Gil, An ethanolic-aqueous extract of *Curcuma longa* decreases the susceptibility of liver microsomes and mitochondria to lipid peroxidation in atherosclerotic rabbits., *Biofactors*, 8 (1998) 51-57.
- [37] G.S. Sidhu, A.K. Singh, D. Thaloor, K.K. Banaudha, G.K. Patnaik, R.C. Srimal, R.K. Maheshwari, Enhancement of wound healing by curcumin in animals, *Wound Repair and Regeneration*, 6 (1998) 167-177.
- [38] Campbell, Reece, *Biología 7ed.*, Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, 2005.
- [39] M. Huang, W. Ma, P. Yen, J. Xie, J. Han, K. Frenkel, D. Grunberger, A. Conney, Inhibitory effects of topical application of low doses of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and oxidized DNA bases in mouse epidermis., *Carcinogenesis*, 18 (1997) 83-88.
- [40] Vijayalaxmi, Genetic effects of turmeric and curcumin in mice and rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 79 (1980) 125-132.

- [41] A. Mukhopadhyay, N. Basu, N. Ghatak, P.K. Gujral, Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats, *Agents and Actions*, 12 (1982) 508-515.
- [42] S. Deodhar, R. Sethi, R. Srimal, Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J Med Res*, 71 (1980) 631-634.
- [43] R.C. Srimal, B.N. Dhawan, Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 25 (1973) 447-452.
- [44] M.-T. Huang, T. Lysz, T. Ferraro, T.F. Abidi, J.D. Laskin, A.H. Conney, Inhibitory Effects of Curcumin on in Vitro Lipoxygenase and Cyclooxygenase Activities in Mouse Epidermis, *Cancer Res*, 51 (1991) 813-819.
- [45] G. Began, E. Sudharshan, A.G.A. Rao, Inhibition of lipoxygenase 1 by phosphatidylcholine micelles-bound curcumin, *Lipids*, 33 (1998) 1223-1228.
- [46] J.T. Piper, S.S. Singhal, M.S. Salameh, R.T. Torman, Y.C. Awasthi, S. Awasthi, Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30 (1998) 445-456.
- [47] P. Suresh Babu, K. Srinivasan, Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rat, *Mol Cell Biochem*, 152 (1995) 13-21.
- [48] M. Hussain, N. Chandrasekhara, Effect on curcumin on cholesterol gall-stone induction in mice., *Indian Journal of Medical Research*, (1992) 288-291.
- [49] G.B. Sajithlal, P. Chithra, G. Chandrakasan, Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats, *Biochemical Pharmacology*, 56 (1998) 1607-1614.
- [50] P.S. Babu, K. Srinivasan, Amelioration of renal lesions associated with diabetes by dietary curcumin in streptozotocin diabetic rats, *Mol Cell Biochem*, 181 (1998) 87-96.
- [51] G.S. Sidhu, H. Mani, J.P. Gaddipati, A.K. Singh, P. Seth, K.K. Banaudha, G.K. Patnaik, R.K. Maheshwari, Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice, *Wound Repair and Regeneration*, 7 (1999) 362-374.
- [52] O.M.S., Cáncer, in, *Organización Mundial de la Salud 2013*.
- [53] A. Khar, A.M. Ali, B.V.V. Pardhasaradhi, Z. Begum, R. Anjum, Antitumor activity of curcumin is mediated through the induction of apoptosis in AK-5 tumor cells, *FEBS Letters*, 445 (1999) 165-168.
- [54] I. Norris, P. Sriganth, B. Premalatha, Dietary curcumin with cisplatin administration modulates tumour marker indices in experimental fibrosarcoma *Pharmacological Research*, 39 (1999) 175-179.
- [55] M. Pereira, C. Grubbs, L. Barnes, H. Li, G. Olson, I. Eto, M. Juliana, L. Whitaker, G. Kelloff, V.Steele, R. Lubet, Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats., *Carcinogenesis*, 17 (1996) 1305-1311.
- [56] P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman, B.B. Aggarwal, Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises, *Molecular Pharmaceutics*, 4 (2007) 807-818.
- [57] R. Sharma, W. Steward, A. Gescher, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin., *Adv Exp Med Biol.*, (2007) 453-470.
- [58] M.-H. Pan, T.-M. Huang, J.-K. Lin, Biotransformation of Curcumin Through Reduction and Glucuronidation in Mice, *Drug Metabolism and Disposition*, 27 (1999) 486-494.
- [59] S. Setthacheewakul, S. Mahattanadul, N. Phadoongsombut, W. Pichayakorn, R. Wiwattanapatapee, Development and evaluation of self-microemulsifying liquid and pellet formulations of curcumin, and absorption studies in rats, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76 (2010) 475-485.

- [60] L. Mazzarino, C. Travelet, S. Ortega-Murillo, I. Otsuka, I. Pignot-Paintrand, E. Lemos-Senna, R. Borsali, Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications, *Journal of Colloid and Interface Science*, 370 (2012) 58-66.
- [61] Y.-M. Tsai, C.-F. Chien, L.-C. Lin, T.-H. Tsai, Curcumin and its nano-formulation: The kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration, *International Journal of Pharmaceutics*, 416 (2011) 331-338.
- [62] N. Suwannateep, W. Banlunara, S.P. Wanichwecharungruang, K. Chiablaem, K. Lirdprapamongkol, J. Svasti, Mucoadhesive curcumin nanospheres: Biological activity, adhesion to stomach mucosa and release of curcumin into the circulation, *Journal of Controlled Release*, 151 (2011) 176-182.
- [63] E. Merisko-Liversidge, G.G. Liversidge, Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (2011) 427-440.
- [64] M. García-Fuentes, D. Torres, M.J. Alonso, Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27 (2003) 159-168.
- [65] Nanomedicine: Nanotechnology for Health, in, *European Technology Platform on NanoMedicine*, 2006.
- [66] R.A. Freitas Jr, What is nanomedicine?, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1 (2005) 2-9.
- [67] J.L.V. Jato, Nanotecnología farmacéutica: una galénica emergente, in: I.d.E.R.A.N.d. Farmacia (Ed.), Madrid, 2006.
- [68] J.M. Irache, I. Esparza, C. Gamazo, M. Agüeros, S. Espuelas, Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics, *Veterinary Parasitology*, 180 (2011) 47-71.
- [69] L. Villafuerte-Robles, Nanotecnología Farmacéutica. , in, *Razón y Palabra*, 2009, pp. 1-20.
- [70] R.H. Müller, C. Jacobs, O. Kayser, Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (2001) 3-19.
- [71] A. Hill, S. Geißler, M. Meyring, S. Hecht, M. Weigandt, K. Mäder, In vitro–in vivo evaluation of nanosuspension release from subcutaneously implantable osmotic pumps, *International Journal of Pharmaceutics*, 451 (2013) 57-66.
- [72] J. Salazar, A. Ghanem, R.H. Müller, J.P. Möschwitzer, Nanocrystals: Comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81 (2012) 82-90.
- [73] V.P. Torchilin, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (2005) 145-160.
- [74] Y. Li, C.-P. Lee, *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, 3 ed., Informa healthcare, New York, 2007.
- [75] G.R. Rivera Rodríguez, Nuevos transportadores de fármacos: nanocápsulas de poliasparagina y caseína in: Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica Universidad de Santiago de Compostela España 2012, pp. 247.
- [76] A.M.R. Álvarez, M.L.G. Rodríguez, Tratado de medicina farmacéutica in: G.H. Herrero, A.M. González, F. Zaragoza, A. Porras (Eds.) *Formas farmacéuticas innovadoras y formas de liberación sostenida*, Editorial Panamericana Madrid, 2010.
- [77] P. Guadarrama, Dendrimeros, in: *Materiales Funcionales Orgánicos*, IIM-Polímeros UNAM, 2008.
- [78] Poly(amidoamine) dendrimers, in: D. generations (Ed.), *The Michigan Nanotechnology Institute for Medicine and Biological Sciences (MNIMBS)*, U.S.A., 2010.
- [79] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 385 (2010) 113-142.

- [80] Medscape(R), Nanosphere y nanocapsule, in, Medscape(R), 2010.
- [81] C. Pinto 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.
- [82] P. Couvreur, G. Barratt, E. Fattal, P. Legrand, C. Vauthier, Nanocapsule Technology: A Review, in: *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2002.
- [83] Measurement Techniques For Nanoparticles, in, University of Essex for Nanocap, 2009.
- [84] Malvern-Instruments, Zeta Potential. An introduction in 30 minutes in: Malvern-Instruments (Ed.), Malvern Instruments
- [85] Malvern-Instruments, Measuring zeta potential using phase analysis light scattering (PALS), in, Malvern-Instruments
- [86] J.D. Smart, The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (2005) 1556-1568.
- [87] S. Singh, M. Govind, S.B. Bothara, A Review on in vitro - in vivo Mucoadhesive Strength Assessment, *PhTechMed*, 2 (2013) 221-229.
- [88] G.S. Asane, S.A. Nirmal, K.B. Rasal, A.A. Naik, M.S. Mahadik, Y.M. Rao, Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery System: A Current Status, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34 (2008) 1246-1266.
- [89] G.P. Andrews, T.P. Laverty, D.S. Jones, Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71 (2009) 505-518.
- [90] M.G. Volonté, Sistemas bioadhesivos de liberación de drogas, *Revista farmacéutica*, 154 (2012) 56-71.
- [91] J. Hombach, A. Bernkop-Schnürch, Mucoadhesive Drug Delivery Systems in: M. Schäfer-Korting (Ed.) *Drug delivery*, Springer Alemania 2010.
- [92] F.C. Carvalho, M.L. Bruschi, R.C. Evangelista, M.P.D. Gremião, Mucoadhesive drug delivery systems, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46 (2010) 1-18.
- [93] M.N.V. Ravi Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*, 46 (2000) 1-27.
- [94] B.B. Aam, E.B. Heggset, A.L. Norberg, M. Sørli, K.M. Vårum, V.G.H. Eijsink, Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine, *Marine Drugs*, 8 (2010) 1482-1517.
- [95] V. Grabovac, D. Guggi, A. Bernkop-Schnürch, Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (2005) 1713-1723.
- [96] I. Bravo-Osuna, C. Vauthier, A. Farabollini, G.F. Palmieri, G. Ponchel, Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles, *Biomaterials*, 28 (2007) 2233-2243.
- [97] D.C. Church, *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*, Acribia España 1993.
- [98] A.E. Relling, G.A. Mattioli, *Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes*, in, Editorial EDULP, 2003.
- [99] *Ruminant digestion* in, Addison Wesley Logman Inc., 1999.
- [100] M. Hutjens, *Guía de Alimentación*, in, W.D. Hoards and Sons Company, E.U.A., 2003.
- [101] Altiec, *Wheatgerm oil*, in, 2009.
- [102] I.L. Valdez, O. Farfan, O. Sterner, A.G. Turba, Estudios preliminares de la caracterización química de ácidos grasos del aceite de frutos de *Bertholletia excelsa* por cromatografía de gases, *BIOFARBO*, 17 (2009) 47-53.
- [103] S. Calsamiglia, A. Ferret, A. Bach, *Tablas FEDNA de valor nutritivo de forrajes y subproductos fibrosos húmedos*, in, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal., 2010.
- [104] *Handbook of pharmaceutical excipients 6ed.*, Pharmaceutical Press, London, 2009.

- [105] T. Meyer, D. Waidelich, A.W. Frahm, Separation and first structure elucidation of Cremophor® EL-components by hyphenated capillary electrophoresis and delayed extraction-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, *ELECTROPHORESIS*, 23 (2002) 1053-1062.
- [106] M. Tobío, J. Nolley, Y. Guo, J. McIver, M. José Alonso, A Novel System Based on a Poloxamer/ PLGA Blend as a Tetanus Toxoid Delivery Vehicle, *Pharm Res*, 16 (1999) 682-688.
- [107] M.D. Blanco, M.J. Alonso, Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 43 (1997) 287-294.
- [108] D.J. McClements, E.A. Decker, Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems, *Journal of Food Science*, 65 (2000) 1270-1282.
- [109] N.J. Fox, G.W. Stachowiak, Vegetable oil-based lubricants—A review of oxidation, *Tribology International*, 40 (2007) 1035-1046.
- [110] H.T. Osborn, C.C. Akoh, Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions, *Food Chemistry*, 84 (2004) 451-456.
- [111] Sigma-Aldrich, Castor oil, in, Sigma-Aldrich, 2013.
- [112] Sigma-Aldrich, α -Tocopherol (Vitamin E), in, Sigma-Aldrich, 2013.
- [113] RightAnswer®, Castor oil, in, HSDB® - Hazardous Substances Data Bank, 2010.
- [114] RightAnswer®, HSDB® Data Bank - VITAMIN E, in, HSDB® - Hazardous Substances Data Bank, 2006.
- [115] Gustav-Heess(R), Aceite de ricino. Castor Oil No. 1, in, Gustav Heess(R), 2012.
- [116] Sciencelab(R), Vitamin E MSDS, in, Sciencelab(R), U.S.A., 2013.
- [117] T. Gonzalo, G. Lollo, M. Garcia-Fuentes, D. Torres, J. Correa, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, P. Calvo, P. Avilés, M.J. Guillén, M.J. Alonso, A new potential nanononcological therapy based on polyamino acid nanocapsules, *Journal of Controlled Release*, 169 10-16.
- [118] P.M. Bummer, Remington: Farmacia 20 ed., Editorial Médica Panamericana Buenos Aires 2003.
- [119] M.C. Jiménez, J.S. Camino, L.A.V. Alonso, Química física para ingenieros químicos, in, UPV, España, 2006.
- [120] A. Zanotto-Filho, K. Coradini, E. Braganhol, R. Schröder, C.M. de Oliveira, A. Simões-Pires, A.M.O. Battastini, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, C.M. Forcelini, R.C.R. Beck, J.C.F. Moreira, Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83 (2013) 156-167.
- [121] Modelo lineal generalizado, in, Wikipedia. La enciclopedia libre. , 2013.
- [122] L. Cayuela, Modelos lineales generalizados (GLM), in, Universidad de Granada, 2010, pp. 30.
- [123] Modelos lineales generalizados, in: Statgraphics User's guide, Statgraphics(R), 2006.
- [124] R.G. Amaro, D.P. Pérez, Estructura y función del tejido linfoido asociado al tracto gastrointestinal in: R.R. Cabello, I.H. Bernavente (Eds.) Síndrome diarreico infeccioso, Editorial Médica Panamericana Madrid, España 2002, pp. 13-14.
- [125] J.M. Llabot, S.D. Palma, D.A. Allemandi, Nanopartículas poliméricas sólidas, *Farmacotecnia* (2008) 40-47.
- [126] R.K. Das, N. Kasoju, U. Bora, Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6 (2010) 153-160.

- [127] F. Akhtar, M.M.A. Rizvi, S.K. Kar, Oral delivery of curcumin bound to chitosan nanoparticles cured Plasmodium yoelii infected mice, *Biotechnology Advances*, 30 (2012) 310-320.
- [128] J. Liu, L. Xu, C. Liu, D. Zhang, S. Wang, Z. Deng, W. Lou, H. Xu, Q. Bai, J. Ma, Preparation and characterization of cationic curcumin nanoparticles for improvement of cellular uptake, *Carbohydrate Polymers*, 90 (2012) 16-22.
- [129] J. Duan, Y. Zhang, S. Han, Y. Chen, B. Li, M. Liao, W. Chen, X. Deng, J. Zhao, B. Huang, Synthesis and in vitro/in vivo anti-cancer evaluation of curcumin-loaded chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 400 (2010) 211-220.
- [130] M. Alva-Huerta, Estudio para minimizar la formación de espuma en mezclas de aminas utilizadas en el proceso de endulzamiento de gas natural in: Departamento de Ingeniería Química y Alimentos Universidad de las Américas Puebla, Puebla 2005.
- [131] D. Moinard-Chécot, Y. Chevalier, S. Briancon, L. Beney, H. Fessi, Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process, *Journal of Colloid and Interface Science*, 317 (2008) 458-468.
- [132] P.C. Schulz, M.S. Rodríguez, L.F. Del Blanco, M. Pistonesi, E. Agull, Emulsification properties of chitosan, *Colloid Polym Sci*, 276 (1998) 1159-1165.
- [133] I. Pepi, J. Filipovi-Gri, I. Jalenjk, Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 327 (2008) 95-102.
- [134] W. Norde, *Colloids and interfaces in life sciences and bionanotechnology*, in, CRC Press, U.S.A., 2011.
- [135] R. Xu, *Electrophoretic light scattering in: Particle characterization: light scattering methods* Kluwer Academic Publishers Holanda 2001.
- [136] P. Hiemenz, R. Rajagopalan, *Principles of colloid and surface chemistry 3ed.*, Marcel Dekker U.S.A., 1997.
- [137] H. Ridaoui, A. Jada, L. Vidal, J.B. Donnet, Effect of cationic surfactant and block copolymer on carbon black particle surface charge and size, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 278 (2006) 149-159.
- [138] M.J. Santander-Ortega, J.M. Peula-García, F.M. Goycoolea, J.L. Ortega-Vinuesa, Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82 (2011) 571-580.
- [139] Y. Hu, X. Jiang, Y. Ding, H. Ge, Y. Yuan, C. Yang, Synthesis and characterization of chitosan–poly(acrylic acid) nanoparticles, *Biomaterials*, 23 (2002) 3193-3201.
- [140] M. Santander-Ortega, M. Lozano-López, D. Bastos-González, J. Peula-García, J. Ortega-Vinuesa, Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces, *Colloid Polym Sci*, 288 (2010) 159-172.
- [141] L.M. Ensign, R. Cone, J. Hanes, Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 557-570.
- [142] P. He, S.S. Davis, L. Illum, In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 166 (1998) 75-88.
- [143] A.R. Dudhani, S.L. Kosaraju, Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization, *Carbohydrate Polymers*, 81 (2010) 243-251.
- [144] E. Tamez-Treviño, J. Sepúlveda-Saavedra, R. Ramírez-Romero, M.d.S.F. Castañeda, Determinación de la velocidad de tránsito intestinal en el ratón BALB/c, *Vet. Mx.*, 27 (1996) 241-243.
- [145] Y.-F. Tang, Y.-M. Du, X.-W. Hu, X.-W. Shi, J.F. Kennedy, Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) blend hydrogel, *Carbohydrate Polymers*, 67 (2007) 491-499.

- [146] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 36 (2011) 981-1014.
- [147] N.A. Peppas, Y. Huang, Nanoscale technology of mucoadhesive interactions, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (2004) 1675-1687.
- [148] Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kuno, Mucoadhesive DL-Lactide/Glycolide Copolymer Nanospheres Coated with Chitosan to Improve Oral Delivery of Elcatonin, *Pharmaceutical Development and Technology*, 5 (2000) 77-85.
- [149] R.J. Soane, M. Frier, A.C. Perkins, N.S. Jones, S.S. Davis, L. Illum, Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans, *International Journal of Pharmaceutics*, 178 (1999) 55-65.
- [150] F. Delie, Evaluation of nano- and microparticle uptake by the gastrointestinal tract, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34 (1998) 221-233.
- [151] S. Şenel, S.J. McClure, Potential applications of chitosan in veterinary medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (2004) 1467-1480.
- [152] C. Prego, M. Fabre, D. Torres, M.J. Alonso, Efficacy and Mechanism of Action of Chitosan Nanocapsules for Oral Peptide Delivery, *Pharm Res*, 23 (2006) 549-556.
- [153] N.G.M. Schipper, K.M. Vårum, P. Stenberg, G. Ocklind, H. Lennernäs, P. Artursson, Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs: 3: Influence of mucus on absorption enhancement, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8 (1999) 335-343.
- [154] FEUM, Determinación de impurezas orgánicas volátiles in: FEUM, México, 2013.