



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

“DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN DE
NANOCÁPSULAS DE CURCUMINA EN SUSPENSIÓN PARA
USO VETERINARIO”

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

HERNÁNDEZ PATLÁN DANIEL

TUTOR PRINCIPAL:

**DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO
UNAM, FES-CUAUTITLÁN**

COMITÉ TUTORAL:

**DRA. HELGI JUNG COOK
UNAM, FACULTAD DE QUÍMICA**

**DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA
UNAM, FES-CUAUTITLÁN**

MÉXICO, D. F.,

MAYO 2014





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.

DEDICATORIAS

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A ti dios que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa.

Con mucho cariño principalmente a mis padres Leticia Patlán Boyzo y Jesús Hernández Gómez porque me han guiado en esta vida por el camino correcto. Gracias por su amor, comprensión, tolerancia, dedicación y apoyo incondicional. Este logro también es de ustedes.

A mi esposa Alejandra e hija Evelyn por ser mi fuerza y templanza. Gracias por su comprensión y paciencia durante esta etapa de mi vida. Las amo.

A mis hermanos Jorge Eduardo Hernández Patlán y Jesús Arturo Hernández Patlán porque siempre he contado con ellos para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido, por el apoyo y amistad. Gracias.

A mi amigo Bruno Solís Cruz que lo conozco desde hace tiempo, y ha sido un apoyo mutuo el que hemos tenido durante nuestra formación profesional y esta etapa que culmino. Espero seguir conservando esta amistad aunque tomemos rumbos diferentes. De aquí para Adelante!!!.

Y no me puedo ir sin antes decirles, que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado. Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Muchas Gracias a todos ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por abrirme sus puertas, por todo lo que en ella he aprendido y por permitirme cumplir otra gran meta.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado para realización de este proyecto de tesis. Así mismo al programa de becas Mixtas de CONACYT y al programa de movilidad estudiantil de la UNAM, los cuales a través del programa de posgrado financiaron mi estancia de 6 meses en Francia.

A la Dra. Raquel López Arellano y al DAR Juan José Díaz Esquivel por darme la confianza, ayuda y el apoyo para formar parte de un gran equipo de trabajo, pero sobre todo por brindarme su amistad. Así como A todos mis compañeros del LEDEFAR por el buen ambiente de trabajo creado.

A Dr. Gustavo R. Rivera, asesor de tesis, compañero y amigo, porque este trabajo es gracias a ti y a al compromiso mostrado por compartir parte del conocimiento que adquiriste durante tu formación, creo fue un factor importante para poder culminar con este proyecto de tesis.

A la Dra. Patricia Ramírez Noguera y a la Dra. Helgi Jung Cook, miembros de mi comité tutorial por toda la atención brindada para la realización de este proyecto. Gracias.

A la Dra. Elizabeth García García de los laboratorios Psicofarma S. A. de C.V., por el apoyo recibido durante la caracterización de los nanosistemas obtenidos.

Al Ing. Carlos Flores Morales del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM por la amabilidad brindada para la realización de la microscopia electrónica de transmisión.

A la Universidad de Auverge (Université d’Auverge), especialmente al ERT CIDAM (Equipe de Recherche Technologique Conception, Ingénierie et Développement de l’Aliment et du Médicament. Faculté de Médecine et de Pharmacie) por abrirme las puertas para concluir este proyecto.

A Eric Beyssac por ser una gran persona hablando en todos los sentidos. Gracias por tu amistad, apoyo y confianza puesta en mí, creo yo, que no podría haber estado mejor. No tengo palabras para describir lo satisfecho que estoy por el haber formado parte de un gran equipo de trabajo. Merci beaucoup Eric. J’espère que tu peux revenir aux Mexique bientôt et J’espère revenir aussi en Francia.

A Ghislain Garrait por todo el apoyo otorgado en relación con los estudios de toxicidad, permeabilidad y absorción durante mi estancia. De igual manera que Eric, eres una gran persona en todos los sentidos. Merci Ghislain (merci à madame Ghislain pour la tarte).

A M. Jean Michel Cardort, Valerie Hoffart, Samir Haddouchi (à tout le monde dans le laboratoire) por su amabilidad, comprensión y paciencia. Muchas gracias por hacer mi estancia en Francia una experiencia inolvidable (Merci beaucoup pour fait mon séjour en France une expérience inoubliable).

A Hassana (y amigos libaneses), Xie y Suenia por toda su ayuda recibida a lo largo de mi estancia en Francia. Con ustedes pase grandes momento, los cuales día a día hacían sentirme como en casa. No tengo palabras para agradecerles todo lo que hicieron por mí y aunque solamente conviví por corto tiempo contigo Suenia, siempre fuiste una magnfica persona. Hasta pronto (à bientôt et merci pour tout. Cette expérience a été formidable)

RESUMEN

La curcumina, un compuesto polifenólico natural, ha mostrado diversas propiedades farmacológicas, destacando principalmente sus propiedades anti-inflamatorias, quimioterapéuticas y antioxidantes. Aunque ensayos clínicos de Fase I han mostrado que la curcumina es un fitofármaco seguro incluso a dosis altas, ésta presenta baja solubilidad, baja absorción y por lo tanto pobre biodisponibilidad. Para mejorar su aplicabilidad en el área veterinaria como anti-inflamatorio-antioxidante, se desarrollaron dos sistemas nanocapsulares [Nanocápsulas de quitosán (NC-Q) y Nanocápsulas de alginato (NC-ALG)] compuestos de un núcleo de Vitamina E, y rodeados por una cubierta polimérica biodegradable de quitosán y alginato respectivamente. Las nanocápsulas fueron obtenidas por la técnica de desplazamiento de solvente modificada por G. Rivera (2012) y presentan una estabilidad de al menos 3 meses. Las NC-Q y NC-ALG mostraron tamaños de partícula alrededor de 116.7 ± 3.2 y 178 ± 7.9 nm, un índice de polidispersión de 0.107 y 0.149, eficacia de encapsulación $>98\%$ y potencial Zeta de 24.4 ± 2.1 y -49.0 ± 2.3 mV respectivamente. Los estudios de liberación *in vitro* realizados en el aparato IV USP-“Dialysis-Adapter” demostraron que el mecanismo predominante de liberación de la curcumina a partir de los nanosistemas fue difusión. Los estudios de citotoxicidad realizados en células Caco-2 utilizando el método de tinción con azul de tripan demostraron que incluso a concentraciones por unidad de superficie de $157.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($600 \mu\text{g}/\text{mL}$) de quitosán y alginatos, la viabilidad celular es $>80\%$. La permeabilidad se evaluó en células Caco-2 y demostró que en NC-Q y NC-ALG ésta incremento considerablemente, en comparación con una suspensión acuosa de curcumina. Los resultados obtenidos demostraron que los nanosistemas diseñados son una importante estrategia para mejorar la estabilidad, solubilidad y permeabilidad de la curcumina.

ABSTRACT

Curcumin, a natural polyphenolic compound, has shown several pharmacological properties, mainly emphasizing its anti-inflammatory, chemotherapeutic and antioxidant properties. Although phase I clinical trials have shown that curcumin is a safe phytodrug even at high doses, it has low solubility, low absorption and therefore poor bioavailability. To improve its applicability in the veterinary area as anti-inflammatory-antioxidant, two nanocapsules systems were developed [Chitosan nanocapsules (NC-Q) and Alginate nanocapsules (NC-ALG)] composed of a Vitamin-E core, and surrounded by a biodegradable polymeric shell of chitosan and alginate respectively. Nanocapsules were obtained by the solvent displacement technique modified by G. Rivera (2012) and they presented a stability of at least 3 months. NC-Q and NC-ALG showed a mean particle size of 116.7 ± 3.2 and 178 ± 7.9 nm, a polydispersion index of 0.107 and 0.149, encapsulation efficiency $>98\%$ and Zeta potential of 24.4 ± 2.1 and -49.0 ± 2.3 mV respectively. The *in vitro* release studies performed in USP apparatus IV-"Dialysis-Adapter" demonstrated that the predominant mechanism of curcumin release from nanosystems was diffusion. Cytotoxicity studies performed in Caco-2 cells using the method of trypan blue dye showed that even at concentration per unit area of $157.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($600 \text{ mg} / \text{mL}$) of chitosan and alginates, cell viability is $>80\%$. Permeability was evaluated in Caco-2 cells and showed that with NC-Q and NC-ALG this increased considerably, compared to an aqueous suspension of curcumin. The obtained results showed that nanosystems designed are an important strategy to improve stability, solubility and permeability of curcumin.

ÍNDICE

RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. AINE's Y MEDICINA ALTERNATIVA.....	2
1.2. CÚRCUMA LONGA L.: GENERALIDADES.....	5
1.2.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LA CURCUMINA.....	8
1.2.2. FARMACOCINÉTICA DE LA CURCUMINA.....	10
1.2.2.1. ABSORCIÓN.....	10
1.2.2.2. DISTRIBUCIÓN	11
1.2.2.3. BIOTRANSFORMACIÓN.....	12
1.2.2.4. ELIMINACIÓN	13
1.3. ANTIINFLAMATORIOS EN LA TERAPÉUTICA VETERINARIA Y NANOMEDICINA	14
1.4. VEHICULIZACIÓN DE LOS NANOMEDICAMENTOS	16
1.4.1. TARGETING PASIVO	17
1.4.2. TARGETING ACTIVO	17
1.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS NANOMEDICAMENTOS	18
1.5.1. TAMAÑO, FORMA Y CARGA ELÉCTRICA SUPERFICIAL	19
1.5.2. CARACTERÍSTICAS DE SUPERFICIE	20

1.6.	NANOMEDICAMENTOS Y CLASIFICACIÓN.....	20
1.6.1.	LIPOSOMAS.....	21
1.6.2.	NANOPARTÍCULAS.....	22
1.6.3.	CONJUGADOS POLIMÉRICOS.....	23
1.6.4.	MICELAS POLIMÉRICAS.....	23
1.6.5.	NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS.....	24
1.6.6.	NANOCÁPSULAS LIPÍDICAS.....	27
1.7.	BIOPOLÍMEROS COMO MATERIALES DE RECUBRIMIENTO DE NANOESTRUCTURAS.....	28
1.7.1.	QUITOSÁN.....	28
1.7.2.	ALGINATO.....	30
1.7.3.	MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE BIOPOLÍMEROS.....	32
1.7.4.	BIOADHESIÓN Y MUCOADHESIÓN DE BIOPOLÍMEROS.....	34
1.8.	MÉTODOS DE EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i>	39
1.8.1.	LÍNEAS CELULARES CACO-2 Y ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD.....	39
1.8.2.	ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD.....	42
II.	ESTADO DEL ARTE.....	45
III.	JUSTIFICACIÓN.....	50
IV.	OBJETIVOS.....	52
4.1.	OBJETIVO GENERAL.....	52
4.2.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	52
V.	HIPÓTESIS.....	54
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
6.1.	MATERIALES.....	55
6.2.	PREPARACIÓN DE NANOCÁPSULAS CON CUBIERTA POLIMÉRICA DE MANUCOL (NC-ALG).....	55
6.3.	PREPARACIÓN DE NANOCÁPSULAS CON CUBIERTA POLIMÉRICA DE QUITOSÁN (NC-Q).....	56

6.4.	OPTIMIZACIÓN DEL TIPO DE ACEITE.....	56
6.5.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	57
6.6.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE NC-ALG Y NC-Q.....	59
6.7.	OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE POLÍMERO.....	59
6.8.	EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN DE CURCUMINA Y pH DE LAS FORMULACIONES.....	60
6.9.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.....	61
6.10.	ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE CURCUMINA <i>IN VITRO</i>	62
6.10.1.	DISEÑO DEL ADAPTADOR DE DIALYSIS (“DIALYSIS ADAPTER”) PARA EL APARATO IV USP.....	62
6.10.2.	ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE CURCUMINA <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE NC-Q Y NC-ALG.....	63
6.11.	CULTIVO CELULAR.....	63
6.11.1.	MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS.....	63
6.11.2.	DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	65
6.11.3.	EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE NANOCÁPSULAS DE CURCUMINA.....	66
6.11.4.	DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD POR EL MÉTODO DE AZUL DE TRIPANO.....	67
6.11.5.	INFLUENCIA DE LA NANOCÁPSULAS DE CURCUMINA SOBRE LA PERMEABILIDAD.....	67
6.11.6.	MEDICIÓN DE LA RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL (TEER).....	69
6.11.7.	DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD APARENTE.....	70
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	72
7.1.	PREPARACIÓN DE NANOCÁPSULAS.....	72
7.2.	OPTIMIZACIÓN DEL TIPO DE ACEITE.....	73
7.3.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	75
7.4.	OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE POLÍMERO.....	82

7.5.	EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN DE CURCUMINA Y pH DE LAS FORMULACIONES	86
7.6.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LAS NC-Q Y NC-ALG EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	88
7.7.	ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE CURCUMINA <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE NC-Q Y NC-ALG	90
7.8.	EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE NANOCÁPSULAS DE CURCUMINA.....	95
7.9.	EFEECTO DE NC-Q, NC-ALG, TEOFILINA Y BD SOBRE LA RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL (TEER)	97
7.10.	DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD APARENTE.....	98
VIII.	CONCLUSIONES.....	101
IX.	REFERENCIAS.....	103
X.	ANEXO I.....	120
XI.	ANEXO II.....	122
XII.	ANEXO III.....	124

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Uso de los AINE's en medicina veterinaria para el tratamiento de diferentes patologías.	2
Tabla 2. Vía de administración de los AINE's empleados con mayor frecuencia en el ámbito veterinario.	3
Tabla 3. Principales propiedades fisicoquímicas de la curcumina.	8
Tabla 4. Comparación de los parámetros farmacocinéticos de tres sistemas diferentes de curcumina después de una administración oral en ratas.	11
Tabla 5. Distribución de curcumina en diferentes tejidos después de una administración intraperitoneal en ratones.	12
Tabla 6. Ensayos para evaluar la citotoxicidad <i>in vitro</i> en líneas celulares.	44
Tabla 7. Visión general de algunos de los sistemas de nanopartículas evaluados para la entrega de medicamentos y vacunas para uso veterinario. Cada uno de los nanosistemas fue evaluado en la especie de destino.	48
Tabla 8. Factores considerados en el diseño de superficie de respuesta para las formulaciones de nanocapsulas.	58
Tabla 9. Matriz experimental del diseño de Superficie de Respuesta compuesto reducido de Draperlyn (Rotable y Ortogonal) optimizado.	58
Tabla 10. Dilución de las muestras para la evaluación de toxicidad en células Caco-2.	67
Tabla 11. Dilución de las muestras para la evaluación de permeabilidad en células Caco-2.	68
Tabla 12. Efecto del tipo de aceite sobre el tamaño de partícula, PDI, potencial zeta y presencia de agregación.	73
Tabla 13. Resultados del diseño experimental.	76

Tabla 14. Efecto del tipo y concentración de polímero sobre el tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI), potencial Zeta y presencia de agregados en los nanosistemas.....	82
Tabla 15. Componentes y cantidad de éstos utilizados para la obtención de nanosistemas óptimos de NC-Q y NC-ALG.	86
Tabla 16. Características fisicoquímicas de los dos nanosistemas obtenidos. PDI: Índice de polidispersión, E.E.: Eficacia de encapsulación. Los valores están dados como la media \pm SD; n=3.	87
Tabla 17. Características fisicoquímicas de los nanosistemas durante los estudios de estabilidad en condiciones de almacenamiento (4°C). Los valores están dados como la media \pm SD; n=3.	89
Tabla 18. Criterios estadísticos utilizados para la selección del modelo en estudios de liberación <i>in vitro</i>	94
Tabla 19. Influencia de NC-Q, NC-ALG, FC, Teofilina (Control positivo) y BD (Control negativo) sobre la permeabilidad aparente (Papp) a través de la monocapa de células Caco-2 (media \pm SD, n=3).....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de medicamentos veterinarios por forma farmacéutica.....	4
Figura 2. Evolución del número de publicaciones al año relacionadas a los términos de búsqueda “Curcumina”. Fuente: Scienedirect®. Fecha de consulta: Abril de 2013.....	5
Figura 3. Estructura química de la Curcumina.	6
Figura 4. Propiedades Terapéuticas de la Curcumina.....	7
Figura 5. Ruta de degradación de la curcumina hasta la obtención de Vanilina, Cetona y Ácido Felúrico.....	10
Figura 6. Principales metabolitos de la curcumina encontrados en ratones.....	13
Figura 7. Representación esquemática de dos liposomas. La forma más sencilla construida de moléculas anfifílicas a la izquierda y a la derecha una estructura liposomal modificada en su estructura por PEG.....	21
Figura 8. Esquema de conjugados poliméricos. Se muestran dos tipos de conjugados poliméricos: a) Conjugado polímero-proteína, el ingrediente activo terapéutico es una proteína, pudiendo ser un enzima o un anticuerpo. b) Conjugado polímero-fármaco, el ingrediente activo es una molécula terapéutica.....	23
Figura 9. Esquema de una micela polimérica mostrando los componentes que la constituyen.	24
Figura 10. Representación esquemática de la estructura de nanocápsulas de núcleo oleoso y acuoso.....	25
Figura 11. Estructura esquemática representativa de una cadena de quitosán conteniendo residuos de monosacáridos 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucopiranososa (residuos A) y 2-amino- 2-deoxi-β-D-glucopiranososa (residuos D), ambos unidos por enlaces " (1→ 4).	29
Figura 12. Estructura química de una cadena de alginato.....	31

Figura 13. Representación esquemática de tres distintos tipos de nanopartículas a base de quitosán y alginato: a) Nanomatriz pre-gelificada de alginato por reticulación ionotrópica con cloruro cálcico recubierta con quitosán; b) Nanomatriz de quitosán preparada por coacervación con sulfato de sodio recubierta con alginato; c) Nanomatriz híbrida co-gelificada por gelificación ionotrópica de quitosán con tripolifosfato pentasódico (TPP) y complejación concomitante del alginato.	32
Figura 14. Clasificación de la capacidad adhesiva de polímeros.....	37
Figura 15. Esquema de la técnica de estudio del transporte transepitelial de <i>compuesto in vitro</i> en monocapas Caco-2. Las flechas indican la dirección de la permeabilidad.....	40
Figura 16. Esquema de la técnica de citotoxicidad de compuestos <i>in vitro</i> en monocapas Caco-2.	43
Figura 17. Accesorios para llevar a cabo los estudios de liberación de fármacos utilizando el aparato IV USP - Dialysis Adapter. A: esquema del sistema de diálisis y B: Montaje del sistema de diálisis en el aparato IV USP.....	62
Figura 18. Descripción del mantenimiento de las células Caco-2 hasta el cultivo en placas para realizar estudios de toxicidad y permeabilidad.	65
Figura 19. Influencia de los factores de estudio sobre el tamaño de partícula. *Factores estadísticamente significantes ($p < 0.05$).	77
Figura 20. Influencia de los factores de estudio sobre el PDI. *Factores estadísticamente significantes ($p < 0.05$).	78
Figura 21. Gráfico de superficie de respuesta para Tamaño de Partícula (nm) correspondiente a los factores Cremophor [®] EL – Vitamina E obtenido con el modelo simplificado.....	79
Figura 22. Gráfico de superficie de respuesta para PDI correspondiente a los factores Cremophor [®] EL – Poloxamer 188 obtenido con el modelo simplificado.....	80
Figura 23. Influencia de los factores de estudio sobre el Potencial Zeta. *Factores estadísticamente significantes ($p < 0.05$).	81

- Figura 24.** Gráfico de superficie de respuesta para el Potencial Zeta (mV) correspondiente a los factores Cremophor[®] EL – Poloxamer 188 obtenido con el modelo simplificado..... 81
- Figura 25.** Imágenes TEM de los sistemas nanocapsulares desarrollados: NC-Q y NC-ALG cargadas con curcumina. Izquierda: Nanocápsulas con cubierta polimérica de Quitosán (NC-Q); Derecha: Nanocápsulas con cubierta polimérica de Alginato (NC-ALG). 85
- Figura 26.** Perfiles de liberación in vitro de curcumina a partir de NC-Q, NC-ALG y F-C en pH= 1.2 a 37°C (media ± SD, n=3)..... 92
- Figura 27.** Citotoxicidad de NC-Q y NC-ALG (Cargadas con curcumina), B-NC-Q y B-NC-ALG (No cargadas), DMEM (Control negativo) y Etanol 70% (Control positivo) (media ± SD, n=3)..... 96
- Figura 28.** Efecto de NC-Q, NC-ALG (dosis por unidad de superficie de 44.6 µg/cm² de polímero en ambos casos), FC, Teofilina (Control positivo), BD (Control negativo) y DMEM (Control) sobre los valores de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en función del tiempo (media ± SD, n=3). 98

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
AIC	Criterio de Información de Akaike
AINE's	Antiinflamatorios no esteroideos
ALG	Alginato
BD	Azul de dextrano
B-NC-ALG	Nanocápsulas de Alginato No cargadas con Curcumina
B-NC-Q	Nanocápsulas de Quitosán No cargadas con Curcumina
C max	Concentración máxima
Cl	Depuración
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F-C	Curcumina suspendida en medio de cultivo celular
GI	Gastrointestinal
GSH	Glutación
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos
LDH	Lactato deshidrogenasa
MSC	Criterio de selección de modelo
NC-ALG	Nanocápsulas de Alginato
NC-Q	Nanocápsulas de Quitosán
PDI	Índice de Polidispersión
PEG	Poli etilenglicol
PLGA	Ácido Polilactico Glicolico
pZ	Potencial Zeta
RP	Fase reversa
RPM	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
T ½	Tiempo de vida media
T max	Tiempo máximo
TBARS	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
TEER	Resistencia Electrica Transepitelial
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión
Vd	Volumen de distribución

I. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica, además de desarrollar y producir formulaciones farmacéuticas para uso humano, también se ocupa de producir especialidades farmacéuticas de uso veterinario, que cubran las necesidades sanitarias de los animales.

En los últimos años, la industria farmacéutica ha mostrado un interés creciente por los medicamentos de uso veterinario, como consecuencia de la necesidad de disponer de medios terapéuticos a la altura de los niveles actuales de desarrollo científico y técnico, para tratar de forma eficaz cualquier problema sanitario de los animales. Unido a este interés creciente por los medicamentos de uso animal, también se ha producido el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas que facilitan la administración de los medicamentos veterinarios¹.

En la terapéutica veterinaria, las formas farmacéuticas desempeñan una función esencial durante la administración. Las características fisiológicas y anatómicas de cada especie animal resultan determinantes a la hora de establecer la dosis y la forma farmacéutica más conveniente.

Así pues, las formas farmacéuticas desempeñan importantes funciones tecnológicas puesto que le ayudan a los fármacos a mantener su estabilidad (tanto física como química) y le otorga características relacionadas con los procesos de absorción y biodisponibilidad².

En cuanto a los factores que se deben de tomar en cuenta a la hora de elaborar una forma farmacéutica, estos se relacionan principalmente con las características fisicoquímicas de los principios activos como lo es la solubilidad y la estabilidad.

¹ De Pedro, J. (2005). "Formas farmacéuticas en veterinaria (parte 1)" *Farmacia Profesional* **19**(2): 74-77.

² Del Rio, L. A. (2002). "Estudio de preformulación para el desarrollo de comprimidos de indometacina como sustancia policristalina." *Ars Pharmaceutica* **43**(1-2): 147-171.

1.1. AINE's Y MEDICINA ALTERNATIVA

En el mercado Farmacéutico Mexicano existe una escasa línea de medicamentos veterinarios destinados para el tratamiento del dolor. El tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) son de los más utilizados debido a que tienen función antiinflamatoria, analgésica y antipirética³. En la **Tabla 1** se muestra el uso de algunos AINE's utilizados en la clínica veterinaria.

Tabla 1. Uso de los AINE's en medicina veterinaria para el tratamiento de diferentes patologías.

USO CLÍNICO DE LOS AINE'S EN MEDICINA VETERINARIA	
Cirugías (Todo tipo)	Periodontitis
Ortopedia	Artritis (especies de talla mayor)
Displasia de cadera	Dermatitis (parásitos, bacterias)
Alergias (pulgas, ácaros)	Fracturas

No obstante, la mayoría de éstos presentan problema de reacciones adversas, debido a que se utilizan AINE's clásicos no selectivos. Los efectos adversos más comunes que se presentan a dosis terapéuticas es a nivel gastrointestinal, pueden producir trastornos como náuseas, vómitos y dispepsia. También pueden producir irritación de la mucosa gástrica como erosión, ulceración, hematemesis y melena.

La mayoría de los AINE's usados en veterinaria se encuentran formulados principalmente en: tabletas, cápsulas e inyectables (**Tabla 2**)^{4 5 6}.

³ Guyton, A. C. and J. E. Hall (1997). Tratado de Fisiología Médica. Estados Unidos de América

⁴ Aigé, V. and C. Ignacio (2001). El dolor en los pequeños animales: bases neuroanatómicas, reconocimiento y tratamiento. Bases neuroatómicas del dolor. C. D. Vet. España **9**: 63-70.

⁵ Papich, M. G. (2008). "An Update on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Small Animals." Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice **38**(6): 1243-1266.

⁶ PLM (2011). Prontuario de Especialidades Veterinarias.

Tabla 2. Vía de administración de los AINE's empleados con mayor frecuencia en el ámbito veterinario^{4 5 6}.

PRINCIPIO ACTIVO	FORMAS DE DOSIFICACIÓN
Carprofeno	Tabletas, Sol. Inyectables
Ketoprofeno	Tabletas, Sol. Inyectables
Ibuprofeno	Tabletas
Etodolaco	Tabletas
Meloxicam	Tabletas, Sol. Inyectables, Suspensiones y soluciones
Piroxicam	Sol. Inyectables, Gel
Firocoxib	Tabletas
Mevacoxib	Tabletas
Flunixin de meglumina	Sol. Inyectables, Gel oral
Metamizol	Tabletas, Sol. Inyectables
Fenilbutazona	Polvo oral, Sol. Inyectables

Sin embargo, es importante y necesario la incorporación de más formas farmacéuticas como: soluciones, suspensiones y emulsiones, ya que presentan ventajas sobre otras. Estas forma farmacéuticas de uso veterinario permiten un ajuste cómodo y preciso de la dosis, de acuerdo con las necesidades de la especie y del peso del animal. En la **Figura 1** se muestra el porcentaje de medicamentos veterinarios por forma farmacéutica y se observa que la predominancia de las soluciones es de casi el 50%, seguidas de los polvos y granulados con el 15%, los comprimidos, emulsiones y suspensiones con una participación del 21% y las otras formas farmacéuticas en conjunto representaron el 18% del total⁷.

⁷ IMPI. (2010). "Gaceta de Marcas Registradas, Avisos y Nombres Comerciales y Denominaciones de Origen.", from <http://siga.impi.gob.mx/>.

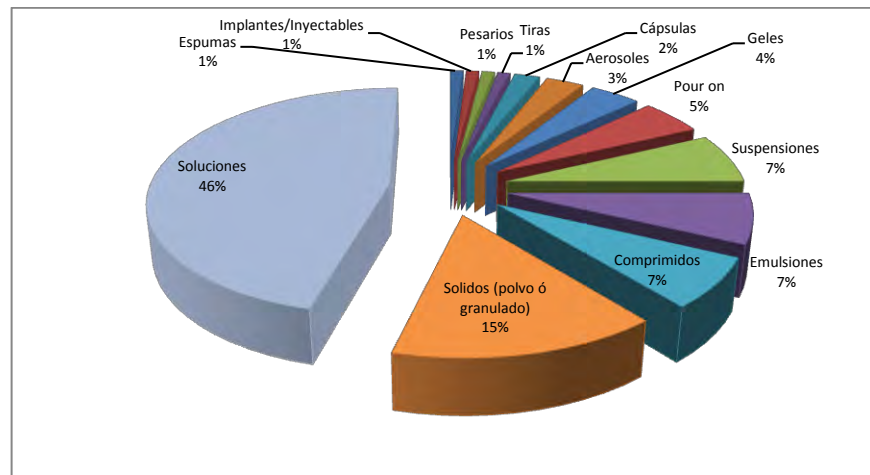


Figura 1. Porcentaje de medicamentos veterinarios por forma farmacéutica⁷.

Hoy en día, el tratamiento de las enfermedades más comunes ha sufrido una gran transformación. La importancia en la actualidad de la Medicina Natural se evidencia por el alto consumo de los productos recomendados por esta alternativa para el manejo de las enfermedades⁸.

Diversas son las plantas y remedios utilizados para el tratamiento de enfermedades y padecimientos. Sin embargo, se ha centrado la atención sobre una planta en particular en la que tan solo en los últimos 10 años se ha observado un crecimiento exponencial en el número de publicaciones, ésta planta es la *Cúrcuma Longa* (**Figura 2**) y actualmente es considerada por la ciencia como planta medicinal debido a su eficientes y efectivas propiedades antiinflamatorias⁹.

⁸ Alonso-Osorio, M. J. (2010). Plantas medicinales: Del uso tradicional al criterio científico R. A. d. F. d. Cataluña. Barcelona, España

⁹ Jurenka, J. S. (2009). "Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research." *Altern Med Rev* 14(2): 141-153.

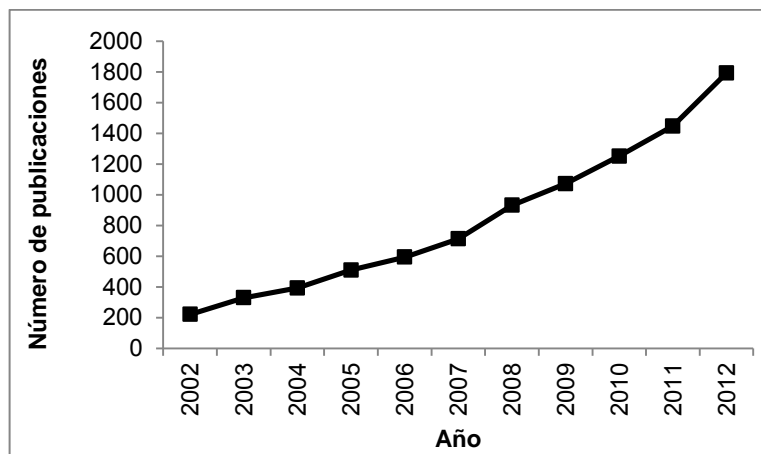


Figura 2. Evolución del número de publicaciones al año relacionadas a los términos de búsqueda “Curcumina”. Fuente: Scienedirect®. Fecha de consulta: Abril de 2013.

1.2. CÚRCUMA LONGA L.: GENERALIDADES

La *Cúrcuma longa* L., es una planta de origen asiático cuyo rizoma, de color naranja, es usado comúnmente como una especia en la cultura asiática, donde está considerada como una planta mágica dadas sus características organolépticas y sus propiedades terapéuticas y protectoras, sobre todo a nivel hepático y cutáneo, todas ellas asociadas a la curcumina, molécula presente en el extracto de la planta¹⁰.

La curcumina (diferuloilmetano) (**Figura 3**) es la sustancia causante del color amarillo característico de los rizomas de esta planta, y es uno de los ingredientes activos responsable de su actividad biológica. La síntesis de este compuesto es conocida y su estructura fue determinada en 1910.

¹⁰ Anton, N., P. Gayet, J.-P. Benoit and P. Saulnier (2007). "Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion." *International Journal of Pharmaceutics* **344**(1–2): 44-52.

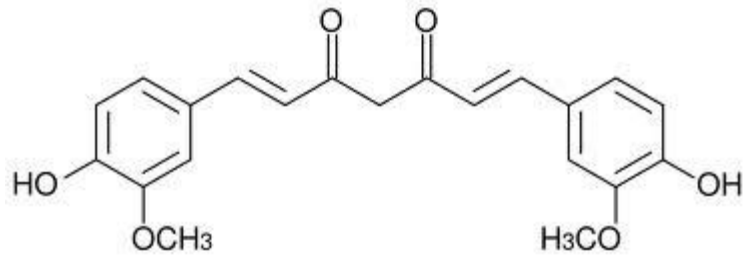


Figura 3. Estructura química de la Curcumina.

Este agente ha sido usado durante siglos por diferentes culturas asiáticas. Por ejemplo, prácticas medicinales de la India han usado la curcumina para tratar anorexia, tos, reumatismo, y otras enfermedades. En la medicina hindú, los hombres todavía utilizan la curcumina para tratar esguinces e inflamación. La medicina tradicional china usa el mismo compuesto para tratar enfermedades que van acompañadas de dolor abdominal¹¹.

La medicina occidental ha reconocido recientemente la capacidad anti-inflamatoria, antioxidante, antibacteriana, anti-veneno, anti-VIH, así como la habilidad de combatir a la enfermedad de Alzheimer a partir de la curcumina¹². En la **Figura 4** se presentan las principales propiedades terapéuticas de la curcumina.

¹¹ Ammon, H. P. and M. A. Wahl (1991). "Pharmacology of Curcuma longa." *Planta Med* **57**(1): 1-7.

¹² Duvoix, A., R. Blasius, S. Delhalle, M. Schnekenburger, F. Morceau, E. Henry, M. Dicato and M. Diederich (2005). "Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin." *Cancer Letters* **223**(2): 181-190.



Figura 4. Propiedades Terapéuticas de la Curcumina.

Dentro de las propiedades terapéuticas de la curcumina más estudiadas se encuentra su actividad antiinflamatoria la cual se ha demostrado en procesos de inflamación aguda, subaguda y crónica en ratones y ratas, aunque no tiene fuertes efectos analgésicos ni antipiréticos, tampoco produce una significativa irritación gástrica, ni tiene efectos en el sistema nervioso central¹³.

El mecanismo de acción de la curcumina se ha explicado mediante la modulación del metabolismo del ácido araquidónico, inhibiendo la actividad de la cicloxigenasa y

¹³ Sharma, R. A., A. J. Gescher and W. P. Steward (2005). "Curcumin: the story so far." *Eur J Cancer* **41**(13): 1955-1968.

lipooxigenasa, afectando la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos evitando el desarrollo de procesos inflamatorios y agregación plaquetaria¹⁴.

La reducción o la no presencia de los efectos adversos que se presentan a dosis terapéuticas en comparación con los AINE's no selectivos se debe a que la curcumina inhibe selectivamente la actividad de la enzima ciclooxygenasa-2 (COX-2) y no inhibe la actividad COX-1¹⁵.

1.2.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA CURCUMINA

En la **Tabla 3** se presentan las principales propiedades fisicoquímicas de la curcumina que se deben de tomar en cuenta para el desarrollo de una formulación y en la **Figura 5** se muestra la ruta de degradación de la curcumina.

Tabla 3. Principales propiedades fisicoquímicas de la curcumina.

PROPIEDAD	CARACTERÍSTICA
Aspecto	Polvo cristalino, color amarillo-naranja de tonalidad intensa e inodoro.
Solubilidad	Soluble en aceites. Completamente soluble en dimetilsulfóxido, acetona, etanol y cloroformo. Prácticamente insoluble en agua a pH ácido o neutro y soluble en medio alcalino.
Punto de fusión	Aproximadamente 183 °C.
Espectro UV-Visible	La longitud de onda de máxima absorción en soluciones acuosas o solventes orgánicos ocurre entre 420 nm- 430 nm.

¹⁴ Began, G., E. Sudharshan and A. G. Appu Rao (1998). "Inhibition of lipooxygenase 1 by phosphatidylcholine micelles-bound curcumin." *Lipids* **33**(12): 1223-1228.

¹⁵ Lanza, F. L., M. F. Rack, T. J. Simon, H. Quan, J. A. Bolognese, M. E. Hoover, F. R. Wilson and S. E. Harper (1999). "Specific inhibition of cyclooxygenase-2 with MK-0966 is associated with less gastroduodenal damage than either aspirin or ibuprofen." *Aliment Pharmacol Ther* **13**(6): 761-767.

Tabla 3. Continuación.

PROPIEDAD	CARACTERÍSTICA
Comportamiento ácido-base	<p>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 la 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</p>
Estabilidad	<p>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.</p>
Productos de degradación	<p>Los productos iniciales de la degradación en solución a pH alcalinos se forman en alrededor de 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 la curcumina 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 5).</p>

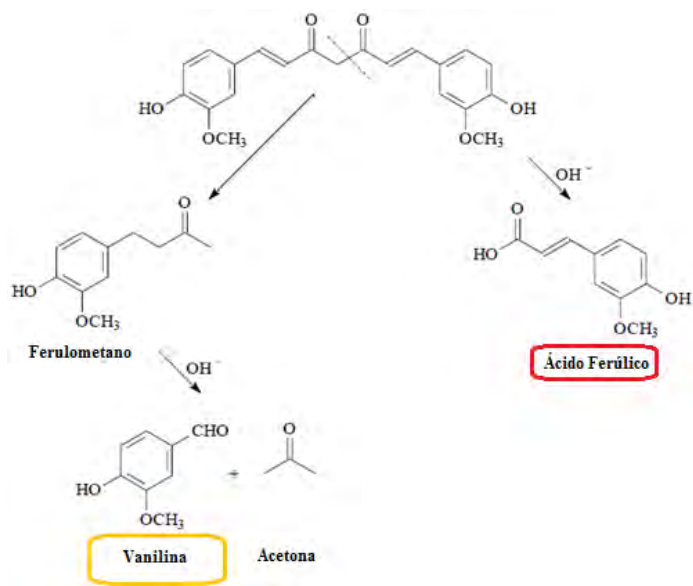


Figura 5. Ruta de degradación de la curcumina hasta la obtención de Vanilina, Cetona y Ácido Felúrico.

1.2.2. FARMACOCINÉTICA DE LA CURCUMINA

1.2.2.1. ABSORCIÓN

La elevada lipofilia de la curcumina le permite una absorción gastrointestinal por difusión pasiva. Se ha determinado, usando curcumina radioactiva en ratas, que aproximadamente el 35% de dosis orales entre 2.5 y 1000 mg/kg, se excreta por heces en 48 h, absorbiéndose el 65%. Con la administración intraperitoneal de curcumina se obtienen resultados similares, lo que indica que se absorbe fácilmente desde la cavidad peritoneal¹⁶. En la **Tabla 4** se

¹⁶ Mesa, M. D., M. C. Ramírez-Tortosa, C. M. Aguilera, A. Ramírez-Bosca and A. Gil (2000). "Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides." *Ars Pharmaceutica* **41**(3).

muestran algunos parámetros farmacocinéticos de la curcumina después de una administración oral en ratas¹⁷.

Tabla 4. Comparación de los parámetros farmacocinéticos de tres sistemas diferentes de curcumina después de una administración oral en ratas¹⁷.

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS	TIPO DE SISTEMA		
	Suspensión acuosa de Curcumina	Nanopartículas de Curcumina (PLGA)	Nanopartículas de Curcumina (PLGA-PEG)
Dosis (mg/kg)	50	50	50
ABC_{0→t} (h ng /mL)	8.695 ± 1.872	134.251 ± 3.446	447.80 ± 64.028
ABC_{0→Inf} (h ng /mL)	8.762 ± 1.862	137.162 ± 3.694	485.941 ± 54.663
C_{max} (ng/mL)	4.066 ± 0.564	11.783 ± 0.454	29.778 ± 4.632
T_{max} (h)	0.5	2	3
T_½ (h)	1.109 ± 0.124	3.929 ± 0.451	5.979 ± 1.126
Vd (L/Kg)	9432.536 ± 2511.617	2073.664 ± 352.612	900.544 ± 225.772
Cl (L/h Kg)	5859.700 ± 1399.927	365.191 ± 37.351	103.679 ± 10.903

1.2.2.2. DISTRIBUCIÓN

A pesar de la pobre disponibilidad de la curcumina en suspensión acuosa, una vez que se ha absorbido, ésta se distribuye y acumula en diferentes proporciones en los compartimientos corporales. Tras una administración parenteral se distribuye de la siguiente manera¹⁸ (ver **Tabla 5**).

¹⁷ Khalil, N. M., T. C. F. d. Nascimento, D. M. Casa, L. F. Dalmolin, A. C. d. Mattos, I. Hoss, M. A. Romano and R. M. Mainardes (2013). "Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **101**(0): 353-360.

¹⁸ Pan, M.-H., T.-M. Huang and J.-K. Lin (1999). "Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice." *Drug Metab Dispos* **27**(4): 486-494.

Tabla 5. Distribución de curcumina en diferentes tejidos después de una administración intraperitoneal en ratones¹⁸.

MUESTRA O TEJIDO	CANTIDAD DE CURCUMINA POR GRAMO DE ÓRGANO (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

1.2.2.3. BIOTRANSFORMACIÓN

Tras la administración de curcumina, ésta se biotransforma primero a dihidrocurcumina y tetrahydrocurcumina, y estos compuestos son convertidos, posteriormente, a conjugados monoglucurónidos, de forma que los principales metabolitos de la curcumina *in vivo* son los glucurónidos de curcumina, de dihidrocurcumina y tetrahydrocurcumina. Se han identificado los metabolitos biliares de la curcumina por espectrometría de masas, después de recolectarlos de la bilis de ratas que recibieron 50 mg/kg de curcumina intravenosa; entre el 50-60% de la dosis administrada fue excretada por la bilis en 5 h. Los principales metabolitos biliares fueron glucurónidos de la tetrahydrocurcumina y de la hexahydrocurcumina (52% y 42% de los metabolitos biliares respectivamente); un componente minoritario fue el ácido dihidroferúlico (**Figura 5 y 6**). Esto demuestra que la mayor fracción de la curcumina se reduce de forma endógena, y después es glucuronizado por la UDP-glucuronil transferasa¹⁹.

¹⁹ Ibid.

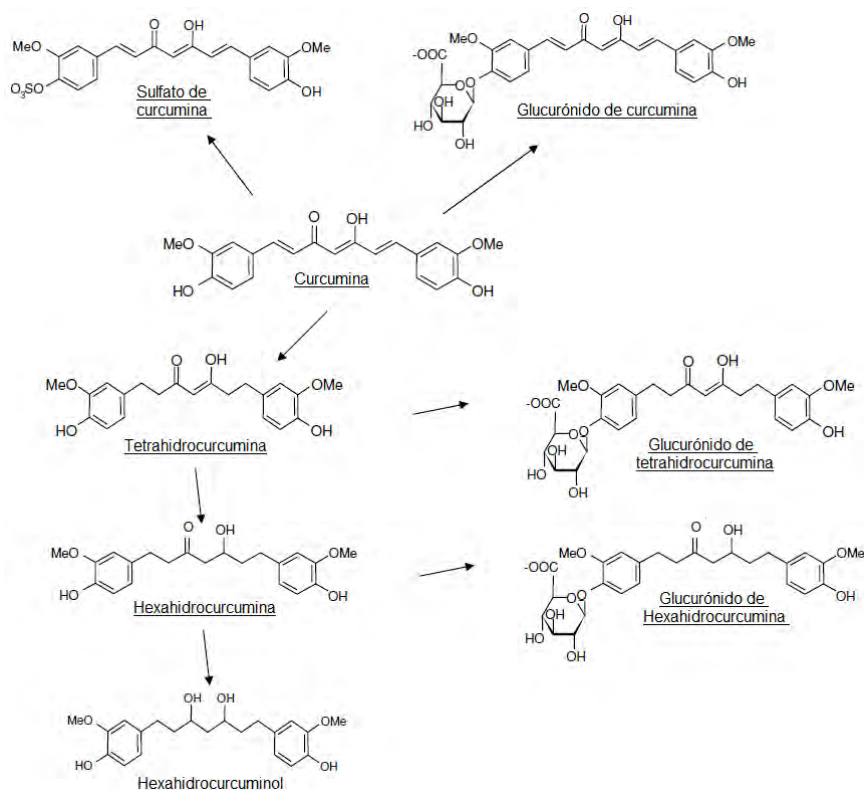


Figura 6. Principales metabolitos de la curcumina encontrados en ratones.

1.2.2.4. ELIMINACIÓN

La mayor cantidad de curcumina y/o metabolitos de biotransformación, 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 metabolitos²⁰.

²⁰ Sharma, R. A., W. P. Steward and A. J. Gescher (2007). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin." *Adv Exp Med Biol* **595**: 453-470.

Tras una dosis oral de curcumina marcada radiactivamente, el $6.3 \pm 2.5\%$ del fármaco es excretado por la orina tras 72 h, mientras que con la administración intraperitoneal aumenta aproximadamente el doble ($11.2 \pm 0.7\%$)²¹.

1.3. ANTIINFLAMATORIOS EN LA TERAPÉUTICA VETERINARIA Y NANOMEDICINA

En la actualidad, existe una gran necesidad tanto de la industria farmacéutica, la medicina y la tecnología aplicada por mejorar los tratamientos farmacológicos. Fundamentando sus esfuerzos principalmente en la innovación de formulaciones farmacéuticas, la modificación de moléculas para reducir la toxicidad, los costos, y muchos otros. Esta necesidad se ha visto reflejada en la obtención de formulaciones de mayor eficiencia, dispositivos biomédicos para administración de fármacos, formulaciones de liberación transdérmica, entre otras. Sin embargo, estos nuevos sistemas presentan claras desventajas, como por ejemplo, el ingreso al tejido cerebral pues la barrera hematoencefálica formada por células gliales resulta impenetrable para los medicamentos convencionales, lo que hace que la liberación de fármacos a ese nivel sea prácticamente imposible²².

La nanomedicina emerge, en este sentido, como una herramienta por demás interesante para solventar la mayoría de los problemas a los que los fármacos difíciles de formular, o los de recién síntesis, se enfrentan²³. Esta rama de la nanotecnología engloba diversas aplicaciones de la biotecnología, las ingenierías, la medicina y la tecnología farmacéutica

²¹ Holder, G. M., J. L. Plummer and A. J. Ryan (1978). "The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat." *Xenobiotica* **8**(12): 761-768.

²² Ramírez-Cabrera, M. A. (2010). Evaluación de la cinética de distribución y toxicidad de las nanopartículas de plata. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Nuevo León

²³ Shrivastava, S., T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao and D. Dash (2007). "Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles." *Nanotechnology* **18**(22).

en el tratamiento, prevención y diagnóstico de múltiples enfermedades utilizando materiales y dispositivos a escala nanométrica, es decir, de entre 1 y 1000 nm (1×10^{-9} m)²⁴.

La diferencia entre la nanomedicina y la tecnología farmacéutica tradicional radica en que la nanomedicina pretende obtener sistemas de liberación, dispositivos y medicamentos mediante la manipulación de los materiales a nivel nanométrico, permitiendo que todo un arsenal de fármacos de escasa estabilidad, difícil administración, elevada toxicidad o con características que requieran ser específicas para un individuo, puedan ser accesibles como medicamentos²⁵. Así, un nanomedicamento por su tamaño y características fisicoquímicas tiene la facilidad de llegar al órgano blanco es decir a células específicas, logrando una respuesta terapéutica más eficiente que los medicamentos tradicionales²⁶.

Recientemente, la nanotecnología en la farmacología ha revolucionado la administración de fármacos, permitiendo la aparición de nuevos tratamientos con mayor especificidad²⁷. Ésta ciencia, en el ámbito del desarrollo farmacéutico ha dado lugar a importantes logros que han contribuido a la mejora de la eficacia y la seguridad de fármacos utilizados para el tratamiento de múltiples enfermedades, dentro de las que se encuentra aliviar el dolor (AINE's).

Algunos de los inconvenientes de estos fármacos antiinflamatorios (AINE's) son, su toxicidad local en contacto con los tejidos y su pobre solubilidad. Estos fármacos inducen úlceras en la mucosa gastrointestinal cuando son administrados vía oral y pueden inducir daño en el epitelio corneo o en el tejido muscular tras su aplicación. La toxicidad local

²⁴ Hervella, P., V. Lozano, M. Garcia-Fuentes and M. J. Alonso (2008). "Nanomedicine: New Challenges and Opportunities in Cancer Therapy." *Journal of Biomedical Nanotechnology* 4(3): 276-292.

²⁵ Vila-Jato, J. L. (2009). *Nanotecnología farmacéutica: realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*, Real Academia Nacional de Farmacia.

²⁶ Medina, C., M. J. Santos-Martinez, A. Radomski, O. I. Corrigan and M. W. Radomski (2007). "Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance." *British Journal of Pharmacology* 150(5): 552-558.

²⁷ Goycoolea, F. M., Remuñán-López, C., Alonso, J. M. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. *Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. R. A. N. d. F. Instituto de España. Madrid, España: 409.

puede reducirse de forma considerable mediante la encapsulación de estos fármacos en nanocápsulas o liposomas, manteniendo intacta la actividad del fármaco²⁸, pero también permiten aumentar de forma exponencial la superficie de intercambio entre la molécula activa y el medio biológico que lo rodea, favoreciendo la disolución del fármaco, así como mejorar su llegada a diferentes lugares del organismo²⁹.

Durante una administración oral, las formulaciones de nanocápsulas exhiben perfiles farmacocinéticos similares a aquellos obtenidos con el fármaco libre, minimizando los efectos tóxicos. Este efecto puede ser explicado por la mejor repartición de las nanopartículas a lo largo del tracto gastrointestinal, con lo que las concentraciones locales serían mucho más bajas y se reducirían los efectos ulcerativos³⁰.

1.4. VEHICULIZACIÓN DE LOS NANOMEDICAMENTOS

La nanomedicina en los últimos años ha aportado múltiples herramientas a la hora de solucionar los problemas descritos con anterioridad. Así, distintas nanoestructuras han mostrado su capacidad para alargar la permanencia del fármaco en circulación, vehicularlo hacia lugares específicos mediante diferentes técnicas de *targeting*³¹, o bien mejorar la solubilización de los fármacos hidrofóbicos, eliminando el uso de solventes y tensoactivos tóxicos.

²⁸ Bernardi, A., R. L. Frozza, E. Jäger, F. Figueiró, L. Bavaresco, C. Salbego, A. R. Pohlmann, S. Guterres and A. M. O. Battastini (2008). "Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An *in vitro* study." European Journal of Pharmacology **586**(1-3): 24-34.

²⁹ Jiang, B., L. Hu, C. Gao and J. Shen (2005). "Ibuprofen-loaded nanoparticles prepared by a co-precipitation method and their release properties." International Journal of Pharmaceutics **304**(1-2): 220-230.

³⁰ Guterres, S., H. Fessi, G. Barratt, F. Puisieux and J.-P. Devissaguet (1995). "Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Containing Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Gastrointestinal Tolerance Following Intravenous and Oral Administration." Pharmaceutical Research **12**(10): 1545-1547.

³¹ Wang, M. and M. Thanou (2010). "Targeting nanoparticles to cancer." Pharmacological Research **62**(2): 90-99.

Se conoce como *targeting*, o vehiculización selectiva, a la propiedad que presentan diferentes nanosistemas de conducir las moléculas que llevan asociadas, a través del organismo hasta un tejido específico denominado tejido diana. La nanomedicina contempla para conseguir este fin, dos estrategias, conocidas como *targeting pasivo* y *targeting activo*³².

1.4.1. TARGETING PASIVO

El *targeting* pasivo es probablemente en la actualidad la estrategia de vehiculización más común en el desarrollo de nuevos nanomedicamentos. Dicha estrategia se basa en dos aspectos fundamentales y complementarios como lo son: el tamaño del sistema al que el fármaco se encuentra asociado y la capacidad de dichos sistemas de circular durante tiempos prolongados tras su administración³³.

1.4.2. TARGETING ACTIVO

En el caso del *targeting activo*, este hace referencia a la orientación activa del nanomedicamento, y no solo una simple acumulación en los tejidos para el cual fue diseñado el nanomedicamento. Ésta especificidad se ha conseguido a través de procesos de reconocimiento celular aprovechado la expresión de varios tipos de receptores en la superficie de las células diana³⁴.

³² Danhier, F., O. Feron and V. Préat (2010). "To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery." *Journal of Controlled Release* **148**(2): 135-146.

³³ Rivera, G. R. (2012). Nuevos Transportadores de Fármacos: Nanocápsulas de Poliarginina y Caseína. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela.

³⁴ Vila-Jato, J. L. (2009). Nanotecnología farmacéutica: realidades y posibilidades farmacoterapéuticas, Real Academia Nacional de Farmacia.

Varias son las técnicas empleadas en el desarrollo de nanomedicamentos dotados de una orientación específica, todas ellas relacionadas específicamente con características bioquímicas y fisiológicas particulares del sitio diana y con la expresión de receptores. Todas estas técnicas se han basado en la modificación de la superficie de los nanosistemas con diferentes tipos de moléculas o ligandos que van desde moléculas sencillas de bajo peso molecular a las más complejas macromoléculas diseñadas específicamente³⁵.

Actualmente, el uso de anticuerpos monoclonales emerge como una de las técnicas con más futuro en el desarrollo de nanotransportadores con orientación activa. El uso de este tipo de sistemas permite aumentar la especificidad de los tratamientos a nivel celular³⁶.

1.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS NANOMEDICAMENTOS

Para que los dos tipos de orientación selectiva puedan tener lugar, los nanomedicamentos deben de cumplir ciertas características físico-químicas que les permita alcanzar su objetivo (*tejido diana*) una vez que se encuentran circulando por el organismo.

La capacidad de medir y caracterizar las nanoestructuras, así como de determinar su forma tamaño y propiedades físicas a escala nanométrica es de vital importancia. Estas características pueden determinar la distribución *in vivo*, el destino biológico, la toxicidad y la capacidad de direccionamiento, *targeting*, así como la liberación del fármaco y la estabilidad de los nanomedicamentos³⁷.

³⁵ Wang, M. and M. Thanou (2010). "Targeting nanoparticles to cancer." Pharmacological Research **62**(2): 90-99.

³⁶ Schliemann, C. and D. Neri (2007). "Antibody-based targeting of the tumor vasculature." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **1776**(2): 175-192.

³⁷ Mohanraj, V. J. and Y. Chen (2006). "Nanoparticles. A Review." Journal of Pharmaceutical Research **5**(1): 561-573.

A continuación se detallan algunas de las características necesarias así como, algunas estrategias utilizadas para conseguir que los nanosistemas alcancen el tejido diana.

1.5.1. TAMAÑO, FORMA Y CARGA ELÉCTRICA SUPERFICIAL

Las características fisicoquímicas de los nanotransportadores condicionan irremediablemente la forma en que estos interactúan con el medio biológico y el organismo. Dichas características determinan la forma en que se producirá su eliminación, el tiempo que permanecerá en circulación, los lugares en los que se acumularán y su capacidad para alcanzar el tejido diana. Es sabido, por ejemplo que, para que el tipo de transporte de los nanosistemas sea paracelular, las nanoestructuras deben de presentar un tamaño de partícula inferior a los 200 nm, sin embargo, por otro lado, para evitar la filtración renal, las nanoestructuras deben de presentar un tamaño superior a los 10 nm, y más específicamente, para evitar la captura hepática deberá de presentar un tamaño superior a los 100 nm³⁸.

Por otro lado, la carga eléctrica superficial de las nanopartículas juega también un rol fundamental a la hora de conseguir nanotransportadores de larga permanencia en circulación tras su administración. Dicha carga debe de ser preferentemente neutra o ligeramente aniónica para evitar la interacción con las opsoninas y, en general con las células sanguíneas³⁹.

Finalmente, la forma de los nanotransportadores ha sido un parámetro geométrico que se ha descuidado durante mucho tiempo en el diseño de los nanosistemas. En este sentido, se ha demostrado que algunas nanopartículas con formas no esféricas y más bien alargadas u

³⁸ Danhier, F., O. Feron and V. Pr at (2010). "To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery." *Journal of Controlled Release* **148**(2): 135-146.

³⁹ Owens III, D. E. and N. A. Peppas (2006). "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles." *International Journal of Pharmaceutics* **307**(1): 93-102.

ovoides, han demostrado poseer mayor capacidad de carga de fármaco y lograr mejoras en la biodistribución, tiempo de circulación y acumulación en ciertos tejidos, al ser comparadas con las esféricas⁴⁰.

1.5.2. CARACTERÍSTICAS DE SUPERFICIE

La composición química y la hidrofília de la superficie de los nanomedicamentos son otros dos factores de gran importancia a la hora de evitar el proceso de eliminación por el Sistema Fagocítico Mononuclear (Mononuclear Phagocytic System, MPS). Así, se sabe que las partículas con superficie hidrofílica son generalmente “invisibles” para las células del MPS por lo que presentan un mayor tiempo de circulación, lo que aumenta las probabilidades de que accedan al sitio diana⁴¹.

Se han utilizado diversas estrategias para conseguir nanovehículos de larga permanencia en sangre, con el objetivo de favorecer la acumulación del fármaco en el tejido diana. Las estrategias más sencillas y eficaces se basan en la modificación de su superficie con diferentes materiales, con la intención de dotarlos de una cubierta tipo “*stealth*” o “*camuflaje*” a los sistemas, evitados que sean capturados por MPS.

1.6. NANOMEDICAMENTOS Y CLASIFICACIÓN

Dentro de la nanomedicina podemos encontrar un gran número de plataformas cuyo objetivo es que el fármaco alcance de la manera más eficaz el sitio diana, tales como las

⁴⁰ Venkataraman, S., J. L. Hedrick, Z. Y. Ong, C. Yang, P. L. R. Ee, P. T. Hammond and Y. Y. Yang (2011). "The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**(14–15): 1228-1246.

⁴¹ Lollo, G. (2012). Nanocápsulas de poliaminoácidos para la liberación selectiva de fármacos antitumorales. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela

nanopartículas, nanocápsulas, liposomas, micelas, conjugados, etc⁴². Así, el desarrollo de estos nanosistemas se ha convertido en un área de investigación importante puesto que poseen la capacidad de suministrar una amplia gama de compuestos para las diferentes vías de administración por periodos de tiempo sostenido.

1.6.1. LIPOSOMAS

Los liposomas (**Figura 7**) son vesículas constituidas en su forma más simple, por una bicapa lipídica que rodea una cavidad acuosa central⁴³. En una manera más compleja, los liposomas pueden contener una o múltiples bicapas alrededor de un núcleo y, dependiendo de la técnica de obtención empleada su tamaño puede comprender decenas o centenares de nanómetros. Su tamaño y características fisicoquímicas les permiten circular, penetrar y difundirse con mejores resultados que los obtenidos con una formulación convencional⁴⁴. Las características que hacen de estos sistemas herramientas prometedoras en la vehiculización de fármacos son principalmente su carácter inerte, su elevada biocompatibilidad y sus aceptables perfiles de toxicidad y antigenicidad.

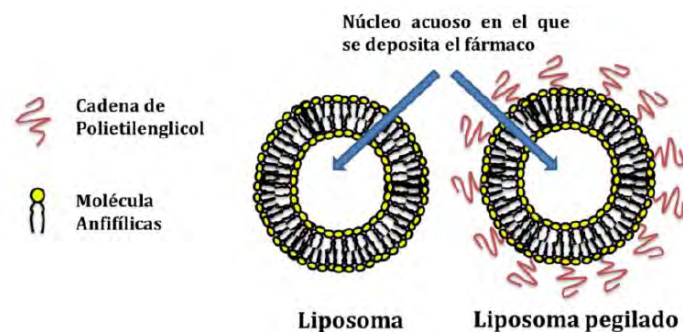


Figura 7. Representación esquemática de dos liposomas. La forma más sencilla construida de moléculas anfifílicas a la izquierda y a la derecha una estructura liposomal modificada en su estructura por PEG.

⁴² Ibid.

⁴³ Lian, T. and R. J. Y. Ho (2001). "Trends and developments in liposome drug delivery systems." *Journal of Pharmaceutical Sciences* **90**(6): 667-680.

⁴⁴ Malam, Y., M. Loizidou and A. M. Seifalian (2009). "Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer." *Trends in Pharmacological Sciences* **30**(11): 592-599.

Estos sistemas como la gran mayoría de las nanoestructuras estudiadas en clínica, presentan un perfil de toxicidad y seguridad lo suficientemente aceptable, además de que generalmente están elaborados a partir de materiales biocompatibles⁴⁵.

1.6.2. NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas son sistemas matriciales con un tamaño comprendido entre 10 y varios cientos de nanómetros, obtenidas a partir de una gran variedad de materiales, en su mayoría polímeros, tanto naturales como sintéticos. Dentro de los polímeros naturales, o biopolímeros, a partir de los cuales se han elaborado nanopartículas, es interesante resaltar algunas proteínas como la albumina, polisacáridos como el quitosán o el ácido hialurónico, polipéptidos y poliaminoácidos. Dentro de la infinidad de materiales de origen sintético, se puede hacer particular mención de los poliésteres y los poliacrilatos⁴⁶.

El término nanopartícula es el nombre genérico que reciben tanto las nanoesferas como las nanocápsulas. La diferencia entre estas dos estructuras se da en la morfología y la arquitectura de la entidad. Las nanoesferas se encuentran formadas por una densa matriz polimérica, en este caso el activo es dispersado o absorbido en la superficie de la partícula. Las nanocápsulas a su vez están compuestas de un núcleo o reservorio que puede ser oleoso o acuoso cubierto por una membrana polimérica multifuncional, de tal manera que los activos se pueden asociar en el núcleo (de carácter oleoso o acuoso) o ser adsorbidos en la superficie⁴⁷.

⁴⁵ Rivera, G. R. (2012). Nuevos Transportadores de Fármacos: Nanocápsulas de Poliarginina y Caseína. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela.

⁴⁶ Hervella, P., V. Lozano, M. Garcia-Fuentes and M. J. Alonso (2008). "Nanomedicine: New Challenges and Opportunities in Cancer Therapy." Journal of Biomedical Nanotechnology **4**(3): 276-292.

⁴⁷ Quintanar-Guerrero, D. (1997). Tesis Doctoral N° 2950, Universidad de Ginebra

1.6.3. CONJUGADOS POLIMÉRICOS

El término conjugado se refiere a nanoestructuras híbridas consistentes en polímeros enlazados covalentemente a un agente terapéutico⁴⁸. Dentro de los conjugados poliméricos se distinguen dos grupos: conjugados polímero-proteína y conjugados polímero-fármaco (**Figura 8**). El objetivo perseguido con estos conjugados va desde mejorar la estabilidad del fármaco y reducir su inmunogenicidad hasta conseguir una biodistribución más adecuada⁴⁹.

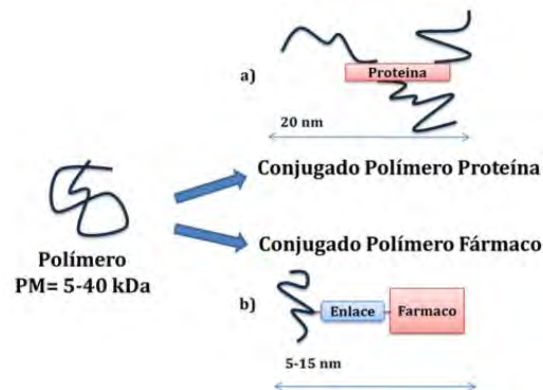


Figura 8. Esquema de conjugados poliméricos. Se muestran dos tipos de conjugados poliméricos: a) Conjugado polímero-proteína, el ingrediente activo terapéutico es una proteína, pudiendo ser un enzima o un anticuerpo. b) Conjugado polímero-fármaco, el ingrediente activo es una molécula terapéutica.

1.6.4. MICELAS POLIMÉRICAS

Las micelas, son nanoestructuras originadas a partir del auto-ensamblaje de moléculas anfílicas, generalmente tensoactivos, proteínas o polímeros sintéticos o naturales, de tamaño comprendido entre los 10 y los 100 nm. Estos sistemas presentan una estructura

⁴⁸ Duncan, R. (2006). "Polymer conjugates as anticancer nanomedicines." *Nature Reviews Cancer* 6(9): 688-701.

⁴⁹ Vicent, M. J. and R. Duncan (2006). "Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer." *Trends in Biotechnology* 24(1): 39-47.

tipo reservorio con un núcleo generalmente hidrofóbico en el que comúnmente se deposita al fármaco y una superficie hidrofílica⁵⁰ (**Figura 9**). Por su sencillez y versatilidad en cuanto a preparación y componentes empleados, las micelas son consideradas hoy en día como los nanomedicamentos con mayor potencial en clínica a corto plazo.

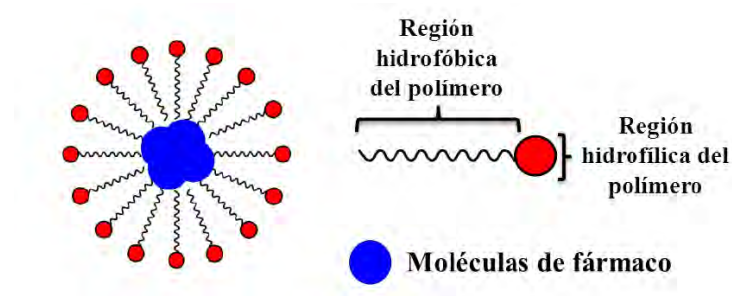


Figura 9. Esquema de una micela polimérica mostrando los componentes que la constituyen.

1.6.5. NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Las nanocápsulas son sistemas nanométricos vesiculares formados por un reservorio interno, que puede estar constituido por agua o aceite, rodeado de una cubierta polimérica⁵¹ (**Figura 10**). Un espacio físico como el que ofrece el reservorio de las nanocápsulas, incrementa la posibilidad de obtener una gran carga de fármaco, en comparación a otro tipo de nanoestructuras. Además, combinando la estructura vesicular y la cubierta multifuncional estos sistemas pueden proteger al fármaco de las condiciones ambientales dentro y fuera del organismo. Por otro lado, la naturaleza líquida del núcleo y su elasticidad, puede facilitar el contacto de la nanoestructura con el epitelio y de alguna forma mejorar la internalización. Finalmente, la cubierta polimérica en estos sistemas

⁵⁰ Blanco, E., A. Hsiao, A. P. Mann, M. G. Landry, F. Meric-Bernstam and M. Ferrari (2011). "Nanomedicine in cancer therapy: Innovative trends and prospects." *Cancer Science* **102**(7): 1247-1252.

⁵¹ Mora-Huertas, C. E., H. Fessi and A. Elaissari (2010). "Polymer-based nanocapsules for drug delivery." *International Journal of Pharmaceutics* **385**(1-2): 113-142.

ofrece la posibilidad de obtener una liberación controlada al fármaco encapsulado, ya sea mediante *targeting* o mediante la multifuncionalidad de la misma⁵².

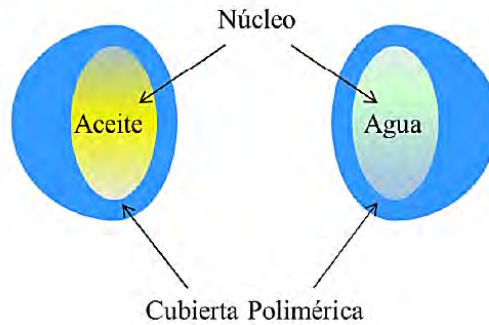


Figura 10. Representación esquemática de la estructura de nanocápsulas de núcleo oleoso y acuoso.

Desde el punto de vista farmacéutico, las nanocápsulas son atractivas porque ofrecen una gran alternativa para solucionar diferentes retos farmacológicos, ya que sus ventajas van desde un aumento de la biodisponibilidad de fármacos hidrofóbicos, hasta mejoras en la captura celular en los sitios diana, o disminuciones en los mecanismos de resistencia celular, asociados a la gran capacidad de fármaco que presentan gracias a su estructura⁵³.

Comparadas con otros sistemas de liberación coloidales, las nanocápsulas presentan una mayor estabilidad cuando están en contacto con fluidos biológicos y su naturaleza polimérica las hace susceptibles de convertirse en sistemas de liberación prolongada y controlada.

A la fecha se han empleado diversos métodos para la obtención de nanocápsulas. Todos ellos están basados en diferentes principios fisicoquímicos e incluyen a) la polimerización

⁵² Legrand, P., G. Barratt, V. Mosqueira, H. Fessi and J. P. Devissaguet (1999). Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. Paris, FRANCE, Editions de santé.

⁵³ Hervella, P., G. Lollo, F. Oyarzun-Ampuero, G. Rivera, D. Torres and M. J. Alonso (2011). Nanocapsules as Carriers for the Transport and Targeted Delivery of Bioactive Molecules. Nanocomposite Particles for Bio-Applications, Pan Stanford Publishing: 45-67.

interfacial⁵⁴, b) el desplazamiento de disolvente, también llamado método de precipitación instantánea⁵⁵, c) la inversión de fase por temperatura⁵⁶, y d) la adsorción de un polímero a una nanoemulsión preformada⁵⁷. Como en todas las nanoestructuras, la elección de los materiales, las características de solubilidad del principio activo y el método de preparación correcto son parámetros cruciales para el éxito del nanosistema.

Las propiedades del material en aspectos como la biocompatibilidad, características de degradación, características de liberación deseadas del principio activo son fundamentales a la hora de definir el tipo de aplicación biomédica.

Por otra parte, la notable superficie específica de las nanocápsulas es responsable de la adhesividad. Este comportamiento, que sin duda constituye un problema desde un punto de vista tecnológico, puede conducir a aumentos adicionales en la biodisponibilidad oral de algunos fármacos, derivados de la adhesión de las nanocápsulas en el tracto gastrointestinal y, consecuentemente, de la disolución del fármaco en su lugar de absorción.

Los polímeros naturales como los polisacáridos han sido ampliamente empleados para la formación de nanocápsulas. Actualmente se ha descrito la preparación de nanocápsulas de quitosán y alginato mediante una modificación de la técnica de la deposición interfacial.

Así mismo, la superficie y características de los nanosistemas se han modificado en diferentes ocasiones con polímeros hidrofílicos para cumplir distintos objetivos. Por ejemplo, el recubrimiento con un biopolímero mucoadhesivo como el quitosán o los

⁵⁴ Couvreur, P., B. Kante, M. Roland, P. Guiot, P. Bauduin and P. Speiser (1979). "Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **31**(1): 331-332.

⁵⁵ Fessi, H., F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita (1989). "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement." *International Journal of Pharmaceutics* **55**(1): R1-R4.

⁵⁶ Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust and J.-P. Benoit (2002). "A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers." *Pharmaceutical Research* **19**(6): 875-880.

⁵⁷ Prego, C., M. Fabre, D. Torres and M. J. Alonso (2006). "Efficacy and Mechanism of Action of Chitosan Nanocapsules for Oral Peptide Delivery." *Ibid.* **23**(3): 549-556.

alginatos, por medio de incubación, ha permitido obtener mejoras en la biodisponibilidad oral de moléculas peptídicas⁵⁸.

1.6.6. NANOCÁPSULAS LIPÍDICAS

Recientemente se han desarrollado nanocápsulas de nueva generación, denominadas nanocápsulas lipídicas (LNC)⁵⁹. Estos sistemas consisten en un núcleo oleoso rodeado por un ligero recubrimiento polimérico, a base de PEG-hidroxiestearato. Se describe para su preparación un novedoso método de inversión de fase, libre de disolventes. En este proceso todos los componentes del sistema se mezclan dentro de la fase acuosa, y se aplican una serie de ciclos de temperatura⁶⁰. Una etapa final de enfriamiento rápido-dilución permite la formación de las LNC con tamaño de partícula promedio entre 20 y 100 nm⁶¹.

En conclusión, la utilización de estas plataformas nanotecnológicas tiene como finalidad⁶²:

- Proteger al fármaco de su degradación, tanto física como química, aspecto esencial cuando se piensa en la utilización de principios activos altamente inestables.
- Incrementar la absorción de fármacos facilitando su difusión a través de los epitelios, aspecto de importancia relevante cuando se trata de buscar alternativas a la administración parenteral de fármacos.

⁵⁸ Garcia-Fuentes, M., C. Prego, D. Torres and M. J. Alonso (2005). "A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **25**(1): 133-143.

⁵⁹ Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust and J.-P. Benoit (2002). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. New York, NY, ETATS-UNIS, Springer.

⁶⁰ Anton, N., P. Gayet, J.-P. Benoit and P. Saulnier (2007). "Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion." *International Journal of Pharmaceutics* **344**(1-2): 44-52.

⁶¹ Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust and J.-P. Benoit (2003). "Physico-chemical stability of colloidal lipid particles." *Biomaterials* **24**(23): 4283-4300.

⁶² Vila-Jato, J. L. (2008). Repercusiones de la Nanotecnología Farmaceutica en la Farmacoterapia del Cancer. Introduccion a la Nanotecnología S. A. L. Artes Gráficas Vicus. Santiago de Compostela

- Modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y con ello su perfil de distribución a ciertos órganos y tejidos para incrementar su eficacia o disminuir efectos indeseables.

1.7. BIOPOLÍMEROS COMO MATERIALES DE RECUBRIMIENTO DE NANOESTRUCTURAS

Como se ha mencionado con anterioridad, el éxito de un nanosistema reside en gran medida en la correcta selección de sus componentes, así como el impacto y la función de cada uno de estos dentro de la formulación. En el caso de las nanocápsulas, además de una buena selección del agente oleoso utilizado como reservorio, y de los tensoactivos que garanticen un bajo perfil de toxicidad del sistema, un factor crucial es la selección adecuada de un polímero versátil, seguro, biodegradable y sobre todo con la posibilidad de dotar de funciones específicas al sistema (larga permanencia, capacidad interacción, capacidad de penetración, etc.).

1.7.1. QUITOSÁN

El quitosán es un aminopolisacárido obtenido a escala industrial por N-desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los desechos de crustáceos. A lo largo del tiempo el quitosán se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos y comercialmente en la manufactura de parches cicatrizantes. Más del 50% del número total de solicitudes de patentes registradas reivindican el uso de este biopolímero como una parte sustancial de la invención están relacionadas con la liberación de fármacos, ingeniería de tejidos y

cicatrización de heridas⁶³. Actualmente estos son los nichos de mercado de mayor crecimiento en el mundo⁶⁴.

Químicamente, el término quitosán define a una familia de herteropolisacáridos lineales que están formados por 2-amino-2-deoxi-β-D-glucosa (unidades D) y 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucosa (unidades A) unidas en (1→4) (**Figura 11**). Las unidades de tipo "A" a menudo están presentes en menor proporción que las de tipo D, y su contenido, expresado como la relación molar de unidades A frente al total (A+D), se conoce como el grado de acetilación que se expresa como porcentaje (GA) o como una fracción (FA). Junto al grado de polimerización, el GA es un parámetro fundamental que determina directamente las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosán⁶⁵.

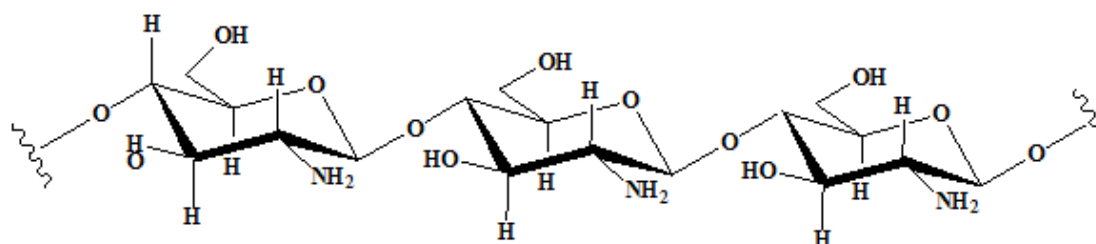


Figura 11. Estructura esquemática representativa de una cadena de quitosán conteniendo residuos de monosacáridos 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucopiranosos (residuos A) y 2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranosos (residuos D), ambos unidos por enlaces " (1→4).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosán es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. Además, el carácter policationico le confiere al quitosán

⁶³ Goycoolea, F. M., C. Remuñán-López and M. J. Alonso (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano. *Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. R. A. N. d. F. Instituto de España. Madrid, España: 103-131.

⁶⁴ Orive, G., A. M. Carcaboso, R. M. Hernández, A. R. Gascón and J. L. Pedraz (2005). "Biocompatibility Evaluation of Different Alginates and Alginate-Based Microcapsules." *Biomacromolecules* 6(2): 927-931.

⁶⁵ Schipper, N. G. M., K. M. Vårum, P. Stenberg, G. Ocklind, H. Lennernäs and P. Artursson (1999). "Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs: 3: Influence of mucus on absorption enhancement." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 8(4): 335-343.

alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas (p. ej. insulina, pADN, siARN, heparina, etc.) y antigénicas, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica.

Se sabe que el quitosán es degradado por varias enzimas, entre ellas las quitinasas y la lisozima presente en superficies mucosas y en suero humano así como por enzimas gástricas como la papaína, pepsina, y lipasa A⁶⁶.

Otras propiedades biológicas han sido ampliamente estudiadas en el quitosán, tanto *in vitro* como en modelos animales, entre ellas cabe mencionar las siguientes: mucoadhesividad, biocompatibilidad, baja toxicidad, inmunoestimulación, capacidad para facilitar la absorción de macromoléculas biológicas a través de barreras epiteliales por la apertura transitoria de las uniones estrechas celulares⁶⁷.

1.7.2. ALGINATO

El alginato es otro polisacárido obtenido principalmente a partir de algas marinas marrones y que ha atraído especial interés en el campo biomédico a lo largo de la última década (**Figura 12**)⁶⁸. Químicamente, es un copolímero constituido por poli-D-manuronato (poli-M) y poly-L-guluronato (poli-G) homopoliméricos y por bloques donde ambos residuos ocurren alternadamente. La composición de la cadena de alginato, resumida en el valor de la relación de la fracción molar de residuos de D-manuronato a L-guluronato (ratio M/G) es determinante en las propiedades fisicoquímicas y funcionales del alginato. Destaca en este sentido, la capacidad de gelificar en presencia de cationes bivalentes específicos (Ca^{2+} , Sr^{2+} ,

⁶⁶ Nordtveit, R. J., K. M. Varum and O. Smidsrod (1996). "Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme." *Carbohydrate Polymers* **29**(2): 163-167.

⁶⁷ Goycoolea, F. M., C. Remuñán-López and M. J. Alonso (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano. *Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. R. A. N. d. F. Instituto de España. Madrid, España: 103-131.

⁶⁸ Park, H. and K. Y. Lee (2008). Alginate hydrogels as matrices for tissue engineering. En: *Natural-based polymers for biomedical applications*. *Natural-based polymers for biomedical applications*. W. Publishing. Cambridge, Inglaterra: 515-532.

Ba²⁺) como consecuencia de la interacción cooperativa tipo “caja de huevo” (“egg-box” en Inglés) entre bloques de poli-G de longitud más de 6- 10 residuos, en virtud de la cual dos grupos carboxilato forman un complejo de coordinación con el catión⁶⁹.

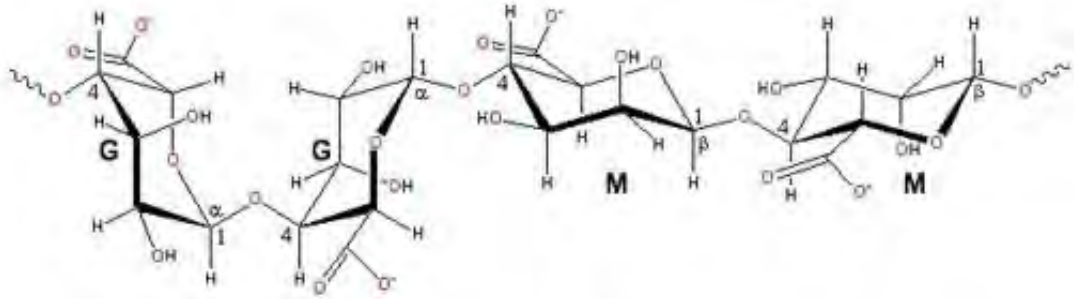


Figura 12. Estructura química de una cadena de alginato.

Con base a su capacidad de formar hidrogeles y de la demostrada biocompatibilidad del alginato, se ha utilizado ampliamente en el diseño e ingeniería de biomateriales. Adicionalmente, desde hace casi cuatro décadas se le han atribuido al alginato propiedades bioadhesivas⁷⁰.

Dado que las propiedades fisicoquímicas y biológicas del alginato en cierta medida son complementarias a las del quitosán, se ha investigado el desarrollo de sistemas nanoparticulares a base de ambos polisacáridos. Se han descrito al menos tres distintas estrategias metodológicas para preparar nanopartículas de este tipo, mismas que se representan esquemáticamente en la **Figura 13**.

⁶⁹ Goycoolea, F. M., C. Remuñán-López and M. J. Alonso (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano. Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. R. A. N. d. F. Instituto de España. Madrid, España: 103-131.

⁷⁰ Smart, J. D., I. W. Kellaway and H. E. C. Worthington (1984). "An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery." Journal of Pharmacy and Pharmacology **36**(5): 295-299.



Figura 13. Representación esquemática de tres distintos tipos de nanopartículas a base de quitosán y alginato: a) Nanomatriz pre-gelificada de alginato por reticulación ionotrópica con cloruro cálcico recubierta con quitosán; b) Nanomatriz de quitosán preparada por coacervación con sulfato de sodio recubierta con alginato; c) Nanomatriz híbrida co-gelificada por gelificación ionotrópica de quitosán con tripolifosfato pentasódico (TPP) y complejación concomitante del alginato⁶⁹.

1.7.3. MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE BIOPOLIMEROS

La mayor parte de los sistemas poliméricos conocidos son susceptibles de degradación en condiciones más o menos severas, que pueden variar substancialmente de unos sistemas a otros. De forma general se pueden considerar dos tipos de procesos:

1. Aquellos que se inician mediante la absorción de algún tipo de energía, lo que origina el desarrollo y propagación de la degradación molecular mediante reacciones secundarias.
2. Mecanismos puramente hidrolíticos que dan lugar a la fragmentación de las cadenas macromoleculares, lo que normalmente ocurre con polímeros portadores de heteroátomos en la cadena principal, de tal forma que en varios sistemas se puede considerar como el proceso inverso a una policondensación.

El entorno del medio fisiológico del organismo humano no ofrece ninguna de las condiciones necesarias para que se produzcan los procesos catalogados en el primer grupo,

sin embargo el medio fisiológico humano reúne las condiciones apropiadas para que se puedan producir con facilidad procesos hidrolíticos. Para ello, el polímero debe poseer enlaces hidrolíticamente inestables, debe ser hidrófilo, para que el proceso biodegradativo se produzca en un tiempo razonable y la hidrólisis debe poder realizarse bajo condiciones de pH fisiológico (entre 7 y 7.4). Los sistemas poliméricos con heteroátomos en la cadena polimérica principal, como los poliésteres, poli (α -aminoácidos), algunas poliamidas y poliuretanos, son susceptibles de hidrólisis en condiciones fisiológicas⁷¹.

El agua interacciona eficazmente con los polímeros no hidrófobos, dando lugar a fenómenos de hinchamiento y disolución, por lo que puede ser el agente responsable de la biodegradación de polímeros en el organismo humano. En cuanto a los diferentes electrolitos (aniones y cationes salinos en solución), así como la acidez y basicidad del medio, pueden tener un efecto importante tanto en la degradación hidrolítica como en la oxidativa⁷². La interacción de sales con los polímeros implantados en el organismo, depende de la solubilidad del propio polímero en la solución salina isotónica.

En cuanto a las enzimas, se puede decir que son capaces de contribuir considerablemente a la degradación de polímeros en el organismo humano⁷³. Debido a su gran tamaño molecular, las enzimas, normalmente, no pueden penetrar y difundirse a través de la matriz polimérica, por lo que su actividad se desarrolla en la superficie o cuando se ha producido la fragmentación de la matriz polimérica. Los fragmentos de pequeño tamaño pueden ser fagocitados por los macrófagos, formando vacuolas digestivas, que son atacadas por las enzimas de los lisosomas de gran actividad, tales como hidrolasas y oxidasas, que

⁷¹ Williams, D. F. (1992). "Mechanisms of biodegradation of implantable polymers." Clinical Materials **10**(1-2): 9-12.

⁷² Fukushima, K., D. Tabuani, M. Dottori, I. Armentano, J. M. Kenny and G. Camino (2011). "Effect of temperature and nanoparticle type on hydrolytic degradation of poly(lactic acid) nanocomposites." Polymer Degradation and Stability **96**(12): 2120-2129.

⁷³ Smith, R., C. Oliver and D. F. Williams (1987). "The enzymatic degradation of polymers *in vitro*." J Biomed Mater Res **21**(8): 991-1003.

destruyen fácilmente a los polímeros⁷⁴. Está claramente demostrado que la biodegradación de implantes introducidos en el organismo humano, se produce, tanto por la actividad de los componentes del medio fisiológico extracelular, como por la actividad celular⁷⁵.

La degradación de la matriz polimérica, normalmente acompañada de fragmentación y formación de tejido fibroso, es la respuesta característica del organismo ante la presencia de un cuerpo extraño⁷⁶. El grado y alcance de esta respuesta depende de factores tales como la composición química de la matriz, la textura superficial, la forma y el tamaño propio de la matriz ya que van a ser eliminados por el organismo a través de la formación de productos de degradación biocompatibles que se transforman en CO₂ y H₂O por las vías metabólicas usuales.

1.7.4. BIOADHESIÓN Y MUCOADHESIÓN DE BIOPOLÍMEROS

La vía oral es la forma más aceptada de administración de medicamentos, sin embargo, la eficacia de numerosos fármacos cuando son administrados por esta vía resulta deficiente. Entre los factores que pueden condicionar la eficacia y/o biodisponibilidad oral de un fármaco se puede destacar el tiempo de residencia de la forma farmacéutica en las diferentes regiones del tracto gastrointestinal, una baja o parcial solubilidad del activo en los fluidos gastrointestinales (en el caso de fármacos lipofílicos), una baja o restringida permeabilidad para atravesar la mucosa (caso de fármacos hidrofílicos) y la presencia de

⁷⁴ Li, X., X. Deng and Z. Huang (2001). "In vitro protein release and degradation of poly-dl-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped human serum albumin: quantitative evaluation of the factors involved in protein release phases." *Pharm Res* **18**(1): 117-124.

⁷⁵ Bostman, O. and H. Pihlajamaki (2000). "Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review." *Biomaterials* **21**(24): 2615-2621.

⁷⁶ Behling, C. A. and M. Spector (1986). "Quantitative characterization of cells at the interface of long-term implants of selected polymers." *J Biomed Mater Res* **20**(5): 653-666.

enzimas y de condiciones fisicoquímicas desfavorables que puedan inducir la degradación del fármaco⁷⁷.

Una estrategia para prolongar el tiempo de residencia del fármaco en contacto con su lugar de acción o absorción puede ser el uso de sistemas de liberación adhesivos. Estos sistemas tienen que ser capaces de aumentar el tiempo de contacto con la mucosa y permitir el establecimiento de un gradiente de concentración entre el fármaco, la forma farmacéutica y el soporte biológico.

Por ello, el objetivo principal de las formas farmacéuticas adhesivas es el de aumentar la biodisponibilidad oral y la eficacia de los fármacos. En este contexto, el uso de nanopartículas es una opción para solventar los problemas relacionados con la baja biodisponibilidad oral de numerosos fármacos. Al comparar estas formas microscópicas con las convencionales, se deduce que la mayor superficie específica de las nanopartículas facilita el desarrollo de interacciones adhesivas con los componentes de la mucosa. Cuando las nanopartículas se administran por vía oral, bajo forma de suspensión, difunden en el medio y pueden ser inmovilizadas en la superficie intestinal por un mecanismo de adhesión. Pero, cuando la adhesión está restringida a la capa del mucus que recubre la superficie de la mucosa, se emplea el término mucoadhesión⁷⁸.

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.

La selección de o de los polímeros a utilizar son parámetros críticos dentro de la formulación y desarrollo tecnológico de los nanoplataformas poliméricas. Así pues, para el

⁷⁷ Arangoa, M. A., M. A. Campanero and J. M. Irache (2004). "Potencial Bioadhesivo de las Nanopartículas de Gliadina en el Estómago." *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm* **33**(1): 38-47.

⁷⁸ Smart, J. D. (2005). "The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion." *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**(11): 1556-1568.

desarrollo de los sistemas nanofarmacéuticos los polímeros mucoadhesivos empleados que se consideran ideales deben presentar las siguientes características⁷⁹.

- a) Nula toxicidad y absorción por el tracto intestinal del polímero y sus productos de degradación.
- b) Completa biocompatibilidad con la membrana mucosa del tracto gastrointestinal.
- 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.

De acuerdo con el tipo de interacciones que existen entre los polímeros y la mucina (mucoadhesión), estos se pueden clasificar de acuerdo con su mecanismo de enlace en no covalentes y covalentes. En el primer grupo se encuentran los polímeros con grupos funcionales que pueden tener algún tipo de interacción electrostática con las mucinas destacándose las moléculas con grupos carbonilo (también llamados polímeros mucoadhesivos de primera generación)⁸⁰.

En el segundo tipo se encuentran los polímeros capaces de formar enlaces covalentes, que son una nueva generación de polímeros, denominados tíómeros, pues tienen el grupo funcional tiol en sus cadenas. La formación de enlaces disulfuro entre el tíómero y las mucinas se lleva a cabo por dos vías:

⁷⁹ Asane, G. S., S. A. Nirmal, K. B. Rasal, A. A. Naik, M. S. Mahadik and Y. M. Rao (2008). "Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery System: A Current Status." *Drug Development and Industrial Pharmacy* **34**(11): 1246-1266.

⁸⁰ Andrews, G. P., T. P. Laverty and D. S. Jones (2009). "Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery." *Eur J Pharm Biopharm* **71**(3): 505-518.

- a) Reacciones de intercambio tiol/disulfuro
- b) Procesos simples de oxidación de los grupos tiol libres.

Por lo tanto, los tíómeros imitan el mecanismo natural de las glicoproteínas mucosas secretadas, las cuales son también ancladas por enlaces covalentes a la capa mucosa por la formación de enlaces disulfuro. La velocidad de formación de este tipo de enlaces depende de la concentración de aniones tiolato, los cuales son la forma reactiva para las reacciones de intercambio y procesos de oxidación⁸¹. En la **Figura 14** se muestran algunos polímeros con propiedades bioadhesivas⁸².

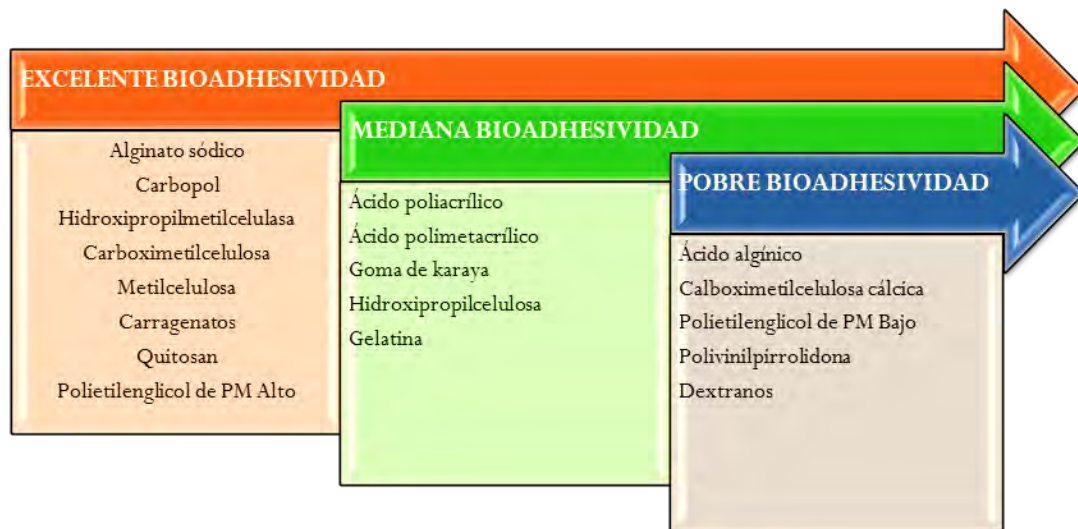


Figura 14. Clasificación de la capacidad adhesiva de polímeros⁸².

Las propiedades mucoadhesivas del quitosán se deben a la interacción entre sus grupos amino protonados y la capa de mucus. Éste está compuesto por una glicoproteína, la

⁸¹ Perilla, J. E. (2008). Desarrollo de materiales bioadherentes y biodegradables a partir de copolímeros derivados del ácido láctico. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia.

⁸² Rodríguez, I. C., A. Cerezo and I. I. Salem (2000). "Sistemas de liberación Bioadhesivos." Ars Pharmaceutica **41**(1): 115-128.

mucina, que tiene cargas negativas debido a la presencia de residuos de ácido siálico. La unión depende de la cantidad de ácido siálico presente en la mucina y del grado de desacetilación del quitosán o grupos amino libres. EL pH también influye en las propiedades mucoadhesivas del quitosán ya que a pH ácido el quitosán se encuentra cargado positivamente (pKa 6,5). También se ha descrito que el quitosán con cadenas poliméricas más largas penetran más en la capa de mucina, por lo que un alto peso molecular del quitosán también puede favorecer la mucoadhesión⁸³.

A diferencia del quitosán, el alginato es un polianión que contiene grupos carboxilo terminales y posee característica de mucoadhesividad. Estudios han mostrado que tiene una mayor fuerza de adhesión en comparación con polímeros como por ejemplo carboximetilcelulosa. Además, en presencia de quitosán ha mostrado tener excelentes propiedades bioadhesivas, las cuales han manifestado una fuerte afinidad por la mucosa gástrica⁸⁴.

Esta característica del alginato puede ser de gran utilidad para sistemas de liberación de drogas en tejidos mucosos como por ejemplo el tracto gastrointestinal, y también permite aumentar el tiempo de residencia en las superficies de absorción de fármacos, mejorando su biodisponibilidad y efectividad⁸⁵.

⁸³ Majithiya, R. J. and R. S. Murthy (2005). "Chitosan-based mucoadhesive microspheres of clarithromycin as a delivery system for antibiotic to stomach." *Curr Drug Deliv* **2**(3): 235-242.

⁸⁴ Wang, X. and H. G. Spencer (1998). "Calcium alginate gels: formation and stability in the presence of an inert electrolyte." *Polymer* **39**(13): 2759-2764.

⁸⁵ George, M. and T. E. Abraham (2006). "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review." *J Control Release* **114**(1): 1-14.

1.8. MÉTODOS DE EVALUACIÓN *IN VITRO*

El desarrollo de líneas celulares estables ha proporcionado una herramienta muy útil para la evolución de distintos procesos relacionados con la función barrera del intestino. Se han utilizado distintos tipos celulares para la evaluación de los mecanismos de transporte de diferentes compuestos. Entre los modelos celulares más empleados se encuentran las células derivadas del adenocarcinoma humano Caco-2⁸⁶. El uso mayoritario de este tipo de células se debe en gran parte a su capacidad de formación de monocapas de células polarizadas que se diferencian tras confluencia y que expresan la mayoría de genes presente en el epitelio intestinal o colónico, dando lugar a células semejantes a enterocitos. Las ventajas económicas y éticas de los sistemas *in vitro* frente al empleo de animales de experimentación supera en muchos casos las limitaciones estos modelos.

1.8.1. LÍNEAS CELULARES CACO-2 Y ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD

Estas células crecen en cultivo adheridas a un sustrato formando una monocapa. Cuando alcanzan la confluencia se diferencian espontáneamente, formando una monocapa polarizada que presenta muchas de las características morfológicas y funcionales de los enterocitos humanos maduros: polarización celular, formación de domas, uniones intracelulares estrechas, microvellosidades en el lado apical, transportadores típicos del intestino, enzimas metabólicas y secreciones propias de la membrana del borde en cepillo (fosfatasa alcalina, sucrasa-isomaltasa, aminopeptidasa)⁸⁷.

⁸⁶ Sambuy, Y., I. De Angelis, G. Ranaldi, M. L. Scarino, A. Stammati and F. Zucco (2005). "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics." *Cell Biol Toxicol* **21**(1): 1-26.

⁸⁷ Hilgendorf, C., G. Ahlin, A. Seithel, P. Artursson, A.-L. Ungell and J. Karlsson (2007). "Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines." *Drug Metab Dispos* **35**(8): 1333-1340.

Algunas de las ventajas que presentan los cultivos de células Caco-2 frente a los modelos de absorción convencionales son:

- La rápida determinación de la permeabilidad y metabolismo de los fármacos.
- El estudio de los mecanismos de absorción bajo condiciones controladas.
- La evaluación rápida de métodos que mejoren la absorción de fármacos.
- La realización de estudios con líneas celulares humanas
- Decremento en la experimentación con animales de laboratorio.

Actualmente, las monocapas de células Caco-2 cultivadas en filtros permeables se utilizan para la realización de estudios de transporte transepitelial de fármacos, nutrientes y más recientemente en plataformas nanotecnológicas⁸⁸. En muchos casos es posible investigar si un fármaco es transportado de forma activa o pasiva a través del epitelio intestinal y, si el transporte es activo, permite identificar el transportador más importante (**Figura 15**)⁸⁹.

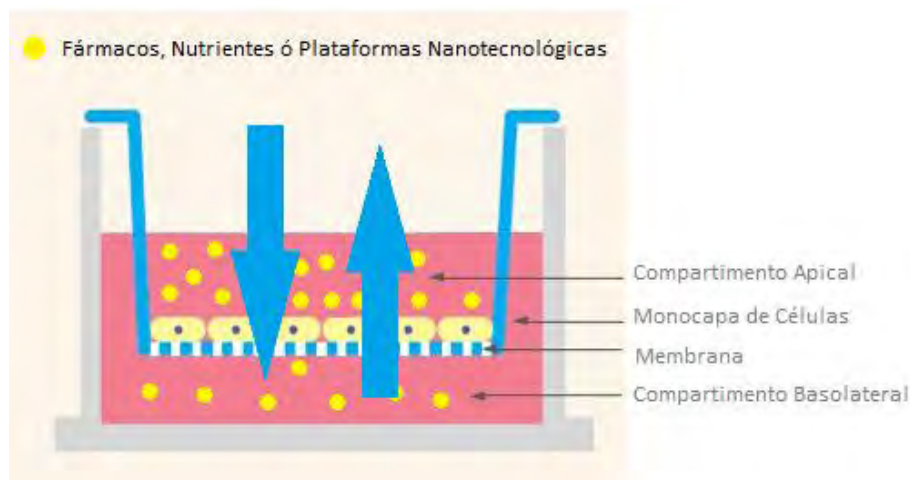


Figura 15. Esquema de la técnica de estudio del transporte transepitelial de compuesto *in vitro* en monocapas Caco-2. Las flechas indican la dirección de la permeabilidad.

⁸⁸ Delie, F. and W. Rubas (1997). "A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model." *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **14**(3): 221-286.

⁸⁹ Artursson, P. (1991). "Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa." *Ibid.* **8**(4): 305-330.

En estudios más recientes, indican que este modelo *in vitro* permite clasificar la permeabilidad de los fármacos de forma similar a otros modelos de absorción más complejos, como los tejidos intestinales aislados o los modelos de perfusión *in situ*⁹⁰.

Otro tipo de estudios que se puede realizar en relación con los cultivos de células Caco-2 es la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Las uniones estrechas limitan la difusión paracelular de moléculas hidrofílicas de forma selectiva, por carga y tamaño. Cuando el movimiento de iones a través de la monocapa está restringido debido al correcto funcionamiento de la unión estrecha, existe un gradiente de potencial eléctrico a ambos lados de la misma. Por ello, la integridad y la maduración *tight junction* (uniones estrechas) se suele determinar midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), que es inversamente proporcional a la permeabilidad, empleando para ello un voltímetro cuyos electrodos pueden aplicarse directamente sobre los soportes permeables⁹¹.

Las medidas de TEER suelen realizarse para hacer un seguimiento del crecimiento celular tras la siembra, ya que su valor aumenta a medida que se va formando la monocapa de células. Así mismo, se realizan medidas de TEER durante los experimentos de permeabilidad de sustancias problema para observar cualquier cambio en la integridad de la monocapa.

En conclusión, los resultados obtenidos hasta la fecha indican que las monocapas de células Caco-2 pueden utilizarse para predecir el transporte de fármacos a través de diferentes vías en el epitelio intestinal. Las mejores correlaciones con la fracción absorbida *in vivo* se obtienen para fármacos que se absorben de forma pasiva y rápida. Para aquellos fármacos que no se absorben de forma completa o que lo hacen utilizando sistemas transportadores la

⁹⁰ Artursson, P., K. Palm and K. Luthman (2001). "Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport." *Adv Drug Deliv Rev* 46(1-3): 27-43.

⁹¹ Expósito-Harris, R. (2010). Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

relación entre los coeficientes de permeabilidad obtenidos en células Caco-2 y la absorción *in vivo* parece ser más cualitativa que cuantitativa.

1.8.2. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

En la actualidad, la toxicología ha alcanzado enormes trascendencias debido al importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental. Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos: es el caso de la llamada “toxicología reguladora”, rama dentro de la toxicología que se dedica a la legalización y armonización de todos los protocolos e informes de sustancias tóxicas a partir de normativas legales, disposiciones ministeriales por propia iniciativa o como cumplimiento de recomendaciones o directrices de organismos internacionales los cuales producen un extenso cuerpo legal de raíz toxicológica, ampliamente conocidas⁹².

Dentro de los ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. El objetivo de las pruebas

⁹² Combes, R. D. (2002). "The ECVAM workshops: a critical assessment of their impact on the development, validation and acceptance of alternative methods." *Altern Lab Anim* **30 Suppl 2**: 151-165.

de citotoxicidad es evaluar el efecto de los materiales sobre diferentes poblaciones celulares después de la exposición⁹³. Los atributos fisicoquímicos únicos de las plataformas nanotecnológicas hacen que éstas puedan producir condiciones químicas que inducen a un ambiente preoxidante causando un desequilibrio en el sistema energético celular dependiendo del potencial redox, provocando efectos biológicos adversos, que van desde la activación de rutas inflamatorias hasta la muerte celular⁹⁴.

Durante los estudios de citotoxicidad en cultivos celulares (Caco-2) se evalúa la influencia de los compuestos sobre la mortalidad celular bajo distintas condiciones. En la **Figura 16** se muestra el cultivo de células en placa para la evaluación de citotoxicidad.

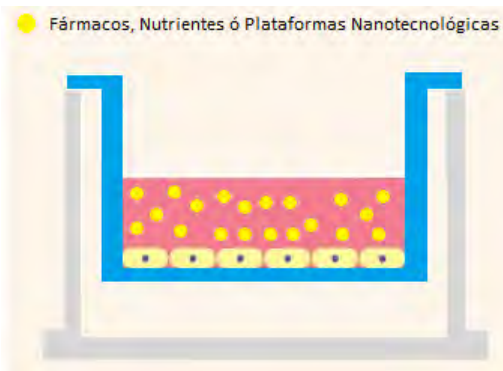


Figura 16. Esquema de la técnica de citotoxicidad de compuestos *in vitro* en monocapas Caco-2.

Existen variados ensayos de citotoxicidad, entre los que cuentan el ensayo de reducción de un metabolito coloreado amarillo, MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio), que mide la actividad del metabolismo mitocondrial. Este metabolito amarillo una vez que ingresa a la célula viable es reducido mediante este metabolismo, formando una especie insoluble púrpura denominada formazán. La mayor cantidad de

⁹³ Buzea, C., I. I. Pacheco-Blandino and K. Robbie (2007). "Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity." *Biointerphases* **2**(4): MR17-MR71.

⁹⁴ Kim, S., J. E. Choi, J. Choi, K.-H. Chung, K. Park, J. Yi and D.-Y. Ryu (2009). "Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells." *Toxicol In Vitro* **23**(6): 1076-1084.

formazán, se producirá en células que tengan el mayor metabolismo mitocondrial. Es decir, que se puede relacionar la concentración de formazán, con el número de células viables en el cultivo ensayado. Luego de que el formazán producido, es solubilizado, se puede cuantificar sin problema utilizando un lector convencional a 570 nm de longitud de onda⁹⁵.

Otro método utilizado también para evaluar exclusivamente la viabilidad celular es empleando un colorante denominado “Azul de Tripan”, el cual es de carácter aniónico, perteneciente al grupo de los colorantes azoicos y es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan ruptura en la membrana, coloreando éstas⁹⁶.

En la siguiente tabla se muestran otros ensayos para la evaluación de la toxicidad *in vitro*⁹⁷.

Tabla 6. Ensayos para evaluar la citotoxicidad *in vitro* en líneas celulares.

Evaluación	Ensayo
Citotoxicidad	Azul de Tripan
	MTT
	Cuantificación de GSH
	Clonogénico (CFE)
	LDH
	Túnel
	Técnica Apostan Anexina V
	Lipoperoxidación (TBARS)

⁹⁵ Marambio-Retamal, H. P. (2007). Evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas de oro conjugadas al péptido CLPFFD-NH₂. Tesis Doctoral Universidad de Chile

⁹⁶ Strober, W. (2001). "Trypan blue exclusion test of cell viability." Curr Protoc Immunol Appendix 3: Appendix 3B.

⁹⁷ Hillegass, J. M., A. Shukla, S. A. Lathrop, M. B. MacPherson, N. K. Fukagawa and B. T. Mossman (2010). "Assessing nanotoxicity in cells *in vitro*." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 2(3): 219-231.

II. ESTADO DEL ARTE

Desde un punto de vista biofarmacéutico, el desafío más importante para los grupos de investigación farmacéutica es optimizar los regímenes terapéuticos de principios activos con baja biodisponibilidad. Una pobre biodisponibilidad se traduce como baja eficacia y alta variabilidad intra e inter individuo, obligando al formulador a seleccionar incómodas vías de administración, o en su defecto incrementar la dosis para alcanzar niveles terapéuticamente efectivos.

La interacción entre la nanotecnología, la medicina y la medicina veterinaria constituye una oportunidad para llevar a cabo nuevos tratamientos o mejorar los ya existentes.

Recientemente, la nanotecnología está revolucionando la medicina, particularmente el campo de diagnóstico a través de técnicas de imagen y administración y direccionamiento de fármacos. Puesto que las plataformas nanotecnológicas han mostrado resultados eficaces y científicamente validados, éstos ya se han extendido hacia el campo de la medicina veterinaria con grandes promesas.

Aproximadamente 95% del total de agentes terapéuticamente potenciales se caracterizan por presentar pobre biodisponibilidad⁹⁸. En este sentido, las plataformas nanotecnológicas son diseñadas para superar estos problemas y por lo tanto mejorar el índice terapéutico y perfil de seguridad de las sustancias. En diversos estudios, específicamente las nanopartículas han mostrado gran eficacia para dirigir la administración de agentes antineoplásicos⁹⁹, antimicrobianos¹⁰⁰, analgésicos¹⁰¹ y agentes antiinflamatorios¹⁰². En la

⁹⁸ Brayden, D. J. (2003). "Controlled release technologies for drug delivery." *Drug Discovery Today* **8**(21): 976-978.

⁹⁹ Hofheinz, R. D., S. U. Gnad-Vogt, U. Beyer and A. Hochhaus (2005). "Liposomal encapsulated anti-cancer drugs." *Anticancer Drugs* **16**(7): 691-707.

¹⁰⁰ Cordeiro, C., D. J. Wisemand, P. Lutwyche, M. Uh, J. C. Evans, B. Finlay and M. S. Webb (2000). "Antibacterial efficacy of gentamicin encapsulated in pH-sensitive liposomes against an in vivo Salmonella enterica serovar typhimurium intracellular infection model." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(3).

¹⁰¹ Rose, J. S., J. M. Neal and D. J. Kopacz (2005). *Extended-duration analgesia : Update on microspheres and liposomes*. Philadelphia, PA, ETATS-UNIS, Elsevier.

actualidad hay más de 200 sistemas nanoparticulados para el suministro de fármacos y con al menos 30 productos terapéuticos basados en nanopartículas aprobados para uso clínico en seres humanos y un número similar en ensayos clínicos¹⁰³. Muchas de estas formulaciones ya están disponibles en el mercado veterinario pero con un costo relativamente más alto, sin embargo cada vez se hacen más accesibles para su aplicación en esta área.

Las plataformas nanotecnológicas mejoran el índice terapéutico de los agentes terapéuticos que llevan. En primer lugar, éstas son capaces de llevar fármacos insolubles e inestables; en segundo lugar, son capaces de incrementar las concentraciones de fármaco en el sitio de acción, dando lugar a un aumento en la eficacia; en tercer lugar, la acumulación en sitios preferentes debido a su *targeting* ayuda a reducir la toxicidad sistémica y la concentración del fármaco en tejidos sanos; y en cuarto lugar, la baja depuración de estos sistemas en comparación con solamente el fármaco proporciona un método de liberación sostenida durante un periodo de días e incluso semanas¹⁰⁴. Como consecuencia de estos mecanismos, las formulaciones de nanopartículas requieren de una dosis reducida en comparación con las formulaciones convencionales.

Una vez que las nanopartículas están en el sitio diana, el siguiente paso es la liberación del fármaco. Pueden ocurrir una gran variedad de mecanismos de liberación del fármaco desde un sistema nanoparticulado y esto depende de las propiedades y características de la

¹⁰² Metselaar, J. M., M. H. Wauben, J. P. Wagenaar-Hilbers, O. C. Boerman and G. Storm (2003). "Complete remission of experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes." Arthritis Rheum **48**(7): 2059-2066.

¹⁰³ Wagner, V., A. Dullaart, A.-K. Bock and A. Zweck (2006). "The emerging nanomedicine landscape." Nat Biotechnol **24**(10): 1211-1217.

¹⁰⁴ Fahmy, T. M., R. M. Samstein, C. C. Harness and W. M. Saltzman (2005). "Surface modification of biodegradable polyesters with fatty acid conjugates for improved drug targeting." Biomaterials **26**(28): 5727-5736.

superficie de éstos¹⁰⁵. Dentro de los posibles mecanismos de liberación de fármacos se encuentran^{106 107}:

1. Desintegración de la nanopartícula o degradación enzimática.
2. Liberación del fármaco adsorbido en la superficie de la nanopartícula y difusión a través de la nanopartícula.
3. Fusión de las nanopartículas con la membrana de las células y su posterior liberación del fármaco en el interior.
4. Endocitosis de la nanopartícula con la posterior liberación del fármaco en el retículo endoplasmático.
5. Liberación del fármaco desencadenada debida a un factor fisiológico, como por ejemplo el cambio en la temperatura o pH.
6. Combinación de los mecanismos de liberación anteriores.

Aunque todavía hay grande áreas de la nanotecnología sin explorar en el campo de la medicina veterinaria, un gran número de estudios han evaluado el uso de formulaciones de nanopartículas en este campo (**Tabla 7**). Además de los que se muestran en la **Tabla 7**, muchos otros agentes terapéuticos basados en nanopartículas se han estudiado en especies veterinarias en los estudios preclínicos de productos farmacéuticos destinados para uso en humanos. Algunos de estos fármacos también tienen potencial aplicación en el campo de la medicina veterinaria particularmente fármacos antiinflamatorios, analgésicos y anticancerígenos para el uso en pequeñas especies, específicamente¹⁰⁸.

¹⁰⁵ Georgieva, J. V., D. Kalicharan, P.-O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler, D. Hoekstra and I. S. Zuhorn (2011). "Surface characteristics of nanoparticles determine their intracellular fate in and processing by human blood-brain barrier endothelial cells *in vitro*." *Mol Ther* **19**(2): 318-325.

¹⁰⁶ Liu, Y., H. Miyoshi and M. Nakamura (2007). "Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles." *Int J Cancer* **120**(12): 2527-2537.

¹⁰⁷ Couvreur, P. and F. Puisieux (1993). "Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins." *Advanced Drug Delivery Reviews* **10**(2-3): 141-162.

¹⁰⁸ Underwood, C. and A. W. Van Eps (2012). "Nanomedicine and veterinary science: the reality and the practicality." *Vet J* **193**(1): 12-23.

Tabla 7. Visión general de algunos de los sistemas de nanopartículas evaluados para la entrega de medicamentos y vacunas para uso veterinario. Cada uno de los nanosistemas fue evaluado en la especie de destino¹⁰⁹.

Especie	Plataforma Nanotecnológica	Agente Terapéutico	Enfermedad	Vía administración	
Gatos	Emulsión	Propofol	Anestesia	IV	
	Liposomas	Muramil Tripéptido	Adenocarcinoma mamario	IV	
	Liposomas	Fotosensibilizadores	Carcinoma de células escamosas	IV	
	Liposomas	IL-2 DNA	Retinitis crónica	Intraperitoneal	
	Liposomas	99 m-Tecnecio	Imágenes de sarcomas	IV	
	Liposomas	Doxorrubicina	Sarcoma de tejidos blandos	IV	
	Liposomas	Ribavirina	Peritonitis infecciosa felina	PO, IM, IV	
	Nanopartículas magnéticas	Granulocitos - Macrófagos	Fibrosarcoma	Intratumoral	
Perros	Emulsión	Ciclosporina	Inmunosupresores para prevenir el rechazo de transplantes	PO	
	Liposomas	Hidromorfina	Analgésico	SC	
	Liposomas	Clodronato	Histiocitosis maligna	IV	
	Liposomas	Trifluralin	Leishmaniosis	IV	
	Liposomas	Antimoniato de meglumina	Leishmaniosis	IV	
	Liposomas	IL-2 DNA	Osteosarcoma de pulmón	IV	
	Liposomas	DNA	Hemangiosarcoma	Intraperitoneal	
	Liposomas	Clodronato	Anemia hemolítica inmune mediada	IV	
	Liposomas	Doxorrubicina	Tumores en caninos	IV	
	Liposomas	DNA Endostatina	Sarcoma de tejidos blandos	IV	
	Liposomas	Inmunoterapia	Dermatitis atópica	Intradérmica	
	Liposomas	Cisplatino	Varios tumores y osteosarcoma	IV	
	Liposomas	IL-2	Neoplasia pulmonar	Inhalada	
	Liposomas	Anfotericina B	Blastomycosis	IV	
	Liposomas	Anfotericina B	Leishmaniosis	IV	
	Liposomas	Muramil Tripéptido	Melanoma oral	IV	
	Liposomas	Muramil Tripéptido	Osteosarcoma	IV	
	Liposomas	Muramil Tripéptido	Hemangiosarcoma esplénico	IV	
	Cerdos	Dendrimeros	Vacuna contra fiebre aftosa	Fiebre aftosa	IM
		Liposomas	α -Tocoferol	Suplemento de vitamina E	PO
Cromo nanocompuesto		Cromo	Suplementación de cromo	PO	
Nanopartículas poliméricas		Vacuna contra fimbrias de E. Coli	E. Coli	PO	

¹⁰⁹ Underwood, C. and A. W. Van Eps (2012). "Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality." *The Veterinary Journal* **193**(1): 12-23.

Tabla 7. Continuación.

Ganado	Liposomas	Estreptomicina	Brucelosis	Intramamaria
	Liposomas	Gentamicina	Mastitis S. Aureus	Intramamaria
	Liposomas	Adriamicina	Leucemia	IV
	Niosomas	Flurbiprofen	Analgésico	IV
	Ring shaped	Sincitial respiratorio humano	Enfermedades respiratorias de bovinos	Intranasal
	Nanopartículas	Nucleoproteína de virus	virus sincitial	IM
	Liposomas	Diclofenaco	Analgésico-Antiinflamatorio	Transdérmica
Caballos	Liposomas	99 m-Tecnecio	Imágenes	IV
	Liposomas	DNA	Transfección de espermatozoides en equinos	N/A
	Liposomas	Diamidina	Tratamiento de la babesiosis	IM
	Microemulsión Micelar	Propofol	Anestesia	IV
	Micelas	Ivermectina	Strongylus vulgaris	IM
	Nanoesferas poliméricas	Antígeno Streptococcus Equi	Vacuna	Intranasal
	Nanopartículas	Péptidos Rhodococcus Equi	Vacuna contra la neumonía R. Equi	IM
	Liposomas	Antígeno Toxoplasma gondii	Vacuna contra T. gondii	IM
Ovejas	Liposomas	Virus de la leucemia bovina	Vacuna contra el virus de la leucemia bovina	IM
	Liposomas	Antígeno de estafilococos	Vacuna contra la mastitis estafilocócica	IM
	Nanoperlas de poliestireno	Ovoalbúmina	Evaluación de nanoperlas como coadyuvantes	SC, IM, Intradérmica
	Nanoperlas de poliestireno	Fiebre Aftosa	Vacuna contra la Fiebre Aftosa	Intradérmica
	Micelas	Antígeno Fh 12 de Fasciola hepática	F. hepática	SC
	Nanoesferas de quitosán-DNA	Vacuna contra la enfermedad de Newcastle y el gen de IL-2	Vacuna contra la enfermedad de Newcastle	IM
Aves	Liposomas	Butorfanol	Artritis en loros y cotorras	SC
	Liposomas	Vacuna contra la E. Coli patógena aviar	Vacuna contra la colibacilosis aviar	Intraocular
	Liposomas	Antígenos fimbriales SEF14 y SEF21	Vacuna contra Salmonella enteritidis	Intraocular / Nebulizaciones
	Liposomas	Vacuna de DNA	Virus de la enfermedad de Newcastle y vacuna contra el virus de la bursitis infecciosa	Transdérmica
	Liposomas		Vacuna contra M. gallisepticum	SC
	Micelas		Virus de la enfermedad de Newcastle	PO
	Nanopartículas poliméricas		Vacuna contra Chlamydochila psittaci	Nebulizaciones
	Nanopartículas de quitosán	Cobre	Suplementación de cobre	PO

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en la literatura se reporta que más del 40% de fármacos se caracterizan por presentar una reducida solubilidad y/o permeabilidad y por lo tanto una pobre biodisponibilidad. Generalmente, se trata de fármacos clase II y IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica¹¹⁰.

Las propiedades físico-químicas de los principios activos son características determinantes en el desarrollo farmacéutico y además pueden condicionar su eficacia terapéutica en la formulación. Ejemplo de esto es la baja solubilidad en agua de muchos principios activos misma que dificulta su formulación requiriendo en ocasiones el uso de excipientes que pueden causar efectos secundarios serios así como complicaciones en el tratamiento. Por otro lado, las moléculas hidrofílicas y de gran tamaño presentan dificultades en su paso a través de las barreras biológicas y ven comprometida su estabilidad por la degradación debida a los mecanismos de defensa del organismo. Estas dificultades han de ser solventadas para lograr que las moléculas activas accedan al sitio diana y consigan de este modo una terapia efectiva y específica¹¹¹.

La incorporación de ingredientes activos en sistemas de tamaño nanométrico ha ayudado a mejorar las limitaciones de formulación que presentan estas moléculas, incrementando adicionalmente su potencial terapéutico. Mejoras en la solubilidad, protección frente a la degradación o mayor penetración epitelial o celular de los ingredientes activos son algunas de las ventajas que ofrece la asociación en nanosistemas de moléculas activas.

Es también conocido que la capacidad de estos sistemas para atravesar las barreras externas y acceder al interior del organismo depende tanto de su tamaño como de su composición,

¹¹⁰ Yu, L. X., G. L. Amidon, J. E. Polli, H. Zhao, M. U. Mehta, D. P. Conner, V. P. Shah, L. J. Lesko, M. L. Chen, V. H. Lee and A. S. Hussain (2002). "Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions." *Pharm Res* **19**(7): 921-925.

¹¹¹ Alonso, M. J., D. Torres and V. Lozano (2010). Nanocapsulas de Poliarginina Sector de la Técnica. U. D. S. D. Compostela. España.

siendo factor preponderante la naturaleza de la superficie. En este sentido, partículas de pequeño tamaño (>200 nm) aumentarán el grado de transporte respecto a las de un mayor tamaño (<1000nm). Si se elaboran a partir de polímeros de origen natural, estos los hacen sistemas biocompatibles y biodegradables¹¹².

La elevada lipofilia de la curcumina le permite una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva, sin embargo, la solubilidad constituye el paso limitante para llevar a cabo este proceso, por lo que el uso de plataformas nanotecnológicas, especialmente nanocápsulas con núcleo oleoso han demostrado aumentar considerablemente la solubilización del activo y podrían vehiculizarlo hacia sitios específicos, a una velocidad y régimen de dosificación óptimos, y así poder evitar o minimizar los efectos adversos debido al tratamiento, facilitar su absorción y aumentar la biodisponibilidad por diferentes mecanismos, entre los que destaca la mucoadhesividad de estos nanosistemas en el tracto gastrointestinal¹¹³.

Así pues, existe la necesidad creciente de proporcionar sistemas de liberación de ingredientes activos alternativos a los existentes en la actualidad. Particularmente, sería conveniente disponer de plataformas nanotecnológicas estables y aptas para la encapsulación de moléculas de distinta solubilidad ya que estas presentan buenas propiedades de adsorción e internalización en las superficies biológicas dadas sus características.

¹¹² Mundargi, R. C., V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel and T. M. Aminabhavi (2008). "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives." *J Control Release* **125**(3): 193-209.

¹¹³ Yliperttula, M. and A. Urtti (2009). Nanotechnology for Improved Drug Bioavailability. *Drug Bioavailability*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 597-611.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una formulación consistente en nanocápsulas poliméricas conteniendo curcumina a partir de las interacciones que se llevan a cabo entre los componentes que conforman éstas para liberar el activo en forma controlada al ser administrados en pacientes veterinarios.

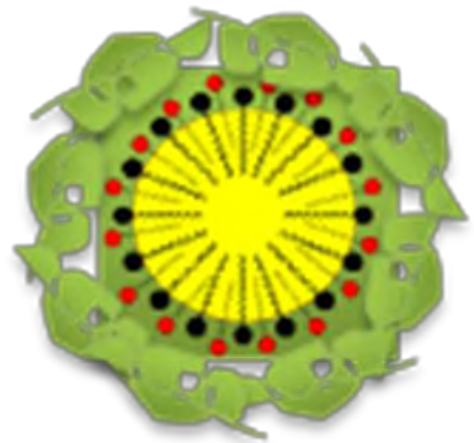
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar un sistema innovador para la administración de curcumina por vía oral a partir de plataformas nanotecnológicas, específicamente nanocápsulas poliméricas de núcleo oleoso.
- Caracterizar desde el punto de vista fisicoquímico los sistemas obtenidos en cuanto a tamaño, carga superficial, morfología, eficiencia de encapsulación y estabilidad.
- Optimizar la formulación propuesta mediante el uso de un diseño experimental variando los componentes y las condiciones de fabricación.
- Realizar estudios de liberación *in vitro* de curcumina a partir de las plataformas nanotecnológicas obtenidas utilizando una celda de diálisis en el aparato IV USP de disolución (Dialysis Adapter).

- Establecer el mecanismo de liberación de las nanocápsulas de curcumina utilizando los perfiles de disolución obtenidos en el aparato IV USP – Dialysis Adapter.
- Evaluar la capacidad citotóxica *in vitro* de las plataformas nanotecnológicas obtenidas ante la presencia de concentraciones crecientes de las mismas, con el fin de evaluar la viabilidad celular por medio del método de tinción de exclusión con azul de tripan en células Caco-2.
- Evaluar el efecto de las plataformas nanotecnológicas desarrolladas sobre la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y la permeabilidad aparente a partir de monocapas celulares Caco-2.

Los motivos por los que se plantean los objetivos anteriores son para obtener un prototipo de nanocápsulas poliméricas con núcleo oleoso cargadas de curcumina con las siguientes características:

- Estables en el pH del tracto GI de diferentes especies animales.
- Estable a enzimas presentes en diferentes especies animales.
- Buena estabilidad a condiciones de almacenamiento.
- Tamaño de partícula < 200 nm.
- Buena eficacia de encapsulación de curcumina.
- Orientación selectiva a un sitio de acción (teoría).



V. HIPÓTESIS

El diseño y desarrollo de nuevos sistemas nanocapsulares constituidos por un núcleo oleoso y una cubierta polimérica de quitosán y alginato serán capaces de ofrecer a la curcumina propiedades de larga permanencia plasmática debido a sus características fisicoquímicas, así como la propiedad de encapsular eficientemente este activo dado su carácter hidrofóbico y protegerlo de las condiciones del tracto gastrointestinal, pudiendo constituir nanovehículos que permitan aumentar la permeabilidad de la curcumina en comparación con simples dispersiones acuosas de la misma después de realizar estudios *in vitro* en células Caco-2, lo cual mejoraría la biodisponibilidad de la curcumina y demostraría el potencial de estos sistemas como promotores de la absorción de fármacos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIALES

Curcumina (Sigma-Aldrich®), México), Poloxamer 188 (Pluronic® F68, Sigma Chemical CO., US), Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, Sigma, Francia), Cloruro de potasio (KCl, Fisher Scientific, Reino unido), Alginato de Sodio (Manucol® DH, ISP, Alemania) y Quitosán (PM: 600 000 – 800 000, Acros Organics, US) como polímeros. Vitamina E (α -Tecoferol, Sigma Aldrich, Suiza), Cremophor® EL (BASF, Alemania), Polisorbato 80 (Acros Organics, US), Ácido acético (CH₃COOH, Sigma-Aldrich, Alemania), Ácido Clorhídrico (HCl \approx 36%) Etanol, Acetona, Acetonitrilo y Agua grado HPLC (Fisher Chemical, Reino Unido).

6.2. PREPARACIÓN DE NANOCÁPSULAS CON CUBIERTA POLIMÉRICA DE MANUCOL (NC-ALG)

Las nanocápsulas con cubierta polimérica de Alginato (Manucol® específicamente) se prepararon utilizando una modificación de la técnica de desplazamiento de solvente descrita por G. Rivera (2012). Esta modificación en la técnica se le conoce como “Procedimiento de una sola etapa” y se basa en la interacción iónica dipolar entre el polímero ALG disuelto en una fase acuosa y el tensoactivo catiónico (CTAB) que se encuentra en la fase orgánica, la cual contiene también el aceite (Vitamina E). La fase orgánica se formó disolviendo 0.005g del tensoactivo catiónico y 0.005g de Curcumina en 800 μ L de Etanol, seguido de la adición de 100 μ L de Aceite, 60 μ L de Cremophor® EL y 5 mL de acetona. Esta fase orgánica se vertió inmediatamente sobre 20 mL de solución de Poloxamer 188 (0.060 g) y ALG (0.030 g). Cuando el ALG interactúa con el tensoactivo

catiónico, se forma una cubierta polimérica en la interfase aceite/agua, formando así las nanocápsulas de Alginato (NC-ALG). Finalmente, los disolventes se eliminan de la nanosuspensión bajo vacío hasta obtener un volumen final de 20 mL.

6.3. PREPARACIÓN DE NANOCÁPSULAS CON CUBIERTA POLIMÉRICA DE QUITOSÁN (NC-Q)

Las nanocápsulas con cubierta polimérica de quitosán se prepararon a partir de la técnica mencionada con anterioridad. Esta modificación en la técnica se basa en las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que se llevan a cabo entre el quitosán disuelto en una fase acuosa ácida y los núcleos lipídicos de Vitamina E formados en la fase orgánica. La fase orgánica se formó disolviendo 0.005g de Curcumina en 800 μ L de Etanol, seguido de la adición de 100 μ L de Aceite E, 60 μ L de Cremophor[®] EL y 5 mL de cetona. Esta fase orgánica se vertió inmediatamente en 20 mL de una solución polimérica de quitosán (0.025 g) con un 5% de exceso estequiométrico de ácido acético y Poloxamer 188 (0.060 g) (*Ver Anexo 1*). A partir de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que se llevan a cabo entre la interfase aceite/agua, se forma una cubierta polimérica, obteniéndose así las nanocápsulas de Quitosán (NC-Q). Finalmente, los disolventes se eliminan de la nanosuspensión bajo vacío hasta obtener un volumen final de 20 mL.

6.4. OPTIMIZACIÓN DEL TIPO DE ACEITE

Los criterios para la selección del mejor aceite son la baja toxicidad, baja solubilidad del polímero en el aceite y la ausencia de degradación del polímero (Limayem Blouza, Charcosset et al. 2006).

Además, en el caso de la curcumina que es una sustancia altamente lipofílica, ésta debe tener la más alta solubilidad posible en el aceite elegido con el fin de formar nanocápsulas y no nanoesferas. Se hace hincapié en que los diferentes tipos de triglicéridos cáprico/caprílico se utilizan a menudo debido a su amplia gama de solubilidad para sustancia altamente lipofílicas. Aunque otros aceites como el aceite de semilla de girasol, aceite de soya, aceite de castor, aceite de trigo, aceite de coco, aceite de sésamo, aceite de semilla de uva, aceite de oliva e incluso la vitamina E que no son usados con frecuencia, pueden dar buenos resultados (Pawar, Purohit et al. 2012), (Mora-Huertas, Fessi et al. 2010).

Se probaron 4 tipos de aceites: aceite de castor, aceite de sésamo, aceite de trigo y Miglyol[®] 812 N; así como la Vitamina E (α -Tocoferol). Las nanocápsulas se prepararon como se describió anteriormente. Todos los demás componentes de la formulación se mantuvieron constantes: 100 μ L del aceite, 60 μ L de Cremophor[®] EL, 25 mg de quitosán, 5 mL de acetona y 20 mL de agua.

6.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los experimentos fueron realizados por el método de nanoprecipitación utilizando un diseño de “Superficie de Respuesta compuesto reducido de Draperlyn (Rotable y Ortogonal) optimizado” con 5 factores, cada uno con cinco niveles. En la **Tabla 8** se especifican los factores implicados en dicho diseño con sus niveles respectivos indicando su correspondencia en escala adimensional (-1.86, -1, 0, +1, +1.86). Para llevar a cabo este diseño de experimentos se utilizó el software Statgraphics Centurion XV con niveles de significancia $p < 0.05$.

Tabla 8. Factores considerados en el diseño de superficie de respuesta para las formulaciones de nanocapsulas.

FACTOR DE ESTUDIO	FUNCIÓN EN LA FORMULACIÓN	NIVELES DEL FACTOR				
		-1.86	-1	0	1	1.86
A: Cremophor® EL (µL)	Surfactante no iónico	2.78	20	40	60	77.22
B: CTAB (mg)	Surfactante catiónico y conservador	0.69	5	10	15	19.31
C: Etanol (µL)	Agente solubilizante	0	200	500	800	1058.36
D: Poloxamer 188 (mg)	Copolímero y estabilizante	2.78	20	40	60	77.22
E: Vitamina E (µL)	Aceite	13.88	100	200	300	386.12

Las variables de respuesta de interés fueron el tamaño de partícula, el índice de polidispersión (PDI) y el potencial Z. El diseño constó de un total de 21 formulaciones de nanocápsulas cargadas con curcumina (**Tabla 9**).

Tabla 9. Matriz experimental del diseño de Superficie de Respuesta compuesto reducido de Draperlyn (Rotable y Ortogonal) optimizado.

FORMULACIÓN	*A (µl)	*B (mg)	*C (µl)	*D (mg)	*E (µl)
1	-1	1	1	1	1
2	-1	1	-1	1	1
3	1	-1	1	1	-1
4	1	1	-1	1	-1
5	0	0	0	1.86	0
6	0	0	-1.86	0	0
7	1.86	0	0	0	0
8	-1.86	0	0	0	0
9	1	1	1	-1	-1
10	1	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	1	1
12	0	0	0	0	1.86
13	0	0	0	-1.86	0
14	0	1.86	0	0	0
15	-1	-1	1	-1	1
16	0	0	1.86	0	0

Tabla 9. Continuación.

FORMULACIÓN	*A (μl)	*B (mg)	*C (μl)	*D (mg)	*E (μl)
17	-1	-1	-1	1	-1
18	1	-1	-1	-1	1
19	-1	-1.86	0	0	0
20	-1	-1	-1	-1	-1
21	-1	1	1	-1	-1

*A: Cremophor® EL, *B: CTAB, *C: Etanol, *D: Poloxamer 188 y *E: Vitamina E.

6.6. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE NC-ALG Y NC-Q

NC-Q y NC-ALG se caracterizaron en relación al tamaño, potencial zeta y morfología. El tamaño de partícula y el índice de polidispersión (PDI) se determinaron por espectroscopia de correlación de fotones (PCS) después de que los sistemas se diluyeran con agua destilada. Este análisis, se llevó a cabo a 25°C con una detección de ángulo de 173°. Los valores del potencial zeta se obtuvieron a partir de los valores medidos de movilidad electroforética, según lo determinado por la anemometría de láser Doppler (LDA). El PCS y el análisis de LDA se realizaron por triplicado usando un NanoZS[®], (Malvern Instruments, Reino Unido).

La morfología de las nanocápsulas fue estudiada por Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).

6.7. OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE POLÍMERO

Las nanocápsulas cargadas con curcumina fueron preparadas utilizando Alginato (Manucol[®]) y Quitosán de bajo peso molecular respectivamente como componentes formadores de la cubierta polimérica.

Así que, para determinar la cantidad adecuada de polímero para la obtención de NC-Q y NC-ALG se probaron diferentes concentraciones de Quitosán (1.0, 1.25, 1.50, 1.75 mg/mL) y Alginato (1.25, 1.50, 1.75 y 2.0 mg/mL). Todos los demás constituyentes de la formulación se mantuvieron sin cambios.

6.8. EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN DE CURCUMINA Y pH DE LAS FORMULACIONES

La cuantificación de curcumina se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Merck-Hitachi, Japón). El sistema constaba de una bomba, un detector DAD, un autoinyector y una columna RP Hypersil® Division C8 (150 x 3 mm de diámetro interior, 5 µm, ThermoQuest, Hemel Hempstead, Inglaterra). El volumen de inyección de las muestras fue de 80 µL. La fase móvil constó de una mezcla 55% H₂O y 45% Acetonitrilo a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La curcumina fue detectada a una longitud de onda de 425 nm. La cantidad total de curcumina se determinó después de la disolución de 1 mL de formulación de nanocápsulas en 10 mL de acetonitrilo. Esta solución fue centrifugada a 15000 rpm durante 10 min, posteriormente se tomó una alícuota del sobrenadante y se diluyó con fase móvil. Las muestras se filtraron (Millipore 0.45 µm) y se inyectaron en el HPLC-DAD. La eficacia de encapsulación de la curcumina se determinó por Centrifugación-Filtración. Se diluyó 1 mL de formulación de nanocápsulas en 4 mL de HCl (0.1N, pH=1.2) y se centrifugaron las muestras a 15000 rpm por 20 min (Centrifuga 2-16P, SIGMA, Fisher Bioblock Scientific, Alemania). Después, se recolectó una alícuota de 1 mL del sobrenadante y se diluyó nuevamente con 4 mL de HCl 0.1N. Esta última dilución de la formulación de nanocápsulas se filtró dos veces (Millipore 0.2 y 0.1 µm), se recolectó una alícuota de 2 mL del último filtrado (Millipore 0.1 µm) y se diluyó con 5 mL de la fase móvil. La solución se analizó en el HPLC-DAD. La curcumina encapsulada en las nanoestructuras se calculó indirectamente por la diferencia entre la cantidad total de

curcumina en la formulación y la cantidad de curcumina libre medida después de la filtración (curcumina no encapsulada).

La eficacia de encapsulación (E.E.) fue calculada como se muestra a continuación:

$$E.E. (\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Donde “A” es la concentración total de curcumina en la formulación y “B” es la concentración de curcumina libre medida en el medio externo acuoso, correspondiente a la curcumina no encapsulada.

Las mediciones de pH se determinaron directamente sobre las formulaciones utilizando un potenciómetro calibrado (InoLab pH Level 2, Alemania).

6.9. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

La estabilidad de las NC-Q y NC-ALG cargadas con curcumina se evaluó bajo condiciones de almacenamiento a 4°C durante 3 meses. Los parámetros evaluados fueron: (1) Aspecto físico (presencia de agregados y cambios en la coloración) y (2) Tamaño de partícula, Potencial Zeta e Índice de Polidispersión (PDI). Todas estas determinaciones se realizaron como se describieron anteriormente.

6.10. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE CURCUMINA *IN VITRO*

6.10.1. DISEÑO DEL ADAPTADOR DE DIALYSIS (“DIALYSIS ADAPTER”) PARA EL APARATO IV USP

Un novedoso sistema de diálisis “*Dialysis Adapter*” diseñado para el aparato IV USP se utilizó en conjunto con celda de 22.6 mm de diámetro para llevar a cabo los estudios de liberación. En la **Figura 17** muestra el esquema del diseño del sistema de diálisis y el montaje del sistema de diálisis en el aparato IV USP de disolución. El diseño del adaptador de diálisis era en forma de un cilindro hueco, constituido por una base superior y una inferior. Sobre el adaptador se colocó una membrana de diálisis (Spectra/Por®, 25 kDa, Spectrum Laboratories, USA). Este adaptador con la membrana de diálisis se colocó en el interior de las celdas en posición vertical.

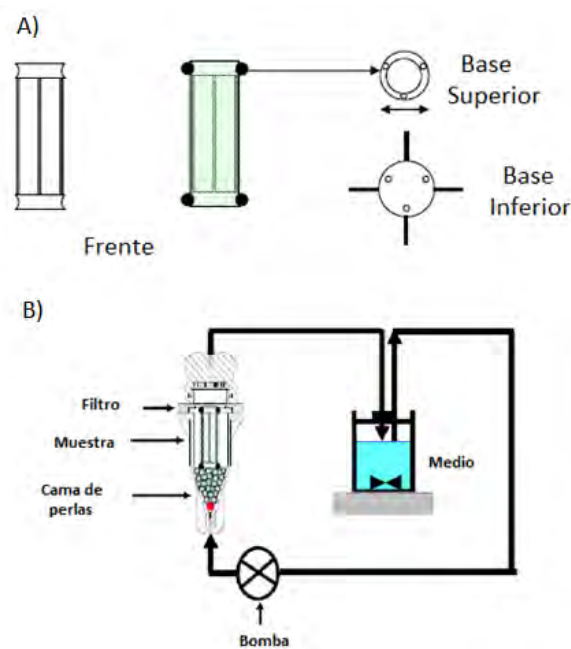


Figura 17. Accesorios para llevar a cabo los estudios de liberación de fármacos utilizando el aparato IV USP - Dialysis Adapter. A: esquema del sistema de diálisis y B: Montaje del sistema de diálisis en el aparato IV USP

6.10.2. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE CURCUMINA *IN VITRO* A PARTIR DE NC-Q Y NC-ALG

Los estudios de liberación se realizaron en el aparato IV USP (SotaxTM CP7) equipado con celda de 22.6 mm de diámetro. En cada celda se colocó una perla de rubí y no se agregaron perlas de vidrio. Se utilizaron filtros de microfibras de vidrio de 0.7 μm (Whatman GF/F). Se colocó \approx 1 mL de las formulaciones en el interior del adaptador de diálisis y se sellaron los sistemas. Para estos estudios se compararon las dos formulaciones de nanocápsulas de curcumina (NC-Q y NC-ALG) obtenidas contra una solución hidro-alcohólica de curcumina (50:50). Como medio de liberación se utilizaron 200 mL de 99.7% de buffer de HCl pH= 1.2 con 0.3% de Tween 80. El estudio se realizó en un sistema cerrado a una temperatura de 37.0 ± 0.5 ° C y una velocidad de flujo de 24 mL/min. A determinado tiempo, se tomaron 2 mL de muestra (Sin reemplazo de medio), se filtraron (Millipore 0.45 μm) y se determinó directamente la cantidad de curcumina liberada por medio de HPLC-DAD a 425 nm (ver arriba). Se mantuvieron condiciones Sink durante el estudio. Los resultados fueron expresados en términos de porcentaje promedio disuelto de curcumina \pm SD (n = 3).

6.11. CULTIVO CELULAR

6.11.1. MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS

Las células Caco-2 provienen de la American Type Culture Collection (ATCC, VA, EU). Se cultivaron en botellas de 75 cm² en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco-Invitrogen, Fisher, Illkirch, Francia), fueron suplementadas con 15% de Suero bovino fetal (SVF – Gibco-Invitrogen, Fisher, Illkirch Francia), 1% (v/v) de una mezcla de antibióticos (10000 U/mL penicilina G, 10 mg/mL

estreptomicina y 25 µg/mL anfotericina B - Gibco-Invitrogen, Fisher, Illkirch, France) y 1% de aminoácidos no esenciales (glicina 750 mg/L, L-alanina 890 mg/L, L- asparagina 1320 mg/L, L-ácido aspártico 1330 mg/L, L-ácido glutámico 1470 mg/L, L-prolina 1150 mg/L y L-serina 1050 mg/L) (Hyclone®, Thermo Scientific, Illkirch, Francia).

Las células se mantuvieron en una incubadora (Hera Cell 150, Kendro®, Langenselbold, Alemania) a 37 ° C bajo una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Alcanzada una confluencia celular de 80% (3-4 días después del cultivo en botella), se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con 10 mL de buffer de fosfato (PBS, Hyclone®, Thermo Scientific, Illkirch, Francia). Después de eliminar el PBS, se añadió una solución de tripsina (0,25%, 0,5 mL, Gibco-Invitrogen, Fisher, Illkirch, France) que contiene también 0.02% de EDTA (v/v) y se incubaron por 5 min a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de medio DMEM y se resuspendieron las células; se tomó una alícuota de 100 µL y se hizo un recuento celular usando una celda de Kova (Hycor® biomedical, Californie, EU). El resto de la suspensión celular fue centrifugada durante 10 min a 220 g a temperatura ambiente (Sigma, Osterode am Harz, Alemania) y el sedimento celular se resuspendió en 10 mL de DMEM. Un volumen de suspensión celular suficiente fue sembrado en botellas nuevas de 75 cm² para obtener una concentración de 2.25 X 10⁶ células/L y se ajustó el volumen a 15 mL. El medio de cultivo se reemplazó con DMEM fresco cada tercer día (**Figura 18**).

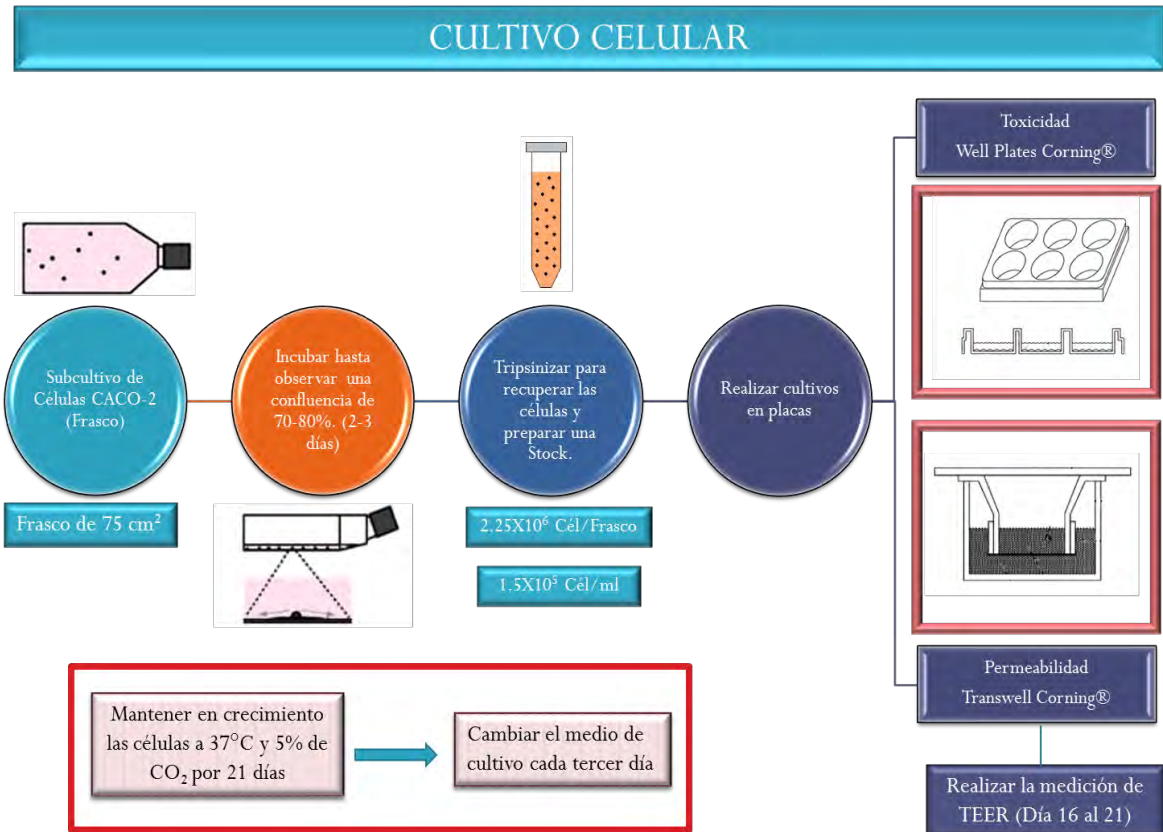


Figura 18. Descripción del mantenimiento de las células Caco-2 hasta el cultivo en placas para realizar estudios de toxicidad y permeabilidad.

6.11.2. DIFERENCIACIÓN CELULAR

De acuerdo al protocolo seguido en el laboratorio ERT CIDAM, entre el número de pase 16 y 23 las células fueron sembradas en:

- Una razón 5×10^4 células/mL en DMEM en placas de poliestireno de 12 pocillos (3.8 cm², Well Plates Corning®, Kennebunk, EU).

- Una razón de 2×10^4 células/mL en DMEM sobre el compartimiento apical en placas de 12 inserciones (Transwell Corning®, Kennebunk, EU, membrana de poliestireno de $0.4 \mu\text{m}$, superficie de 1.12 cm^2 y un volumen de 0.5 mL en el compartimiento apical y 1.5 mL del compartimiento basolateral).

El medio de cultivo se cambió cada tercer días durante 21 días. Este período de cultivo proporciona la diferenciación celular, el desarrollo de borde en cepillo y la expresión de las enzimas asociadas con este borde. (Pinto *et al.*, 1983; Sambuy *et al.*, 2005).

6.11.3. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE NANOCÁPSULAS DE CURCUMINA

Las formulaciones a base de nanocápsulas de curcumina se diluyeron en DMEM de acuerdo a la **Tabla 10**. Después de la diferenciación (Vigésimo primer día), el medio de cultivo se retiró y se tomó 1 mL de cada formulación y se colocaron en cada uno de los pocillos, cada determinación se realizó por triplicado ($n=3$). Como control negativo se eligió el medio DMEM y como control positivo de la toxicidad se utilizó el tratamiento con etanol. Se dejaron en contacto las formulaciones y controles con las células por 2 horas a 37°C . Después de las 2 h de incubación, los volúmenes de muestras depositados se retiraron y las células se lavan dos veces con 1 mL de PBS. Posteriormente, las células fueron desprendidas de cada pocillo mediante la adición de $100 \mu\text{L}$ de una solución de tripsina (0.25%) y EDTA (0.02%); y se incubaron por 5 min a 37°C . Pasado el tiempo, se adicionaron $900 \mu\text{L}$ de DMEM.

Tabla 10. Dilución de las muestras para la evaluación de toxicidad en células Caco-2.

Nanocápsulas	Conc. Polimérica en la formulación (mg/mL)	Alicuota de Formulación (mL)	Volumen Final (mL)	Conc. Polimérica Final (µg/mL)	Dosis por unidad de superficie (µg/cm ²)
Quitósán + Curcumina y Quitósán*	1.25	0.4	5	100	26.3
		0.8	5	200	52.6
		1.6	5	400	105.3
		2.4	5	600	157.9
Manucol + Curcumina y Manucol*	1.3	0.4	6	100	26.3
		0.8	6	200	52.6
		1.6	6	400	105.3
		2.4	6	600	157.9

**Referido a nanocápsulas poliméricas no cargadas con activo (Curcumina), pero sí con los mismos elementos que las conforman y bajo las mismas condiciones de obtención.*

6.11.4. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD POR EL MÉTODO DE AZUL DE TRIPANO

El Azul tripán (BT, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francia) es un compuesto tóxico que entra en las células y se expulsa a través de transportadores de unión a ATP. Sin embargo, como las células no viables ya no producen ATP, son incapaces de expulsar el azul de tripán y así son teñidas de color azul. (Freshney, 1987). Se colocaron 100 µL de suspensión de células y se añadieron 100 µL de una solución de azul de tripán (0.04%). Se dejó actuar por 5 min y posteriormente se tomaron 10 µL y depositarlos en una celda de Kova para realizar el conteo tanto de células vivas como de células muertas.

6.11.5. INFLUENCIA DE LA NANOCÁPSULAS DE CURCUMINA SOBRE LA PERMEABILIDAD

Para determinar la influencia de los nanosistemas obtenidos sobre la permeabilidad, fueron probadas las siguientes condiciones.

- Azul de Dextran 2 mg/mL (BD, 2000 kDa, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francia), se utilizó como marcador de baja permeabilidad.
- Teofilina 2 mg/mL (THEO, 180 g/mol, Cooper, Melun, Francia), utilizó como marcador de alta permeabilidad.
- Dispersión de curcumina (FC) 247 µg/mL (Sigma-Aldrich®, México).
- Nanocápsulas de curcumina con cubierta polimérica de Quitosán (concentración polimérica de 100 µg/mL y concentración de curcumina de 40 µg/mL)
- Nanocápsulas de curcumina con cubierta polimérica de Manucol (concentración polimérica de 100 µg/mL y concentración de curcumina de 33.33 µg/mL)

Para obtener las condiciones anteriores, las muestras se diluyeron en DMEM de la siguiente manera (**Tabla 11**). Estas muestras se colocaron en el compartimento apical a una razón de 0.5 mL. Cada muestra fue colocada en las inserciones por triplicado (n=3).

Tabla 11. Dilución de las muestras para la evaluación de permeabilidad en células Caco-2.

Muestras	Alícuota (mL)	Volumen Final (mL)	Conc. Activo (µg/mL)	Conc. Polimérica (µg/mL)	Conc. por unidad de superficie (µg/cm ²)
NC-Q	0.8	5	40 ¹	100	44.6 ²
NC-ALG	0.8	6	33.33 ¹	100	44.6 ²
FC	0.8	5	39.52 ¹	-	17.6 ³
Teofilina	3	6	1000	-	446.4 ³
BD	3	6	1000	-	446.4 ³

¹ Concentración de curcumina presente en las formulaciones de nanocápsulas poliméricas y dispersión de curcumina

² Dosis final de polímero por unidad de superficie

³ Dosis final activo de por unidad de superficie

6.11.6. MEDICIÓN DE LA RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL (TEER)

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER) refleja la viabilidad celular y la integridad de la monocapa (Kamm *et al.*, 2000). La TEER se midió utilizando un ohmímetro (EVOM, World Precision Instruments, Sarasota, EU) equipado con un electrodo (STX2, World Precision Instruments, Sarasota, EU). Las mediciones se realizaron al $t=0$ y cada 30 minutos durante 2 horas, una vez colocadas las muestras en el compartimiento basolateral. Antes de cada medición, el electrodo se enjuagó sucesivamente en etanol, PBS y luego en DMEM a 37° C. Cada medición se llevó a cabo tres veces. Al finalizar con la evaluación, se retiró el medio de compartimento apical y basolateral y se realizaron dos lavados con PBS y posteriormente se colocó DMEM fresco y se mantuvieron en incubación. Después de 24 h, se midió de nuevo la TEER.

La TEER se mide en $\Omega \cdot \text{cm}^2$ y se calculó como:

- $\text{TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = (R_{\text{Total}} - R_{\text{Filtro}}) / A$

Donde R_{Total} es la resistencia medida, R_{Filtro} es la resistencia del filtro sin células y A es el área superficial (cm^2).

El porcentaje de variación en la TEER se calculó con la relación del valor obtenido cuando son colocadas las muestras ($t=0$) y la TEER obtenida a los tiempos 30, 60, 90 y 120.

- $\text{TEER } (\%) = (\text{TEER}_{(t)} / \text{TEER}_{(t=0)}) \times 100$

6.11.7. DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD APARENTE

Para evaluar la permeabilidad aparente de los diferentes nanosistemas, se colocaron en el compartimiento apical 0.5 mL de muestra (Las diluciones se realizaron de acuerdo a la **Tabla 11**). Se tomó el volumen total del compartimiento basolateral y se reemplazó con DMEM fresco (37°C). La toma de muestras se realizó cada 30 min durante 2 horas.

La cuantificación de activo que pasó (permeó) del compartimiento apical al basolateral se realizó de la siguiente manera:

- Para la Teofilina y el Azul de Dextran, se determinó por espectrofotometría UV (Jenway 7315, Staffordshire, Inglaterra), a partir del método que se tenía validado en el ERT CIDAM. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 273 nm para Teofilina y 610 nm para Azul de Dextran.
- Para las nanocápsulas poliméricas: se colocó el volumen total del compartimiento basolateral (1.5 mL) en un tubo, se añadieron 1.5 mL de buffer de HCl pH= 1.2 y 6 mL de acetonitrilo. Posteriormente fueron centrifugadas las muestras a 15000 rpm por 20 min, se tomaron 500 μ L del sobrenadante y se llevaron a un volumen de 1000 μ L. La cantidad de curcumina se evaluó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD, MERCK HITACHI, Japón). El volumen de inyección de las muestras fue de 80 μ L y se utilizó una columna RP Hypersil® Division C8 (150 x 3 mm de diámetro interior, 5 μ m, ThermoQuest, Hemel Hempstead, Inglaterra). La fase móvil constó de una mezcla 55% H₂O y 45% Acetonitrilo a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La curcumina fue detectada a una longitud de onda de 425 nm y el tiempo de retención en estas condiciones es de \approx 3.327 min.

El coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) se calculó de la siguiente manera (Malafaya et al., 2007):

- $P_{app} = (dQ/dt) \times (1/AC_0)$

Donde dQ / dt : es el flujo de moléculas a través de la monocapa celular de la cara apical a la cara basolateral, A : es la superficie de la membrana y C_0 , la concentración inicial añadida en el compartimiento apical.

La relación del mejoramiento de la absorción se calculó como:

- $R = P_{app} \text{ (muestra)} / P_{app} \text{ (control)}$

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se describe el desarrollo de dos nanotransportadores con núcleo oleoso rodeado de una cubierta polimérica biodegradable de Quitosán y Manuacol respectivamente, los cuales son llamados NC-Q y NC-ALG, así como su caracterización fisicoquímica, estudios de liberación, estudios de toxicidad y permeabilidad en células Caco-2. Este tipo de nanotransportadores han cobrado gran importancia en los últimos años debido a sus múltiples ventajas, entre las que se encuentran: el aumento en la estabilidad del fármaco encapsulado frente a los medios biológicos y durante el almacenamiento, targeting pasivo o mayor tiempo en circulación sistémica y la mejora de solubilidad de fármacos altamente lipofílicos debido al uso de un núcleo oleoso.

7.1. PREPARACIÓN DE NANOCÁPSULAS

El proceso de preparación de nanocápsulas por el método de nanoprecipitación es aparentemente simple, sin embargo éste puede involucrar un complejo fenómeno hidrodinámico interfacial (Derakhshandeh, Erfan et al. 2007). La adición de una fase acetónica-oleosa en la fase acuosa, resulta en la emulsificación espontánea de la fase oleosa y por lo tanto la formación de nanogotas debido a la inestabilidad interfacial causada por la rápida difusión del solvente orgánico a través de la interfaz y la disminución de la tensión interfacial (Moraes, de Matos et al. 2009). El mecanismo de formación de nanocápsulas se puede explicar en términos de la turbulencia interfacial o agitación espontánea de la interfaz entre dos fases líquidas no balanceadas, que implican procesos de flujo, difusión y superficie (Fessi, Puisieux et al. 1989). La presencia de surfactantes puede marcadamente actuar para suprimir el flujo interfacial y la rápida difusión del solvente orgánico a la fase acuosa. La principal ventaja de los surfactantes durante el proceso de obtención de nanocápsulas es la formación inmediata y reproducible de estos sistemas nanométricos y la

obtención de nanocápsulas monodispersas con una alta capacidad de carga de fármaco (Wehrle, Magenheimer et al. 1995) y (Niwa, Takeuchi et al. 1993).

7.2. OPTIMIZACIÓN DEL TIPO DE ACEITE

Para el desarrollo de la suspensión de nanocápsulas de curcumina, fue necesario seleccionar un aceite adecuado para conformar el núcleo oleoso. El efecto que tiene el tipo de aceite en las nanocápsulas en cuanto a tamaño, índice de polidispersión, potencial Z y agregación se presentan en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Efecto del tipo de aceite sobre el tamaño de partícula, PDI, potencial zeta y presencia de agregación.

SISTEMAS	TIPO DE ACEITE	VISCOSIDAD DINÁMICA MPAS (CP)	DIÁMETRO PROMEDIO (nm) ± SD ^a	PDI	POTENCIAL ZETA (mV) ± SD ^a	AGREGACIÓN
NC-1	Vitamina E	-	116.7 ± 3.2	0.107	24.4 ± 2.1	-
NC-2	Miglyol ®812 N	28-32 ¹	139 ± 7.9	0.149	22.9 ± 2.3	+
NC-3	Aceite de Castor	950-1100 ^{1,2}	162.4 ± 4.2	0.179	23.5 ± 3.2	-
NC-4	Aceite de Trigo	60.9 ³	175.9 ± 13.8	0.156	24.8 ± 2.0	++
NC-5	Aceite de Sésamo	43 ¹	207.6 ± 9.94	0.176	23.9 ± 2.8	++

¹ (Handbook of Pharmaceutical Excipients)

² (Sigma Aldrich®)

³ (Fountain, Jennings et al. 1997)

Se puede observar que las nanocápsulas preparadas con la vitamina E fueron las que presentan mejores características fisicoquímicas, en especial en cuanto a tamaño de partícula e índice de polidispersión se refiere. Se sabe que cuando la viscosidad de un aceite es más alta, entonces incrementa la viscosidad de la fase dispersa (Fase orgánica) y aumenta el tamaño de partícula. Así mismo, el índice de polidispersión se eleva cuando la

viscosidad del aceite incrementa (Khayata, Abdelwahed et al. 2012). La disminución de la viscosidad y la selección de un surfactante adecuado ayuda eficazmente a la disminución de la tensión superficial, lo cual se ve reflejado en la disminución del tamaño de partícula y en la obtención de una distribución unimodal (Park, Balakrishnan et al. 2013). En el caso de las otras formulaciones, no necesariamente se cumple con lo mencionado con anterioridad, puesto que el surfactante utilizado para la preparación de los nanosistemas no tuvo la condición para estabilizar éstos, lo cual también se ve reflejado en la agregación. La mala estabilidad obtenida en los sistemas anteriores está relacionada en su mayoría con el surfactante es decir, la proporción de surfactante dentro de la formulación no es la adecuada o en su defecto, se necesita de la combinación de dos surfactantes o el cambio en su totalidad del surfactante (Jornada, Fiel et al. 2012). Así mismo, el surfactante produce una disminución de la energía libre superficial y hace más fácil el proceso de rompimiento y la disminución del tamaño de partícula cuando se aplica una fuerza mecánica como lo es la agitación (Mason, Wilking et al. 2006).

Las nanocápsulas de curcumina preparadas con vitamina E fueron las que presentaron un tamaño de partícula menor (112.4 ± 2.8 nm), e índice de polidispersión pequeño (0.107). El potencial Z obtenido fue positivo (24.4 ± 2.1) debido a que las nanocápsulas se obtuvieron por el método de desplazamiento de solvente en la cual la cubierta polimérica se formó como consecuencia de las interacciones electroestáticas e hidrofóbicas que se llevan a cabo entre el núcleo lipídico el polímero (Qitosán). Tomando en cuenta la experiencia de diferentes autores, se puede decir que el potencial Z depende principalmente de la naturaleza química del polímero, la naturaleza química del agente estabilizador y el pH del medio (Mora-Huertas, Fessi et al. 2010). Desafortunadamente, en la literatura no se reportan valores específicos de potencial Z. Sin embargo, valores entre ± 20 mV y ± 30 mV son los más reportados lo que permite predecir una buena estabilidad debido a la barrera de alta energía entre las partículas.

Se puede concluir que el uso de las nanocápsulas con núcleo oleoso como transportadores de sustancias activas es una alternativa para mejorar su solubilidad y absorción oral. Así mismo, ayudan a proteger a los fármacos de su degradación, tanto física como química puesto que estos se encuentran encapsulados, llevándose a cabo también una liberación controlada (Dowding, Atkin et al. 2005).

7.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los componentes más importantes en el proceso de producción de nanocápsulas son los tensoactivos, así como el tipo de aceite empleado para la formación del núcleo. Estas variables tienen una marcada influencia en el tamaño de partícula, distribución, estructura y estabilidad de estos nanosistemas (Siqueira-Moura, Primo et al. 2013), (Anton, Benoit et al. 2008). Por lo tanto, por medio de un diseño de “Superficie de Respuesta Optimizado” se evaluó la influencia de cada uno de los componentes que conformaron las nanocápsulas a partir de sus propiedades fisicoquímicas (**Tabla 13**). Los diseños experimentales son una herramienta eficaz que pueden ayudar a indicar cuáles son los principales efectos derivados de los componentes y su proporción en la formulación para ofrecer una prometedora alternativa de transportadores de fármacos nanocapsulares con características apropiadas para ser aplicadas en la terapéutica (Lim and Lee 2008), (Van de Ven, Vermeersch et al. 2011).

Tabla 13. Resultados del diseño experimental.

FORMULACIÓN	*A (μ L)	*B (mg)	*C (μ L)	*D (mg)	*E (μ L)	TAMAÑO PARTÍCULA (nm)	pZ (mV)	PDI
1	-1	1	1	1	1	234 \pm 4.9	57.6 \pm 2.0	0.214
2	-1	1	-1	1	1	263.3 \pm 4.2	57.8 \pm 2.8	0.313
3	1	-1	1	1	-1	112.4 \pm 2.8	46.7 \pm 2.4	0.107
4	1	1	-1	1	-1	108.5 \pm 2.3	48.4 \pm 2.7	0.106
5	0	0	0	1.86	0	176 \pm 2.9	44.6 \pm 2.4	0.044
6	0	0	0.86	0	0	193.1 \pm 2.9	47.3 \pm 2.8	0.094
7	1.86	0	0	0	0	152.5 \pm 3.0	46 \pm 2.2	0.121
8	0.86	0	0	0	0	174.3 \pm 2.8	43.8 \pm 2.3	0.133
9	1	1	1	-1	-1	204.8 \pm 2.9	57.6 \pm 2.7	0.141
10	1	1	-1	-1	1	201.5 \pm 2.7	50.3 \pm 2.5	0.114
11	1	-1	1	1	1	188.6 \pm 2.7	42.8 \pm 2.2	0.091
12	0	0	0	0	1.86	189 \pm 2.6	44.2 \pm 2.6	0.077
13	0	0	0	0.86	0	177.1 \pm 2.6	50 \pm 2.0	0.097
14	0	1.86	0	0	0	175.3 \pm 2.0	47.2 \pm 2.6	0.079
15	-1	-1	1	-1	1	205.1 \pm 3.6	44.5 \pm 2.4	0.094
16	0	0	1.86	0	0	167.5 \pm 2.9	54.4 \pm 2.4	0.08
17	-1	-1	-1	1	-1	240.1 \pm 2.7	49.4 \pm 2.3	0.201
18	1	-1	-1	-1	1	197.8 \pm 2.6	39.5 \pm 2.9	0.138
19	-1	0.86	0	0	0	204.7 \pm 2.9	44.3 \pm 2.0	0.13
20	-1	-1	-1	-1	-1	125.7 \pm 2.1	44.6 \pm 2.3	0.097
21	-1	1	1	-1	-1	125.1 \pm 2.7	47.4 \pm 2.5	0.092

*A: Cremophor® EL, *B: CTAB, *C: Etanol, *D: Poloxamer 188 y *E: Vitamina E.

El análisis de tamaño de partícula mostró que todas las formulaciones cargadas con curcumina se encontraban en el rango nanométrico de 108.5 nm (\pm 2.3) a 263.3 nm (\pm 4.2), mientras que los valores de la distribución de tamaño (PDI) oscilaron entre 0.044 a 0.313. La medición del tamaño de partícula de los núcleos que conformaron las nanocápsulas se determinaron en condiciones de soluciones diluidas para evitar problemas debidos a la concentración (Moitzi, Guillot et al. 2007), así mismo se ha determinado previamente que por la técnica de dispersión de luz dinámica, el tamaño de partícula a diferentes

concentraciones no cambia significativamente cuando las dispersiones se diluyen con agua ultrapura aun sabiéndose que esta técnica es sensible a las impurezas y la viscosidad conocida de la muestra (Avgoustakis, Beletsi et al. 2003) y (Malvern-Instruments 2012). En general, a niveles altos de surfactante (Cremophor[®] EL) y niveles bajos de Vitamina E, las formulaciones de nanocápsulas cargadas con curcumina presentaron un tamaño de partícula más pequeño, así como una estrecha distribución de tamaño (PDI<0.15). Estos resultados fueron confirmados cuando se analizó el diseño, el cual mostró que la variable “surfactante” tiene un efecto significativamente negativo sobre el tamaño, es decir ayuda a disminuir el tamaño de partícula de las nanocápsulas. Los efectos de respuesta en las variables de estudios fueron tanto positivos como negativos (**Figura 19**). Los efectos positivos indican el aumento en el tamaño de partícula cuando la concentración de Vitamina E aumenta; y los efectos negativos indican que un incremento en la concentración de surfactante resulta en una disminución del tamaño de partícula (Vandervoort and Ludwig 2002) y (Van de Ven, Vermeersch et al. 2011).

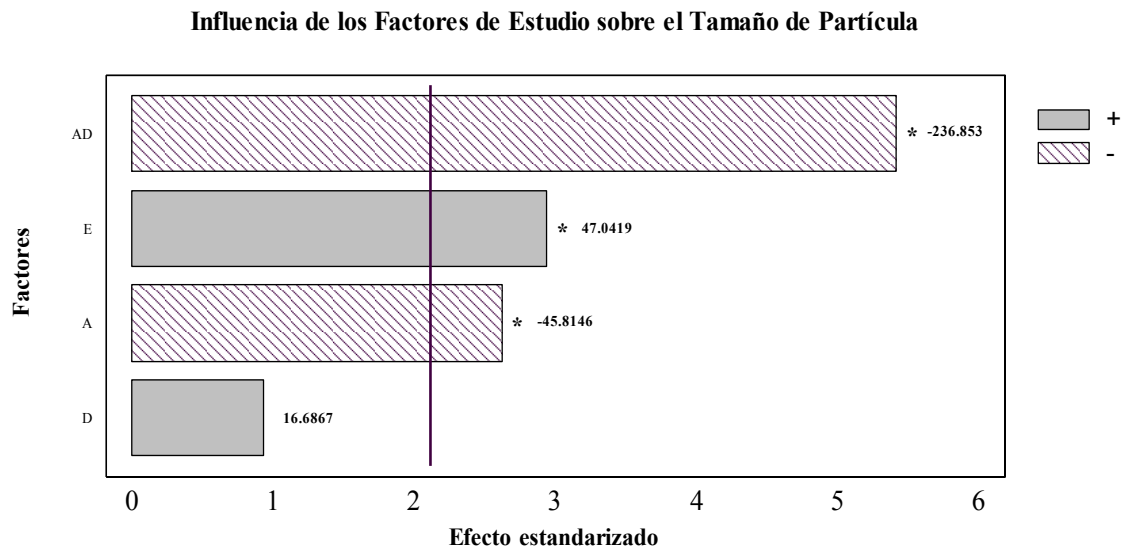


Figura 19. Influencia de los factores de estudio sobre el tamaño de partícula. *Factores estadísticamente significantes ($p < 0.05$).

Influencia de los Factores de Estudio sobre el PDI

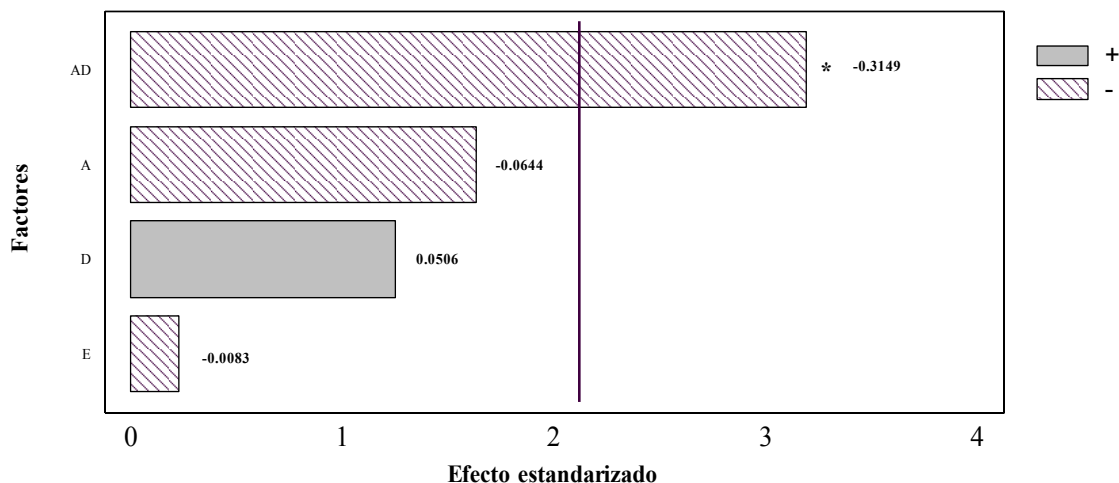


Figura 20. Influencia de los factores de estudio sobre el PDI. *Factores estadísticamente significantes ($p < 0.05$).

Por lo tanto, a concentraciones altas de Cremophor[®] EL y a concentraciones bajas de Vitamina E, el Tamaño de Partícula es Pequeño (**Figura 21**). Resultados similares han demostrado que a concentraciones crecientes de surfactante se obtienen nanocápsulas con tamaño de partícula de aproximadamente 100 nm (Zhou, Yue et al. 2010). Por consiguiente, estos resultados pueden explicarse debido a la formación de una película compacta de Cremophor[®] EL dada su adsorción en la superficie de la vitamina E. Este proceso de adsorción a concentraciones altas de Cremophor[®] EL es capaz de disminuir la tensión interfacial entre la Vitamina E y la fase acuosa, lo que resulta en la reducción de la energía libre total de formación de la emulsión y a la mayor área interfacial del Cremophor[®] EL. Estas condiciones son esenciales para obtener formulaciones nanocapsulares estables con partículas muy pequeñas (Tadros, Izquierdo et al. 2004), (Anton, Benoit et al. 2008) y (Madheswaran, Baskaran et al. 2013). Por otra parte, el efecto

del Poloxamer 188 sobre tamaño de partícula y PDI son positivos (16.6867 y 0.0506 respectivamente) pero no significantes ($p > 0.05$), sin embargo en las **Figuras 19 y 20** se puede observar que la interacción entre el Cremophor[®] EL y el Poloxamer 188 presenta un efecto negativo (-236.853 para tamaño de partícula y -0.3149 para PDI), lo que indica una tendencia hacia la formación de partículas más pequeñas con una distribución unimodal (distribución estrecha, $PDI < 0.1$) a concentraciones altas de éstos (**Figura 22**). Lo anterior se puede explicar por el hecho de que el Poloxamer 188 es un surfactante no iónico y por lo tanto puede actuar como un cosurfactante durante el proceso de fabricación de nanocápsulas para producir tamaños de partícula más pequeños con una distribución más estrecha (Reich 1997). También, el Poloxamer 188 proporciona un efecto estérico estabilizador que evita la agregación de las partículas finas de estos nanosistemas. La hidrofiliidad del Poloxamer 188 le permite lixiviar durante el proceso de fabricación formando nanoestructuras porosas, así mismo, éste puede adsorberse fuertemente y reducir el potencial zeta(Santander-Ortega, Jódar-Reyes et al. 2006) y (Yan, Zhang et al. 2010).

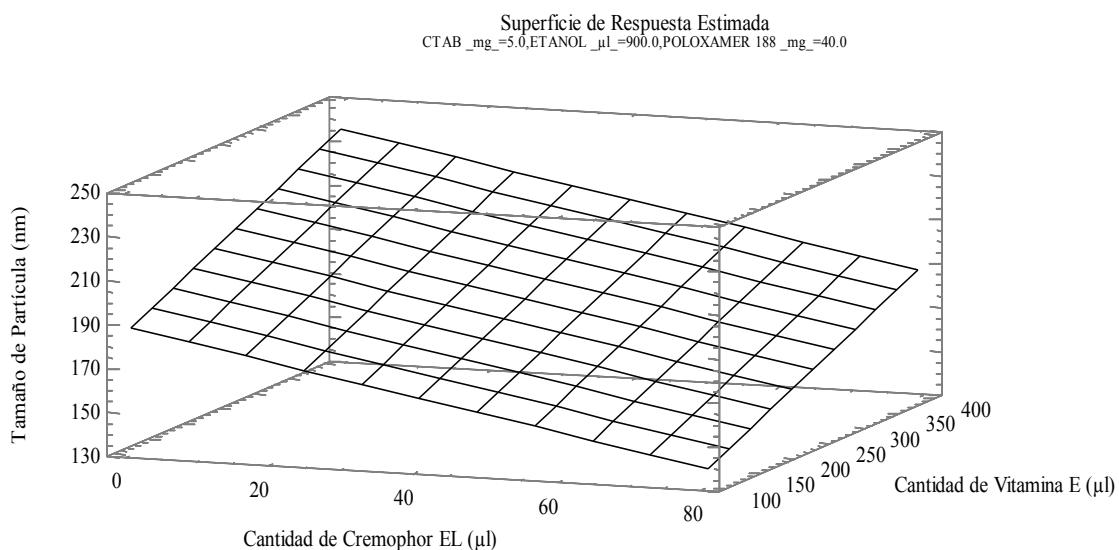


Figura 21. Gráfico de superficie de respuesta para Tamaño de Partícula (nm) correspondiente a los factores Cremophor[®] EL – Vitamina E obtenido con el modelo simplificado.

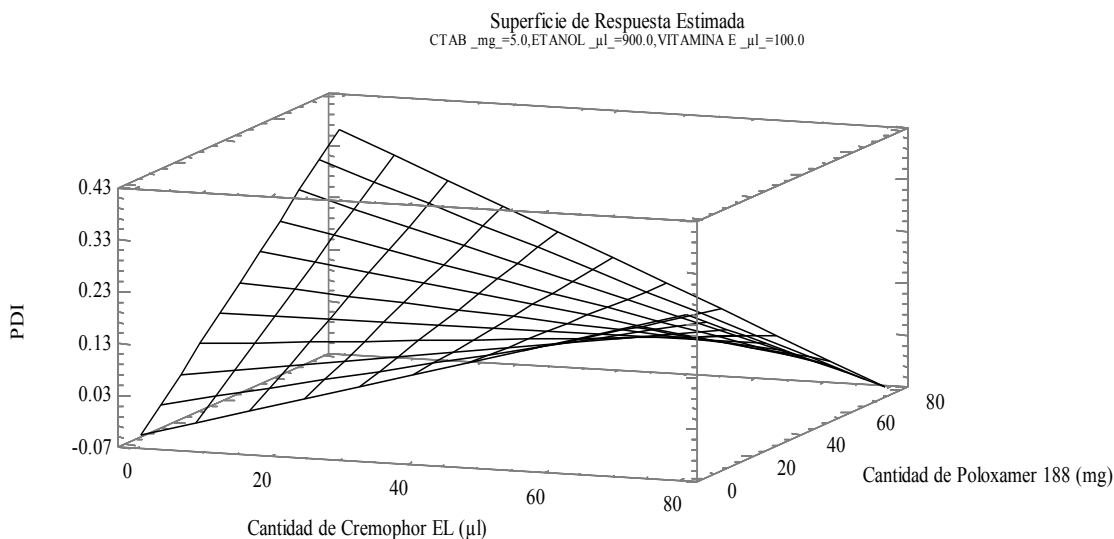


Figura 22. Gráfico de superficie de respuesta para PDI correspondiente a los factores Cremophor[®] EL – Poloxamer 188 obtenido con el modelo simplificado.

El potencial zeta se define como el potencial electrocinético en la superficie de la partícula y está influenciado por la carga de los diferentes componentes de la formulación (Couvreur, Barratt et al. 2002). Esta carga superficial puede ser afectada principalmente por los surfactantes y los aceites. La carga superficial de los núcleos que conformaron las nanocápsulas fue positiva, puesto que se utilizó un surfactante catiónico llamado Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) para cargar positivamente los núcleos y como consecuencia de la interacción iónica entre éste y el polímero se obtuvieron las nanocápsulas. Los valores de potencial zeta oscilan entre 39.5 ± 2.9 mV y 57.8 ± 2.8 . En la **Figura 23** se puede observar que el efecto positivo significativo ($p < 0.05$) del CTAB es el que condiciona la carga de los núcleos, mientras que la relación Cremophor[®] EL – Poloxamer 188 proporciona un efecto negativo significativo ($p < 0.05$), es decir tienden a disminuir o mantener el valor de la carga de los núcleos con forme la concentración de CTAB aumenta (**Figura 24**). Normalmente, las formulaciones que tienen partículas altamente cargadas con valores de potencial zeta positivos o negativos (± 30 mV) se consideran altamente estables.

Esto se debe a la repulsión eléctrica, evitándose de este modo su rápida agregación y coalescencia (Mora-Huertas, Fessi et al. 2010) y (Liu, Tourbin et al. 2013).

Influencia de los Factores de Estudio sobre el Potencial Zeta

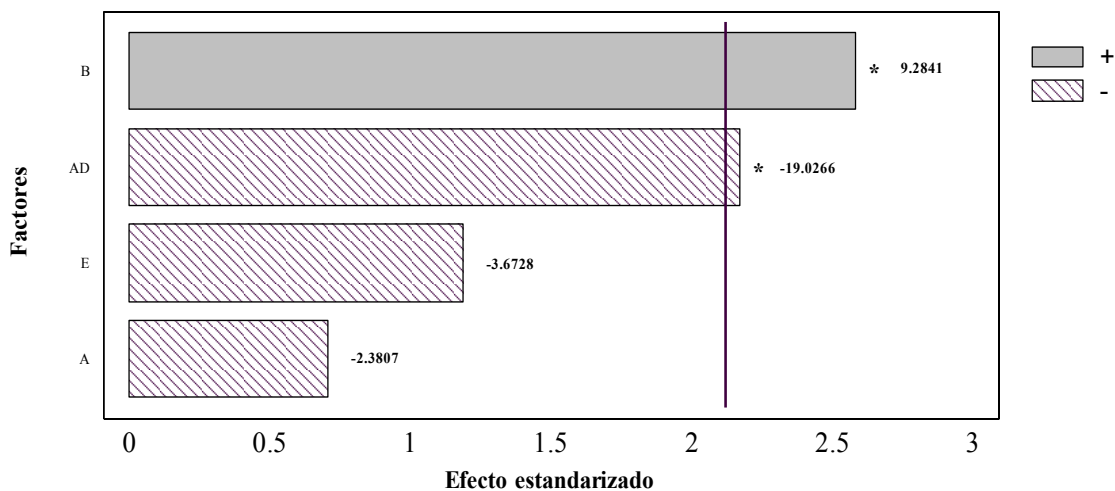


Figura 23. Influencia de los factores de estudio sobre el Potencial Zeta. *Factores estadísticamente significantes (p < 0.05).

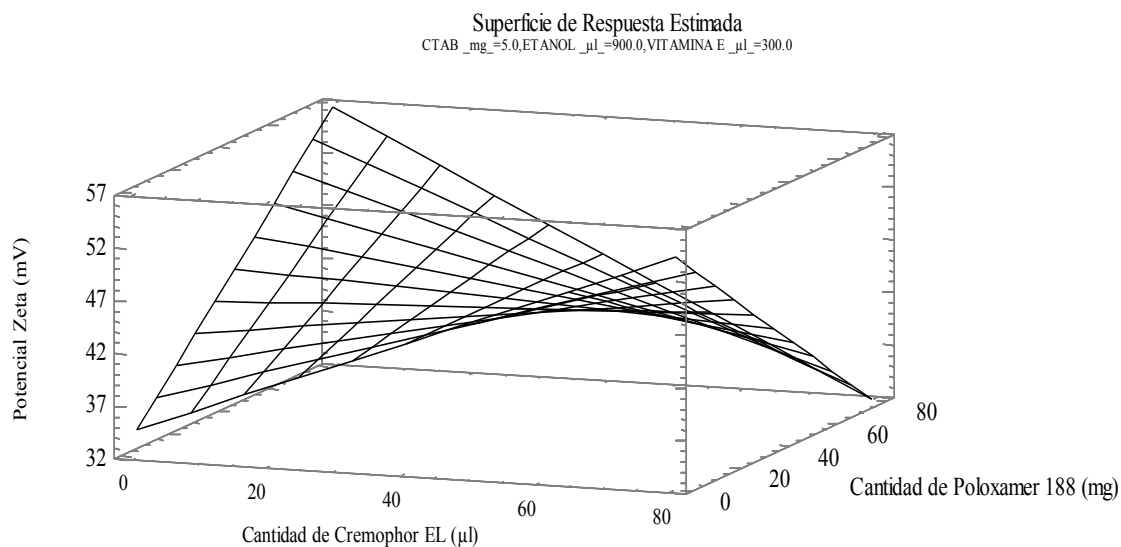


Figura 24. Gráfico de superficie de respuesta para el Potencial Zeta (mV) correspondiente a los factores Cremophor® EL – Poloxamer 188 obtenido con el modelo simplificado.

7.4. OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE POLÍMERO

El efecto de la cantidad de Alginato y Quitosán sobre el tamaño de partícula, PDI, y potencial zeta en las formulaciones se presentan en la **Tabla 14**. El tamaño de partícula más pequeño obtenido de las nanocápsulas con cubierta polimérica de quitosán (116.7 ± 3.2 nm) se obtuvo con la concentración de 1.25 mg/mL. Mientras que el tamaño más pequeño de las nanocápsulas con cubierta polimérica de Alginato (178 ± 7.9 nm) se obtuvo con la concentración de 1.50 mg/mL.

Tabla 14. Efecto del tipo y concentración de polímero sobre el tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI), potencial Zeta y presencia de agregados en los nanosistemas.

TIPO DE POLÍMERO	CONCENTRACIÓN POLIMÉRICA (mg/mL)	TAMAÑO PARTÍCULA (nm)	POTENCIAL ZETA (mV)	PDI	*AGREGACIÓN
Quitosán	1.0	111.3 ± 4.2	22.6 ± 1.8	0.253	+
	1.25	116.7 ± 3.2	24.4 ± 2.1	0.117	-
	1.5	119.4 ± 4.0	24.6 ± 3.3	0.173	+
	1.75	118.7 ± 4.3	25.8 ± 2.7	0.153	++
Alginato	1.25	143.8 ± 5.6	-46.5 ± 3.1	0.153	+
	1.5	178 ± 7.9	-49.0 ± 2.3	0.149	-
	1.75	200.7 ± 6.1	-50.2 ± 3.2	0.233	+
	2.0	232.2 ± 6.8	-48.9 ± 2.8	0.355	++

*Agregación: (-) ausencia, (+) presencia moderada y (++) presencia notoria.

Los resultados que se muestran en la tabla anterior referente a la cantidad óptima de quitosán en la formulación de nanocápsulas cargadas con curcumina (NC-Q) muestran que el grosor de la cubierta polimérica no es necesariamente el mismo ni aumenta proporcionalmente cuando son preparadas con cantidades diferentes de quitosán. De acuerdo con diversos autores, los valores del grosor de la cubierta polimérica se encuentran alrededor de 4 a 20 nm (Sathyanarayanan and Raina 2009), (Rampino, Borgogna et al.

2013) y (Asthana, Jaiswal et al. 2013) cuando los nanosistemas son preparados por el método de nanoprecipitación.

En cuanto a los resultados referentes a la cantidad óptima de alginato en la formulación de nanocápsulas cargadas con curcumina (NC-ALG), estos muestran que el grosor de la cubierta polimérica no aumenta proporcionalmente y es mayor que la de los sistemas preparados con quitosán, sin embargo ésta aumenta conforme la cantidad de alginato también lo hace. Se ha reportado que el grosor de la cubierta polimérica cuando se utilizan polianiones se encuentra alrededor de 10 a 60 nm (Guinebrière, Briançon et al. 2002), (Mora-Huertas, Fessi et al. 2010) y (Prabhakara, Bibib et al. 2013).

Se ha reportado que cuándo el tamaño de las nanopartículas aumenta, el valor de potencial zeta se ve afectado. El aumento de tamaño de partícula significa la disminución del área superficial total de las nanocápsulas y área de contacto (Khayata, Abdelwahed et al. 2012). La superficie de las nanocápsulas con cubierta polimérica de quitosán (NC-Q) está cargada positivamente debido a los grupos amino presentes en su estructura (Santander-Ortega, Peula-García et al. 2011), (Santander-Ortega, Lozano-López et al. 2010) y (Hu, Jiang et al. 2002), que en comparación con las nanocápsulas con cubierta polimérica de alginato (NC-ALG), éstas están cargadas negativamente debido a los grupos carboxilo presentes en su estructura (Daemi and Barikani 2012). Una disminución en el valor de potencial zeta de las NC-Q se relaciona con el tamaño de partícula, es decir, a tamaños de partícula pequeños el surfactante no iónico (Cremophor[®] EL y Poloxamer 188) tiene una mayor cobertura reduciendo el valor de este parámetro (Khayata, Abdelwahed et al. 2012).

Uno de los posibles mecanismos de formación de la cubierta polimérica de quitosán en los nanosistemas, es la existencia de interacciones entre la superficie del núcleo oleoso de la nanocápsula y los grupos hidrófobos presentes en la estructura química del quitosán (Couvreur, Barratt et al. 2002). Sin embargo también se ha planteado una forma de interacción adicional a la mencionada con anterioridad, la cual involucra al quitosán y a un

surfactante estabilizador de núcleos (surfactante no iónico: Cremophor[®] EL). Ésta forma de interacción adicional se lleva a cabo debido a un efecto electrostático cuando el quitosán y los surfactantes (Poloxamer 188) se encuentran en solución acuosa. El efecto electrostático propuesto se debe a que los oxígenos electronegativos del Poloxamer 188 interactúan con las cadenas electropositivas del quitosán, dando lugar a una interacción Dipolo-Ión (Pepić, Filipović-Grčić et al. 2008).

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 Cremophor[®] EL y las cadenas electropositivas del quitosán, favoreciendo de esta manera la adsorción del quitosán 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 quitosán (Interacción hidrófoba), ambas interacciones pudiéndose llevar a cabo simultáneamente.

Durante la preparación de NC-ALG, la cubierta polimérica de alginato se forma como consecuencia de las interacciones iónicas dipolares entre un surfactante catiónico (CTAB) incluido en el núcleo y el polímero. Esta interacción iónica dipolar se llevó a cabo entre el grupo amino del surfactante catiónico y los grupos carboxilo del polímero. Con el fin de promover esta interacción el uso de un agente surfactante no iónico fue necesario (Poloxamer 188). En este sentido, se ha demostrado que los surfactantes no iónicos mejoran significativamente la fuerza de interacción entre el surfactante catiónico y el alginato (Rosigno, D'Auria et al. 2005).

En cuanto el índice de polidispersión, éste fue menor en el caso de las nanocápsulas preparadas con quitosán en comparación con las preparadas con alginato (**Tabla 14**), es decir la distribución de tamaño de partícula es más estrecha en el caso de las nanocápsulas con cubierta polimérica de quitosán en comparación con las de alginato; siendo las

cantidades de 25 mg de quitosán y 30 mg de alginato respectivamente en las formulaciones las óptimas para obtener una adecuada estabilidad física e índices de polidispersión bajos. La microscopia electrónica de transmisión (TEM) muestra que la forma de los dos nanosistemas obtenido (NC-Q y NC-ALG) es esférica y ambas formulaciones tienen un índice de polidispersión (PDI) bajo (**Figura 25**). El tamaño de las nanocápsulas según lo observado en la microscopia (TEM) tiene una buena correlación con respecto al tamaño de partícula obtenido por el ZetaSizer[®] Malvern.

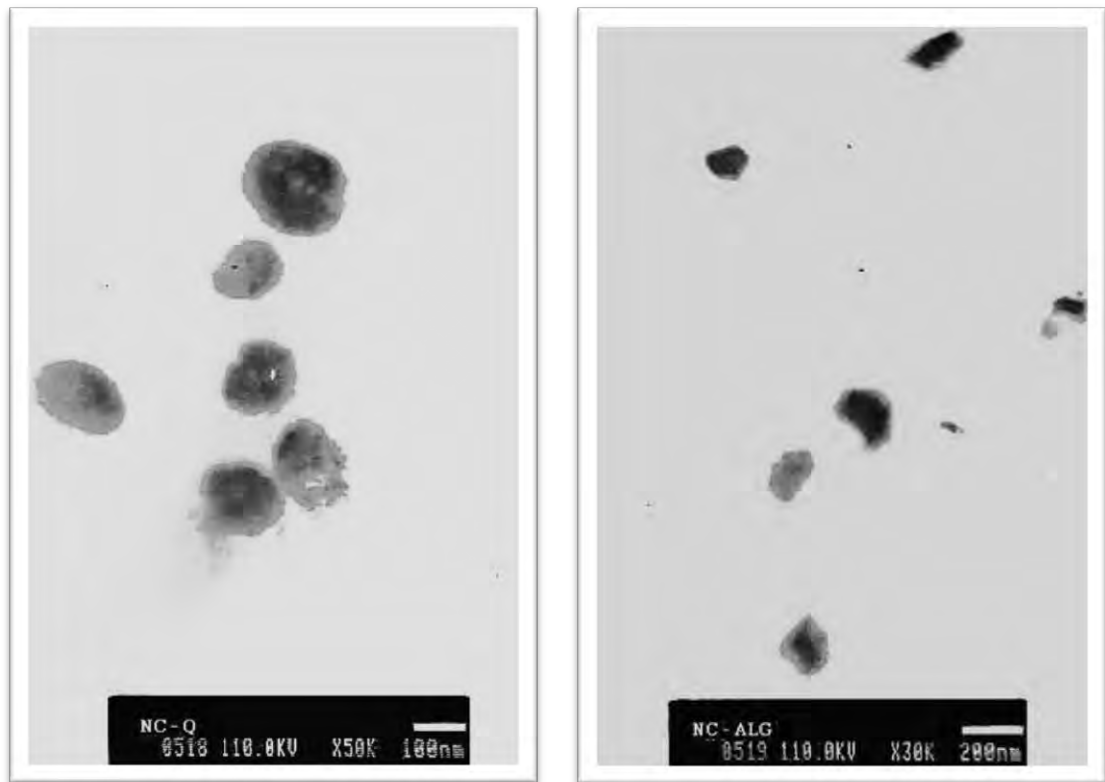


Figura 25. Imágenes TEM de los sistemas nanocapsulares desarrollados: NC-Q y NC-ALG cargadas con curcumina. Izquierda: Nanocápsulas con cubierta polimérica de Quitosán (NC-Q); Derecha: Nanocápsulas con cubierta polimérica de Alginato (NC-ALG).

Los componentes seleccionados para la preparación de los sistemas nanocapsulares, así como la cantidad en la que éstos deben estar presentes para obtener una formulación óptima se resumen en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Componentes y cantidad de éstos utilizados para la obtención de nanosistemas óptimos de NC-Q y NC-ALG.

FASE	CONSTITUYENTES	CANTIDAD		
		NC-Q	NC-ALG	
Orgánica	Activo (mg)	Curcumina	5	
	Aceite (µL)	Vitamina E (α -Tocoferol)	100	
	Co-solvente (µL)	Etanol	800	
	Surfactante no iónico (µL)	Cremophor® EL	60	
	*Surfactante catiónico (mg)	CTAB	-----	5
	Solvente (mL)	Acetona	5	
Acuosa	No solvente (mL)	Agua	20	
	Surfactante no iónico (mg)	Poloxamer 188	60	
	Agente solubilizante (mL)	CH ₃ COOH 0.1N	2	-----
	Polímero (mg)	Quitósán	25	-----
		Alginato (Manuacol)	-----	30

7.5. EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN DE CURCUMINA Y pH DE LAS FORMULACIONES

La determinación de la eficiencia de encapsulación de curcumina se llevó a cabo en los dos sistemas nanocapsulares optimizados (NC-Q y NC-ALG). Este parámetro evaluado presentó un valor >98% en ambas formulaciones (**Tabla 16**).

Se ha reportado que la alta eficiencia de encapsulación se debe en gran parte al método de preparación y a las propiedades del núcleo oleoso (Khayata, Abdelwahed et al. 2012). En este sentido, la solubilidad máxima de la sustancia activa en el aceite es uno de los criterios

para la selección de aceite formador de núcleo y la concentración de sustancia activa durante el desarrollo de las formulaciones. La Vitamina E se seleccionó como núcleo oleoso formador de las nanocápsulas puesto que la curcumina presenta buenas propiedades de solubilidad en ésta y además se ha informado que una alta eficacia de encapsulación está relacionada con la propiedad mencionada con anterioridad (Fresta, Cavallaro et al. 1996).

Tabla 16. Características fisicoquímicas de los dos nanosistemas obtenidos. PDI: Índice de polidispersión, E.E.: Eficacia de encapsulación. Los valores están dados como la media \pm SD; n=3.

SISTEMA	DIÁMETRO PROMEDIO (nm) \pm SD	PDI	POTENCIAL ZETA (mV) \pm SD	%E. E.	pH \pm SD
NC-Q	116.7 \pm 3.2	0.107	24.4 \pm 2.1	> 98	4.67 \pm 0.08
NC-ALG	178 \pm 7.9	0.149	-49.0 \pm 2.3		6.08 \pm 0.06

Por lo tanto es lógico suponer que los sistemas en los que la concentración de la sustancia activa se encuentra cercana a la concentración de saturación pueden dar mejores resultados. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que al utilizar concentraciones de saturación, la sustancia activa puede precipitar fácilmente debido a las condiciones del proceso. En consecuencia, puede haber formación de nanocristales del activo en la formulación, lo cual puede tener un gran impacto en el perfil de liberación del fármaco (Pohlmann, Mezzalira et al. 2008).

7.6. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LAS NC-Q Y NC-ALG EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Diversos factores que combinados con la composición de las nanocápsulas, las condiciones y método de preparación y el almacenamiento pueden afectar en general la estabilidad de los sistemas nanocapsulares. Por lo que en la mayoría de los casos es difícil identificar los factores específicos y el comportamiento debido a la combinación de estos factores, lo que necesariamente con lleva a obtener conclusiones generales.

Por lo tanto la apariencia visual es un aspecto fundamental con la cual se puede resaltar la inestabilidad del sistema nanocapsular. El tamaño de partícula puede reflejar la presencia de agregados y el pH como la cuantificación de la sustancia activa pueden permitir la detección de la degradación química de ésta.

En la **Tabla 17** se muestran los resultados obtenidos en cuanto a tamaño de partícula, PDI y potencial zeta después de mantener los sistemas nanocapsulares (NC-Q y NC-ALG) a una temperatura de 4°C (Condiciones de almacenamiento). En ambas formulaciones, el tamaño de partícula y el PDI se ven modificados. En el caso de las NC-Q la estabilidad de éstas es de alrededor de 3 meses y posterior a este tiempo, se hace presente con mayor magnitud el decremento de tamaño de partícula y la precipitación del activo (Curcumina). Lo anterior se puede justificar por el hecho de que el quitosán se empieza a hidrolizar gradualmente (rompimiento de las cadenas de quitosán) durante el periodo de almacenamiento y por lo tanto la viscosidad de la nano-formulación disminuye, haciendo a ésta más susceptible a sufrir problemas de estabilidad física (Rokhati, Widjajanti et al. 2013). Sin embargo, se ha observado que a diferentes valores de pH la hidrólisis del quitosán solo es un factor que contribuye mínimamente en el rompimiento de las cadenas de quitosán (Sun, Qu et al. 2008).

Tabla 17. Características fisicoquímicas de los nanosistemas durante los estudios de estabilidad en condiciones de almacenamiento (4°C). Los valores están dados como la media \pm SD; n=3.

SISTEMA	TIEMPO (Meses)	DIÁMETRO PROMEDIO (nm) \pm SD	PDI	POTENCIAL ZETA (mV) \pm SD
NC-Q	0	116.7 \pm 3.2	0.107	24.4 \pm 2.1
	1	115.2 \pm 2.9	0.115	23.8 \pm 2.1
	2	101.3 \pm 4.1	0.145	23.9 \pm 3.2
	3	95.45 \pm 3.0	0.196	24.5 \pm 2.8
NC-ALG	0	178 \pm 7.9	0.149	-49.0 \pm 2.3
	1	161.9 \pm 2.1	0.178	-48.7 \pm 1.9
	2	157.7 \pm 4.77	0.213	-46.8 \pm 2.5
	3	149.3 \pm 2.9	0.245	-44.3 \pm 2.7

La estabilidad a 4°C de las NC-ALG es mayor a 2 meses, es decir no hay un cambio significativo en cuanto al tamaño de partícula se refiere. Así mismo, se ha reportado que entre el mes 4 y 5 el decremento del tamaño de partícula ha sido más notorio (Ma, Qi et al. 2007), por lo tanto, los resultados obtenidos de la estabilidad en almacenamiento a 4°C de nuestro nanosistema (NC-ALG) concuerdan puesto que entre mes 3 y 4 la disminución del tamaño de partícula es evidente. Es decir, la forma en que se lleva a cabo la degradación de alginato es similar a la del quitosán.

La uniformidad del tamaño de partícula es una de las características más importantes que los sistemas nanoparticulados deben de tener (He, Hu et al. 2010). Por lo que la distribución del tamaño de las nanopartículas debe ser muy estrecho. Como se había mencionado con anterioridad, los valores de hasta 0.1 de PDI representan una distribución de tamaño de partícula monodispersa (Baalousha and Lead 2012). Sin embargo, se ha propuesto que a valores inferiores a 0.2 los nanosistemas presentan monodispersión (Danhier, Lecouturier

et al. 2009). Por lo tanto, si los valores de PDI se encuentran por encima de 0.2 significa que la distribución del tamaño de partícula es muy amplia.

Un aumento en los valores de PDI se relaciona con la degradación del polímero y la agregación o presencia de la unión de partículas. Este parámetro no solo puede ser considerado como un signo de la mala estabilidad de los nanosistemas, sino que también puede indicar que hay un problema en la formulación durante la formación de las nanopartículas.

El potencial zeta en las NC-Q no se modificó durante los 3 meses del estudio, lo cual se justifica por el hecho de la baja disminución del tamaño de partícula en este nanosistema (lenta degradación del quitosán). En comparación con las NC-ALG, el potencial zeta en este nanosistema se modificó moderadamente puesto que la degradación del alginato se lleva a mayor velocidad que la del quitosán, lo cual se observa también en la disminución del tamaño de partícula.

7.7. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE CURCUMINA *IN VITRO* A PARTIR DE NC-Q Y NC-ALG

La liberación de un activo a partir de un sistema nanoparticulado y su subsecuente biodegradación son dos aspectos muy importantes para el desarrollo de una formulación exitosa. La velocidad de liberación de un activo a partir de un sistema nanoparticulado depende de: a) la desorción de activo absorbido unido a la superficie, b) difusión del activo a través de la matriz de las nanopartículas, c) difusión del activo a través de la pared polimérica en el caso de nanocápsulas, d) erosión de la matriz de las nanopartículas y e) un proceso de erosión/difusión combinado. Por lo tanto, la difusión y la biodegradación son

los principales procesos durante la liberación del activo (Soppimath, Aminabhavi et al. 2001). Además, también se deben de tomar algunos factores tales como las características fisicoquímicas del nanosistema, la concentración del activo, peso molecular y concentración del polímero, naturaleza y tipo de aceite y las condiciones del método de preparación.

Uno de los métodos más utilizados para realizar los estudios de liberación es con el uso de una membrana de diálisis debido a sus ventajas sobre otros métodos lo cuales resultan difíciles de llevar a cabo.

En los perfiles de liberación de curcumina a partir de las nanocápsulas, se puede observar que se presentan dos fases (**Figura 26**). La fase inicial, llamada efecto “Burst” puede atribuirse a la desorción del activo de la superficie de las nanocápsulas (Perez, Sanchez et al. 2001) y (Cruz, Soares et al. 2006) o a la degradación de la cubierta polimérica (Cauchetier, Deniau et al. 2003). Esta fase tiene un comportamiento que se ajusta a una cinética de orden cero (Santos-Magalhães, Pontes et al. 2000).

La segunda fase (últimos 5 puntos en las gráficas de NC-Q y NC-ALG) corresponde a la difusión del activo desde el núcleo oleoso de las nanocápsulas hasta la fase externa. Este proceso de difusión está determinado por el coeficiente de partición del activo que hay entre el núcleo oleoso y el medio externo acuoso, la presencia de interacciones entre el activo y el polímero, la concentración de surfactantes y los volúmenes relativos en cada una de las fases (Zili, Sfar et al. 2005).

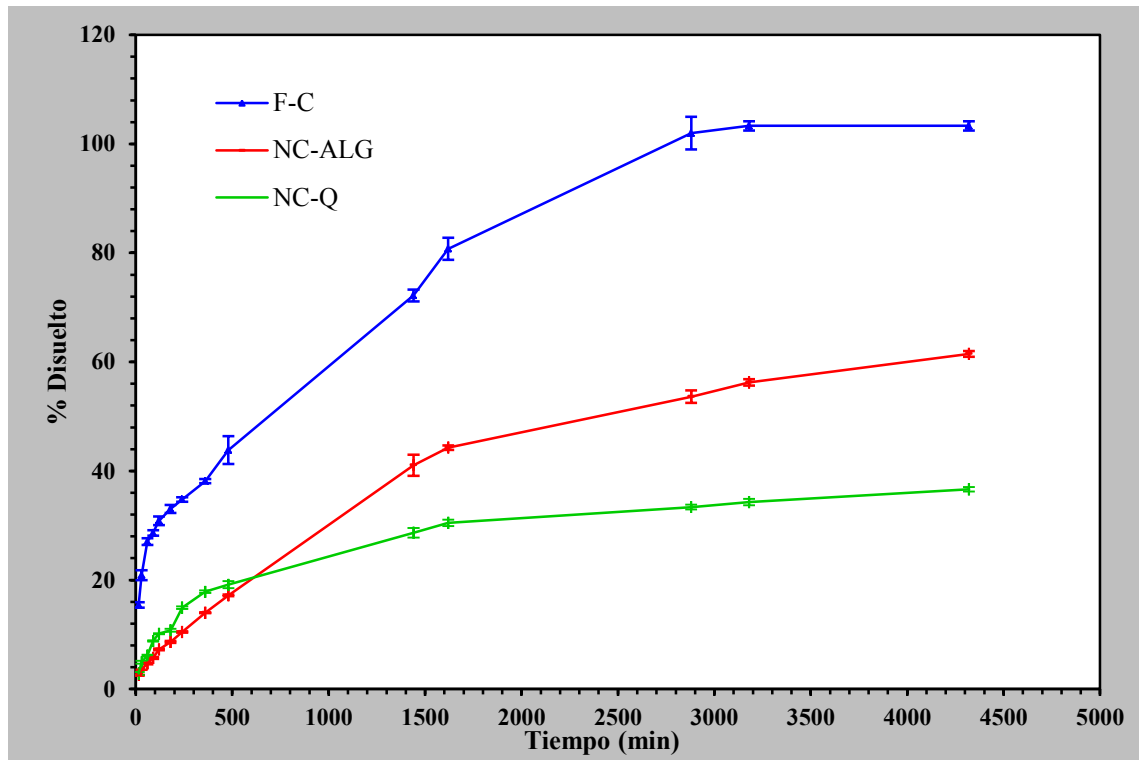


Figura 26. Perfiles de liberación in vitro de curcumina a partir de NC-Q, NC-ALG y F-C en pH= 1.2 a 37°C (media \pm SD, n=3).

La velocidad de liberación de curcumina a partir de las NC-ALG es mayor en comparación con las NC-Q pero menor que una solución hidroalcohólica de curcumina (Curcumina no encapsulada) después de 72 horas en medio ácido (HCl pH= 1.2). En la **Figura 26** se presentan los perfiles de liberación en términos de porcentaje de curcumina liberada. Después de 72 h, el porcentaje liberado de curcumina a partir de las NC-Q, NC-ALG y solución hidroalcohólica es 34.3%, 58.6% y 100% respectivamente. La más rápida velocidad de liberación de curcumina a partir de las NC-ALG es debido a que en pH's bajos el alginato produce una reducción en el peso molecular causando su rápida degradación y por lo tanto la rápida difusión del activo a través del núcleo de las nanocápsulas (Gombotz and Wee 1998). Por su parte, el quitosán presenta carga positiva en

medio ácido como resultado de la protonación de sus grupos amino, confiriéndole solubilidad en medio acuoso y buena estabilidad química, así como la habilidad de formar geles con la capacidad de liberar lentamente un activo (Kato, Onishi et al. 2003). La buena estabilidad química del quitosán como formador de la cubierta polimérica en las nanocápsulas se debe a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos amino e hidroxilo de sus cadenas. A pH ácido estos enlaces de hidrógeno se disocian debido a la protonación del grupo amino y se produce un rápido hinchamiento de la cubierta polimérica permitiendo así que la liberación de la curcumina sea más lenta (Abdel-Mohsen, Aly et al. 2012). Por su parte, la velocidad de liberación de curcumina a partir de una solución hidroalcohólica de ésta depende solamente de la difusión a través de la membrana de diálisis, por lo tanto la velocidad de liberación es mayor.

Con el fin de determinar el modelo matemático y mecanístico de liberación de la curcumina a partir de los dos sistemas nanocapsulares obtenidos (NC-Q y NC-ALG), se ajustaron los perfiles obtenidos en el aparato IV USP-Dialysis Adapter a modelos de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas utilizando los softwares: DDSolver-1 y Statgraphics Centurion XV. La selección apropiada de un modelo es esencial para evaluar las características de liberación del fármaco en estudio. En este sentido, los criterios estadísticos utilizados para la selección del modelo fueron: Coeficiente de determinación ajustado ($R^2_{ajustada}$), Criterio de Akaike (AIC) y Criterio de selección de modelo (MSC), (**Tabla 18**) (Zhang, Huo et al. 2010).

De acuerdo a los resultados mostrados en la **Tabla 18**, se puede decir que el modelo al que mejor se ajustan los datos obtenidos durante el estudio de liberación de curcumina a partir de las nanocápsulas con cubierta polimérica de quitosán (NC-Q) fueron a Korsmeyer-Peppas, en el cual “ $n=0.1910$ ($n<0.43$ para matrices esféricas)” por lo tanto, el mecanismo de liberación predominante es la difusión (Costa and Sousa Lobo 2001), la cual está asociada a la presencia de poros en la matriz polimérica y a la consiguiente difusión

simultánea a través de la matriz hinchada. Así mismo, se ha visto que el mecanismo predominante de liberación de Rifampicina a partir de nanopartículas de quitosán es difusión (Patel, Parikh et al. 2013). Aunque la difusión fue el mecanismo de liberación predominante, otros procesos de liberación también estuvieron presentes tales como el grado hinchamiento de la cubierta polimérica y erosión polimérica, aunque en algunos casos también es importante la cantidad de activo que se encuentra encapsulado.

Tabla 18. Criterios estadísticos utilizados para la selección del modelo en estudios de liberación *in vitro*.

MODELO		SISTEMA	
		NC-Q	NC-ALG
Orden Cero	K (%*Min ⁻¹)	0.008	0.015
	R ² ajustada	0.8051	0.9138
	AIC	85.4351	91.3384
	MSC	1.4296	2.2494
Primer Orden	K (Min ⁻¹)	6.5093	11.4886
	R ² ajustada	0.9657	0.8612
	AIC	61.1005	98.0590
	MSC	3.1357	1.6323
Higuchi	K (%*Min ^{-1/2})	0.559	1.0570
	R ² ajustada	0.9464	0.9831
	AIC	67.3640	68.3588
	MSC	2.7204	3.8908
Korsmeyer-Peppas	K (%*Min ⁻ⁿ)	11.0590	1.3320
	n	0.1910	0.4750
	R ² ajustada	0.9893	0.9819
	AIC	45.5402	70.1187
	MSC	4.2793	3.7651

El ajuste de los datos para determinar el modelo matemático y mecanístico de liberación se realizó utilizando los softwares: DDSolver-1® y Statgraphics Centurion XV.

En el caso de las nanocápsulas con cubierta polimérica de alginato, el modelo al que mejor se ajustaron los perfiles de liberación de curcumina fue a Higuchi, el cual describe como mecanismo de liberación a un proceso de difusión basado en la ley de Fick. Además, el modelo de liberación de Korsmeyer-Peppas dado que “n=0.4750” considera que el proceso

de liberación no solo depende de la difusión, si no también depende de relajación de las cadenas poliméricas (Hinchamiento) o del mecanismo de erosión (Transporte anómalo) (Oliveira, Mendes et al. 2013)

7.8. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE NANOCÁPSULAS DE CURCUMINA

Un parámetro importante a la hora de valorar el potencial de un nuevo sistema nanoparticulado de liberación de fármacos es su toxicidad celular. La viabilidad de las células Caco-2 después de ser expuestas e incubadas por 2 horas a 37 °C con NC-Q, B-NC-Q, NC-ALG, B-NC-ALG, DMEM y Etanol 70% se muestra en la **Figura 27**. Éste muestra que inclusive a concentración polimérica por unidad de superficie de 157.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) la viabilidad celular se encuentra por encima del 80%. Sin embargo, es un hecho que la toxicidad incrementa conforme la concentración también lo hace, pero no de manera lineal. La viabilidad celular fue mayor para NC-ALG y B-NC-ALG que NC-Q y B-NC-Q a la misma concentración. Las diferencias en la toxicidad se encuentran principalmente en el peso molecular de polímero utilizado y la carga superficial, los cuales son parámetros claves para la interacción con las membranas celulares y por consiguiente, el daño celular (Huang, Khor et al. 2004).

Estudios previos en células Caco-2 han demostrado que la toxicidad de nanopartículas de quitosán no solo depende de sus propiedades físico-químicas como el tamaño y la carga superficial sino también del peso molecular del quitosán y la concentración a la cual son expuestas las células (Schipper, Varum et al. 1996), (Huang, Khor et al. 2004) y (Prego, Torres et al. 2006). Además, el daño celular así mismo está relacionado con la fuerte interacción iónica que se llevó a cabo entre la superficie de las nanocápsulas de quitosán (Grupo amino) y las membranas celulares (Fischer, Li et al. 2003).

Sin embargo, la viabilidad celular en el caso de las nanocápsulas con cubierta polimérica de alginato fue mayor, debido a que solo se llevaron a cabo interacciones electrostáticas entre la superficie de las nanocápsulas de alginato (Grupos Carboxilo) y las membranas celulares (Xiang, Liu et al. 2013), es decir, la toxicidad de este nanosistema está principalmente relacionada con el tamaño de partícula, el peso molecular del alginato y la concentración a las cual son expuestas las células.

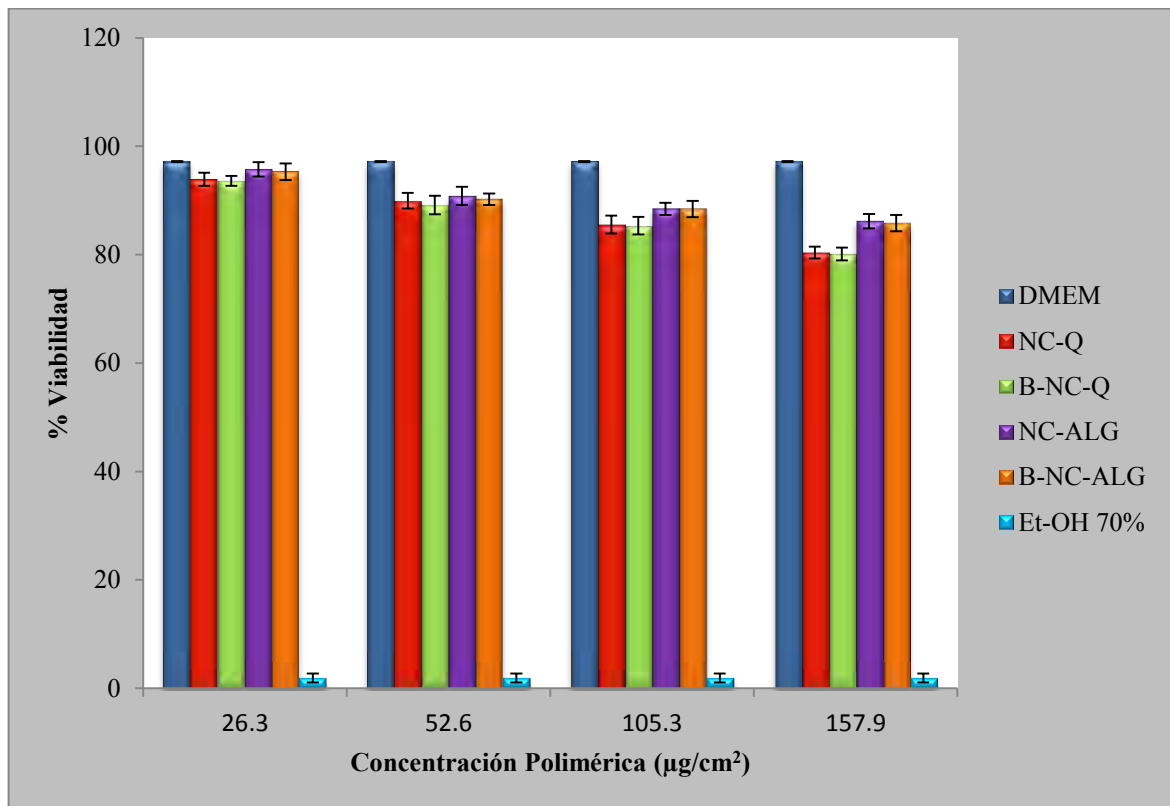


Figura 27. Citotoxicidad de NC-Q y NC-ALG (Cargadas con curcumina), B-NC-Q y B-NC-ALG (No cargadas), DMEM (Control negativo) y Etanol 70% (Control positivo) (media \pm SD, n=3).

7.9. EFECTO DE NC-Q, NC-ALG, TEOFILINA Y BD SOBRE LA RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL (TEER)

Teniendo en cuenta la interacción reportada del quitosán con las *tight junctions*, se decidió investigar si esta capacidad de interacción entre las nanocápsulas con cubierta polimérica de quitosán se mantenía. En ese sentido, la resistencia eléctrica transepitelial es un parámetro que proporciona una medida de las propiedades de barrera del epitelio así como de su integridad (Pasternak and Miller 1996) y (Rodrigues, Dionísio et al. 2012). Además, TEER también se utiliza con frecuencia como un marcador sensible de daño celular, lo cual indica toxicidad o sugiere un cambio en la función de la barrera epitelial (Nafee, Schneider et al. 2009) y (Scherließ 2011).

Modificaciones en la permeabilidad de la membrana relacionadas con la apertura de las *tight junctions* se asocian normalmente a la reducción en los valores de TEER (Prego, García et al. 2005). Por lo tanto, se decidió hacer realizar la medición TEER con la finalidad de llevar a cabo un seguimiento de sus valores. Las mediciones de TEER se realizaron a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la exposición de NC-Q, NC-ALG, Teofilina, BD y DMEM (Control) sobre la monocapa de células Caco-2. Después de este tiempo, los sistemas anteriores fueron removidos y reemplazados por medio de cultivo fresco con la finalidad de verificar si los valores de TEER después de 24 horas se recuperaban. En la **Figura 28** se pudo observar que NC-Q y NC-ALG disminuyeron el valor de TEER hasta alrededor de 50 y 70 por ciento respectivamente; mientras que los valores de TEER para Teofilina, BD y DMEM se encontraron por arriba de 90 por ciento, este decremento en los valores de TEER indica la apertura de las *tight junctions*. Sin embargo, 24 h después de que fueron removidos NC-Q y NC-ALG el valor inicial de TEER se recuperó, lo que indica que la perturbación de la monocapa es transitoria. Teniendo en cuenta que las concentraciones de NC-Q y NC-ALG (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o una concentración por unidad de superficie de 44.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de polímero en ambos casos) utilizadas no

comprometen la viabilidad celular, la reducción de las TEER podría estar asociada directamente a la capacidad de NC-Q y NC-ALG para abrir las *tight junctions*.

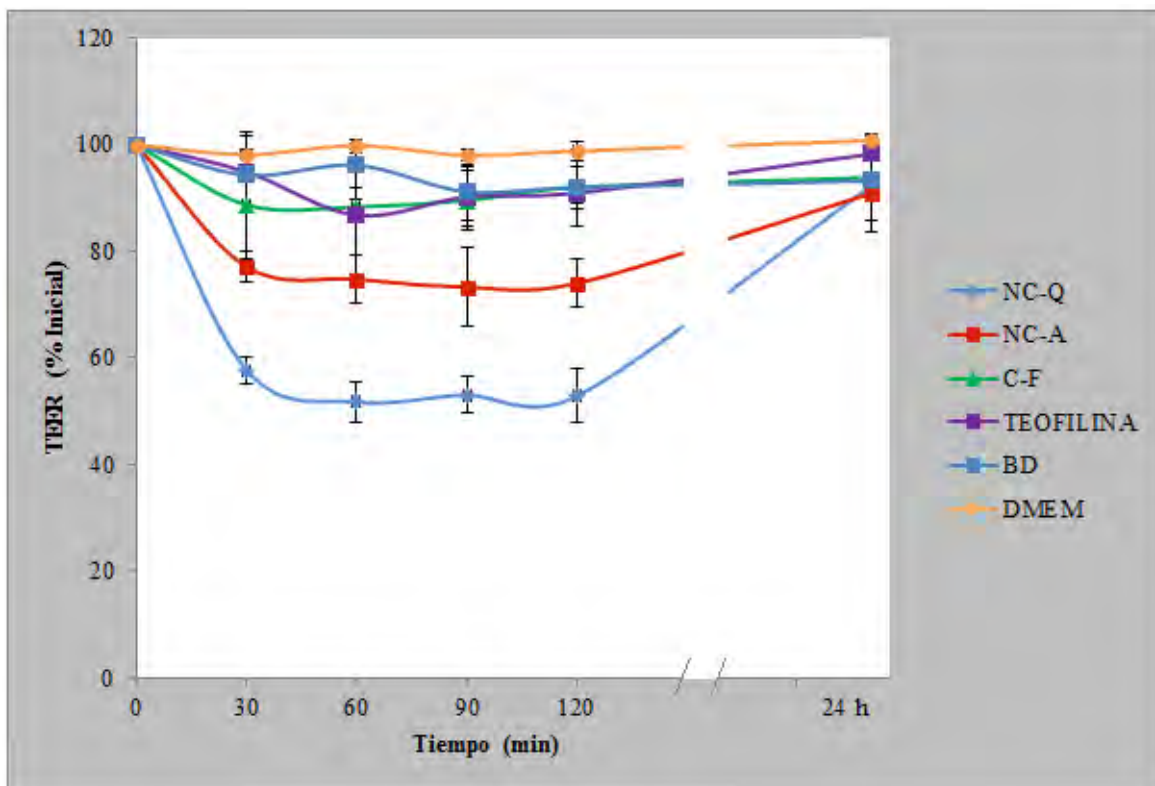


Figura 28. Efecto de NC-Q, NC-ALG (dosis por unidad de superficie de 44.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de polímero en ambos casos), FC, Teofilina (Control positivo), BD (Control negativo) y DMEM (Control) sobre los valores de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en función del tiempo (media \pm SD, n=3).

7.10. DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD APARENTE

La permeabilidad de un activo sobre una monocapa de células caco-2 depende de la concentración de éste, del tiempo de exposición y la temperatura principalmente. Por lo que cada uno de estos factores se homogeneizaron con la finalidad de no sobreestimar

resultados. En la **Tabla 19** se muestran la influencia de NC-Q, NC-ALG (concentración polimérica por unidad de superficie de $44.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en ambos casos), F-C, Teofilina y BD. En el caso de los sistemas nanocapsulares, la dosis por unidad de superficie no compromete la viabilidad celular (Viabilidad celular $> 80\%$). Los resultados muestran que la permeabilidad de la curcumina se incrementa cuando se encuentra en las nanocápsulas (NC-Q y NC-ALG) en comparación con la dispersión de curcumina en DMEM (F-C). Sin embargo, la permeabilidad de la curcumina todavía se mejora 1.7 veces más cuando se encuentra en las NC-Q en comparación con las NC-ALG.

Tabla 19. Influencia de NC-Q, NC-ALG, FC, Teofilina (Control positivo) y BD (Control negativo) sobre la permeabilidad aparente (P_{APP}) a través de la monocapa de células Caco-2 (media \pm SD, $n=3$).

SISTEMA	CANTIDAD ABSORBIDA DE CURCUMINA		$P_{\text{APP}} \times 10^{-6}$ (cm/s)
	μg	%	
NC-Q	1.85 ± 0.63	2.62 ± 0.89	1.99 ± 0.44
NC-ALG	1.07 ± 0.18	$1.68 \pm .28$	1.18 ± 0.10
F-C	-	-	-
TEOFILÍNA	76.7 ± 6.5	16.6 ± 3.9	10.30 ± 2.42
BD	-	-	-

El incremento en la permeabilidad de curcumina en las NC-Q se debe a la capacidad que tiene el quitosán para abrir transitoriamente las *tight junctions*, permitiendo de esta manera un aumento en la permeabilidad de activos al actuar como un promotor de la absorción. El mecanismo por el cual el quitosán tiene esta capacidad se basa en la interacción de sus grupos amino protonados con las membranas celulares. Esta interacción, produce una reorganización estructural reversible de las proteínas de unión, abarcando también una redistribución específica del citoesqueleto de actina F y la proteína ZO-1 (Presente en las *tight junctions*), lo que conduce a la apertura de las *tight junctions* (van der Lubben, Verhoef et al. 2001) y (Amidi, Mastrobattista et al. 2010).

Así como el quitosán, el alginato también tiene la capacidad de abrir transitoriamente las *tight junctions* para mejorar la permeabilidad de la curcumina, aunque la interacción del alginato con la membrana celular es más débil debido a su carga negativa. Así mismo, el alginato tiene la capacidad de captar los iones calcio (Ca^{2+}) en el medio extracelular provocando un decremento de éste y como consecuencia la reducción del valor de TEER y el aumento de la permeabilidad celular a través de la monocapa celular, lo que sugiere que la difusión pasiva es la principal vía de transporte (Tomita, Hayashi et al. 1995) y (Guo, Ping et al. 2004).

Además de las interacciones que se llevan a cabo entre los polímeros formadores de la cubierta polimérica de las nanocápsulas con las membranas celulares, el tamaño también es un factor determinante en el aumento en la permeabilidad de curcumina a partir de NC-Q (116 ± 3.2) y NC-ALG (178 ± 7.9), siendo ésta más alta cuando la curcumina se encuentra en las NC-Q.

En el caso de la dispersión de curcumina en DMEM (F-C), la cantidad de curcumina que permeó a través de la monocapa de células Caco-2 fue muy pequeña puesto que solo una porción mínima de curcumina se encontraba en solución y la otra dispersa en DMEM (no soluble) dada la pobre solubilidad de la curcumina. La curva de calibración desarrollada no fue capaz de cuantificar confiablemente la cantidad de curcumina encontrada en el compartimiento basolateral debido a que la concentración está muy por debajo del intervalo de linealidad de ésta ($0.025 - 1 \mu\text{g/mL}$). Por lo tanto, se decidió tomar como nula la permeabilidad de la curcumina.

VIII. CONCLUSIONES

- Se diseñaron dos formulaciones de administración oral para uso veterinario consistentes en nanocápsulas poliméricas con núcleo oleoso para la liberación de curcumina en forma controlada.
- Los dos nanotransportadores están compuestos por un núcleo de vitamina E que es biodegradable y biocompatible, rodeado por una cubierta polimérica de Quitosán y Alginato respectivamente. Estos sistemas se obtuvieron por la técnica de desplazamiento de solvente modificada por G. Rivera (2012); la cubierta polimérica de las NC-ALG se forma como consecuencia de la interacción iónica entre un surfactante catiónico que se encuentra en el núcleo lipídico y el polímero, y en el caso de la cubierta polimérica de las NC-Q, ésta se forma por las interacciones electroestáticas e hidrofóbicas que se llevan a cabo entre el núcleo lipídico y este polisacárido.
- Las NC-Q y NC-ALG mostraron tamaños de partícula de 116.7 ± 3.2 y 178 ± 7.9 nm con un índice de polidispersión de 0.107 y 0.149, eficacia de encapsulación >98% y potencial Zeta de 24.4 ± 2.1 y -49.0 ± 2.3 mV respectivamente.
- Las NC-Q mostraron ser estables durante un periodo de almacenamiento de al menos 3 meses a 4° C, mientras que las NC-ALG lo son al menos por 2 meses a la misma temperatura.
- El modelo al que mejor se ajustan los datos obtenidos durante el estudio de liberación de curcumina a partir de las nanocápsulas con cubierta polimérica de quitosán (NC-Q) fue Korsmeyer-Peppas y el mecanismo de liberación de curcumina predominante es la difusión. La liberación de curcumina a partir de las nanocápsulas con cubierta polimérica de alginato (NC-ALG) se ajustó al modelo de

Higuchi y el mecanismo de liberación es un proceso de difusión basado en la ley de Fick dependiente de mecanismos de hinchamiento y erosión del polímero.

- Se evaluó la toxicidad *in vitro* de los nanosistemas (NC-Q y NC-ALG) sobre células Caco-2. Se mantuvo una viabilidad celular por arriba del 80% inclusive a una concentración polimérica por unidad de superficie de $157.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (o $600 \mu\text{g}/\text{mL}$).
- NC-Q y NC-ALG demostraron ser nanosistemas capaces de incrementar la permeabilidad de la curcumina en células Caco-2 en comparación con una suspensión de curcumina en DMEM.

IX. REFERENCIAS

1. Abdel-Mohsen, A. M., A. S. Aly, R. Hrdina and A. El-Aref (2012). "A novel method for the preparation of silver/chitosan-O-methoxy polyethylene glycol core shell nanoparticles." Journal of Polymers and the Environment **20**(2): 459-468.
2. Aigé, V. and C. Ignacio (2001). El dolor en los pequeños animales: bases neuroanatómicas, reconocimiento y tratamiento. Bases neuroatómicas del dolor C. D. Vet. España **9**: 63-70.
3. Alonso-Osorio, M. J. (2010). Plantas medicinales: Del uso tradicional al criterio científico R. A. d. F. d. Cataluña. Barcelona, España.
4. Alonso, M. J., D. Torres and V. Lozano (2010). Nanocapsulas de Poliarginina Sector de la Técnica. U. D. S. D. Compostela. España.
5. Amidi, M., E. Mastrobattista, W. Jiskoot and W. E. Hennink (2010). "Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens." Advanced Drug Delivery Reviews **62**(1): 59-82.
6. Ammon, H. P. and M. A. Wahl (1991). "Pharmacology of Curcuma longa." Planta Med **57**(1): 1-7.
7. Andrews, G. P., T. P. Laverty and D. S. Jones (2009). "Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery." Eur J Pharm Biopharm **71**(3): 505-518.
8. Anton, N., J.-P. Benoit and P. Saulnier (2008). "Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review." Journal of Controlled Release **128**(3): 185-199.
9. Anton, N., P. Gayet, J.-P. Benoit and P. Saulnier (2007). "Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion." International Journal of Pharmaceutics **344**(1-2): 44-52.
10. Arangoa, M. A., M. A. Campanero and J. M. Irache (2004). "Potencial Bioadhesivo de las Nanopartículas de Gliadina en el Estómago." Rev. Col. Cienc. Quím. Farm **33**(1): 38-47.

11. Artursson, P. (1991). "Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **8**(4): 305-330.
12. Artursson, P., K. Palm and K. Luthman (2001). "Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport." Adv Drug Deliv Rev **46**(1-3): 27-43.
13. Asane, G. S., S. A. Nirmal, K. B. Rasal, A. A. Naik, M. S. Mahadik and Y. M. Rao (2008). "Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery System: A Current Status." Drug Development and Industrial Pharmacy **34**(11): 1246-1266.
14. Asthana, S., A. K. Jaiswal, P. K. Gupta, V. K. Pawar, A. Dube and M. K. Chourasia (2013). "Immunoadjuvant chemotherapy of visceral leishmaniasis in hamsters using amphotericin B-encapsulated nanoemulsion template-based chitosan nanocapsules." Antimicrob Agents Chemother **57**(4): 1714-1722.
15. Avgoustakis, K., A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, E. Livaniou, G. Evangelatos and D. S. Ithakissios (2003). "Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles." International Journal of Pharmaceutics **259**(1-2): 115-127.
16. Baalousha, M. and J. R. Lead (2012). "Rationalizing nanomaterial sizes measured by atomic force microscopy, flow field-flow fractionation, and dynamic light scattering: sample preparation, polydispersity, and particle structure." Environ Sci Technol **46**(11): 6134-6142.
17. Began, G., E. Sudharshan and A. G. Appu Rao (1998). "Inhibition of lipoxxygenase 1 by phosphatidylcholine micelles-bound curcumin." Lipids **33**(12): 1223-1228.
18. Behling, C. A. and M. Spector (1986). "Quantitative characterization of cells at the interface of long-term implants of selected polymers." J Biomed Mater Res **20**(5): 653-666.
19. Bernardi, A., R. L. Frozza, E. Jäger, F. Figueiró, L. Bavaresco, C. Salbego, A. R. Pohlmann, S. Guterres and A. M. O. Battastini (2008). "Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study." European Journal of Pharmacology **586**(1-3): 24-34.
20. Blanco, E., A. Hsiao, A. P. Mann, M. G. Landry, F. Meric-Bernstam and M. Ferrari (2011). "Nanomedicine in cancer therapy: Innovative trends and prospects." Cancer Science **102**(7): 1247-1252.

21. Bostman, O. and H. Pihlajamaki (2000). "Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review." Biomaterials **21**(24): 2615-2621.
22. Brayden, D. J. (2003). "Controlled release technologies for drug delivery." Drug Discovery Today **8**(21): 976-978.
23. Buzea, C., I. I. Pacheco-Blandino and K. Robbie (2007). "Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity." Biointerphases **2**(4): MR17-MR71.
24. Cauchetier, E., M. Deniau, H. Fessi, A. Astier and M. Paul (2003). "Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics." International Journal of Pharmaceutics **250**(1): 273-281.
25. Combes, R. D. (2002). "The ECVAM workshops: a critical assessment of their impact on the development, validation and acceptance of alternative methods." Altern Lab Anim **30 Suppl 2**: 151-165.
26. Cordeiro, C., D. J. Wisemand, P. Lutwyche, M. Uh, J. C. Evans, B. Finlay and M. S. Webb (2000). "Antibacterial efficacy of gentamicin encapsulated in pH-sensitive liposomes against an in vivo *Salmonella enterica* serovar typhimurium intracellular infection model." Antimicrob Agents Chemother **44**(3).
27. Costa, P. and J. M. Sousa Lobo (2001). "Modeling and comparison of dissolution profiles." European Journal of Pharmaceutical Sciences **13**(2): 123-133.
28. Couvreur, P., G. Barratt, E. Fattal, P. Legrand and C. Vauthier (2002). "Nanocapsule technology: a review." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **19**(2): 99-134.
29. Couvreur, P., B. Kante, M. Roland, P. Guiot, P. Bauduin and P. Speiser (1979). "Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties." Journal of Pharmacy and Pharmacology **31**(1): 331-332.
30. Couvreur, P. and F. Puisieux (1993). "Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins." Advanced Drug Delivery Reviews **10**(2-3): 141-162.
31. Cruz, L., L. U. Soares, T. D. Costa, G. Mezzalira, N. P. da Silveira, S. S. Guterres and A. R. Pohlmann (2006). "Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers." International Journal of Pharmaceutics **313**(1-2): 198-205.

32. Daemi, H. and M. Barikani (2012). "Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles." Scientia Iranica **19**(6): 2023-2028.
33. Danhier, F., O. Feron and V. Pr at (2010). "To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery." Journal of Controlled Release **148**(2): 135-146.
34. Danhier, F., N. Lecouturier, B. Vroman, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, O. Feron and V. Pr at (2009). "Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation." Journal of Controlled Release **133**(1): 11-17.
35. De Pedro, J. (2005). "Formas farmacéuticas en veterinaria (parte 1) " Farmacia Profesional **19**(2): 74-77.
36. Del Rio, L. A. (2002). "Estudio de preformulaci n para el desarrollo de comprimidos de indometacina como sustancia policristalina." Ars Pharmaceutica **43**(1-2): 147-171.
37. Delie, F. and W. Rubas (1997). "A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **14**(3): 221-286.
38. Derakhshandeh, K., M. Erfan and S. Dadashzadeh (2007). "Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **66**(1): 34-41.
39. Dowding, P. J., R. Atkin, B. Vincent and P. Bouillot (2005). "Oil core/polymer shell microcapsules by internal phase separation from emulsion droplets. II: controlling the release profile of active molecules." Langmuir **21**(12): 5278-5284.
40. Duncan, R. (2006). "Polymer conjugates as anticancer nanomedicines." Nature Reviews Cancer **6**(9): 688-701.
41. Duvoix, A., R. Blasius, S. Delhalle, M. Schnekenburger, F. Morceau, E. Henry, M. Dicato and M. Diederich (2005). "Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin." Cancer Letters **223**(2): 181-190.
42. Exp sito-Harris, R. (2010). Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

43. Fahmy, T. M., R. M. Samstein, C. C. Harness and W. M. Saltzman (2005). "Surface modification of biodegradable polyesters with fatty acid conjugates for improved drug targeting." Biomaterials **26**(28): 5727-5736.
44. Fessi, H., F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita (1989). "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement." International Journal of Pharmaceutics **55**(1): R1-R4.
45. Fischer, D., Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein and T. Kissel (2003). "In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis." Biomaterials **24**(7): 1121-1131.
46. Fountain, C. W., J. Jennings, C. K. McKie, P. Oakman and M. L. Fetterolf (1997). "Viscosity of Common Seed and Vegetable Oils." Journal of Chemical Education **74**(2): 224.
47. Fresta, M., G. Cavallaro, G. Giammona, E. Wehrli and G. Puglisi (1996). "Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs." Biomaterials **17**(8): 751-758.
48. Fukushima, K., D. Tabuani, M. Dottori, I. Armentano, J. M. Kenny and G. Camino (2011). "Effect of temperature and nanoparticle type on hydrolytic degradation of poly(lactic acid) nanocomposites." Polymer Degradation and Stability **96**(12): 2120-2129.
49. Garcia-Fuentes, M., C. Prego, D. Torres and M. J. Alonso (2005). "A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery." European Journal of Pharmaceutical Sciences **25**(1): 133-143.
50. George, M. and T. E. Abraham (2006). "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review." J Control Release **114**(1): 1-14.
51. Georgieva, J. V., D. Kalicharan, P.-O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler, D. Hoekstra and I. S. Zuhorn (2011). "Surface characteristics of nanoparticles determine their intracellular fate in and processing by human blood-brain barrier endothelial cells in vitro." Mol Ther **19**(2): 318-325.
52. Gombotz, W. R. and S. Wee (1998). "Protein release from alginate matrices." Advanced Drug Delivery Reviews **31**(3): 267-285.

53. Goycoolea, F. M., C. Remuñán-López and M. J. Alonso (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano. Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. R. A. N. d. F. Instituto de España. Madrid, España: 103-131.
54. Goycoolea, F. M., Remuñán-López, C., Alonso, J. M. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. R. A. N. d. F. Instituto de España. Madrid, España: 409.
55. Guinebrière, S., S. Briançon, J. Lieto, C. Mayer and H. Fessi (2002). "Study of the emulsion-diffusion of solvent: preparation and characterization of nanocapsules." Drug Development Research **57**(1): 18-33.
56. Guo, J., Q. Ping, G. Jiang, J. Dong, S. Qi, L. Feng, Z. Li and C. Li (2004). "Transport of leuprolide across rat intestine, rabbit intestine and Caco-2 cell monolayer." International Journal of Pharmaceutics **278**(2): 415-422.
57. Guterres, S., H. Fessi, G. Barratt, F. Puisieux and J.-P. Devissaguet (1995). "Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Containing Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Gastrointestinal Tolerance Following Intravenous and Oral Administration." Pharmaceutical Research **12**(10): 1545-1547.
58. Guyton, A. C. and J. E. Hall (1997). Tratado de Fisiología Medica. Estados Unidos de América.
59. He, C., Y. Hu, L. Yin, C. Tang and C. Yin (2010). "Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles." Biomaterials **31**(13): 3657-3666.
60. Hervella, P., G. Lollo, F. Oyarzun-Ampuero, G. Rivera, D. Torres and M. J. Alonso (2011). Nanocapsules as Carriers for the Transport and Targeted Delivery of Bioactive Molecules. Nanocomposite Particles for Bio-Applications, Pan Stanford Publishing: 45-67.
61. Hervella, P., V. Lozano, M. Garcia-Fuentes and M. J. Alonso (2008). "Nanomedicine: New Challenges and Opportunities in Cancer Therapy." Journal of Biomedical Nanotechnology **4**(3): 276-292.
62. Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust and J.-P. Benoit (2002). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. New York, NY, ETATS-UNIS, Springer.

63. Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust and J.-P. Benoit (2002). "A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers." Pharmaceutical Research **19**(6): 875-880.
64. Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust and J.-P. Benoit (2003). "Physico-chemical stability of colloidal lipid particles." Biomaterials **24**(23): 4283-4300.
65. Hilgendorf, C., G. Ahlin, A. Seithel, P. Artursson, A.-L. Ungell and J. Karlsson (2007). "Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines." Drug Metab Dispos **35**(8): 1333-1340.
66. Hillegass, J. M., A. Shukla, S. A. Lathrop, M. B. MacPherson, N. K. Fukagawa and B. T. Mossman (2010). "Assessing nanotoxicity in cells in vitro." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol **2**(3): 219-231.
67. Hofheinz, R. D., S. U. Gnad-Vogt, U. Beyer and A. Hochhaus (2005). "Liposomal encapsulated anti-cancer drugs." Anticancer Drugs **16**(7): 691-707.
68. Holder, G. M., J. L. Plummer and A. J. Ryan (1978). "The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat." Xenobiotica **8**(12): 761-768.
69. Hu, Y., X. Jiang, Y. Ding, H. Ge, Y. Yuan and C. Yang (2002). "Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles." Biomaterials **23**(15): 3193-3201.
70. Huang, M., E. Khor and L. Y. Lim (2004). "Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation." Pharm Res **21**(2): 344-353.
71. IMPI. (2010). "Gaceta de Marcas Registradas, Avisos y Nombres Comerciales y Denominaciones de Origen.", from <http://siga.impi.gob.mx/>.
72. Jiang, B., L. Hu, C. Gao and J. Shen (2005). "Ibuprofen-loaded nanoparticles prepared by a co-precipitation method and their release properties." International Journal of Pharmaceutics **304**(1-2): 220-230.
73. Jornada, D. S., L. A. Fiel, K. Bueno, J. F. Gerent, C. L. Petzhold, R. C. R. Beck, S. S. Guterres and A. R. Pohlmann (2012). "Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity." Soft Matter **8**(24): 6646-6655.

74. Jurenka, J. S. (2009). "Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research." Altern Med Rev **14**(2): 141-153.
75. Kato, Y., H. Onishi and Y. Machida (2003). "Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field." Curr Pharm Biotechnol **4**(5): 303-309.
76. Khalil, N. M., T. C. F. d. Nascimento, D. M. Casa, L. F. Dalmolin, A. C. d. Mattos, I. Hoss, M. A. Romano and R. M. Mainardes (2013). "Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **101**(0): 353-360.
77. Khayata, N., W. Abdelwahed, M. F. Chehna, C. Charcosset and H. Fessi (2012). "Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor." International Journal of Pharmaceutics **423**(2): 419-427.
78. Kim, S., J. E. Choi, J. Choi, K.-H. Chung, K. Park, J. Yi and D.-Y. Ryu (2009). "Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells." Toxicol In Vitro **23**(6): 1076-1084.
79. Lanza, F. L., M. F. Rack, T. J. Simon, H. Quan, J. A. Bolognese, M. E. Hoover, F. R. Wilson and S. E. Harper (1999). "Specific inhibition of cyclooxygenase-2 with MK-0966 is associated with less gastroduodenal damage than either aspirin or ibuprofen." Aliment Pharmacol Ther **13**(6): 761-767.
80. Legrand, P., G. Barratt, V. Mosqueira, H. Fessi and J. P. Devissaguet (1999). Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. Paris, FRANCE, Editions de santé.
81. Li, X., X. Deng and Z. Huang (2001). "In vitro protein release and degradation of poly-dl-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped human serum albumin: quantitative evaluation of the factors involved in protein release phases." Pharm Res **18**(1): 117-124.
82. Lian, T. and R. J. Y. Ho (2001). "Trends and developments in liposome drug delivery systems." Journal of Pharmaceutical Sciences **90**(6): 667-680.
83. Lim, J. H. and J. S. Lee (2008). "A statistical design and analysis illustrating the interactions between key experimental factors for the synthesis of silver nanoparticles." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **322**(1-3): 155-163.

84. Limayem Blouza, I., C. Charcosset, S. Sfar and H. Fessi (2006). "Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use." International Journal of Pharmaceutics **325**(1–2): 124-131.
85. Liu, Y., H. Miyoshi and M. Nakamura (2007). "Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles." Int J Cancer **120**(12): 2527-2537.
86. Liu, Y., M. Tourbin, S. Lachaize and P. Guiraud (2013). "Silica nanoparticles separation from water: Aggregation by cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)." Chemosphere **92**(6): 681-687.
87. Lollo, G. (2012). Nanocápsulas de poliaminoácidos para la liberación selectiva de fármacos antitumorales. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela.
88. Ma, H.-l., X.-r. Qi, Y. Maitani and T. Nagai (2007). "Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate." International Journal of Pharmaceutics **333**(1–2): 177-186.
89. Madheswaran, T., R. Baskaran, C. S. Yong and B. K. Yoo (2013). "Enhanced Topical Delivery of Finasteride Using Glyceryl Monooleate-Based Liquid Crystalline Nanoparticles Stabilized by Cremophor Surfactants." AAPS PharmSciTech.
90. Majithiya, R. J. and R. S. Murthy (2005). "Chitosan-based mucoadhesive microspheres of clarithromycin as a delivery system for antibiotic to stomach." Curr Drug Deliv **2**(3): 235-242.
91. Malam, Y., M. Loizidou and A. M. Seifalian (2009). "Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer." Trends in Pharmacological Sciences **30**(11): 592-599.
92. Malvern-Instruments (2012). An Introduction to DLS Microrheology. Worcestershire, UK: 20.
93. Marambio-Retamal, H. P. (2007). Evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas de oro conjugadas al péptido CLPFFD-NH₂. Tesis Doctoral Universidad de Chile.
94. Mason, T. G., J. N. Wilking, K. Meleson, C. B. Chang and S. M. Graves (2006). "Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties." Journal of Physics: Condensed Matter **18**(41): 33.

95. Medina, C., M. J. Santos-Martinez, A. Radomski, O. I. Corrigan and M. W. Radomski (2007). "Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance." British Journal of Pharmacology **150**(5): 552-558.
96. Mesa, M. D., M. C. Ramírez-Tortosa, C. M. Aguilera, A. Ramírez-Bosca and A. Gil (2000). "Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de Curcuma longa L. y de los cucuminoides." Ars Pharmaceutica **41**(3).
97. Metselaar, J. M., M. H. Wauben, J. P. Wagenaar-Hilbers, O. C. Boerman and G. Storm (2003). "Complete remission of experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes." Arthritis Rheum **48**(7): 2059-2066.
98. Mohanraj, V. J. and Y. Chen (2006). "Nanoparticles. A Review." Journal of Pharmaceutical Research **5**(1): 561-573.
99. Moitzi, C., S. Guillot, G. Fritz, S. Salentinig and O. Glatter (2007). "Phase Reorganization in Self-Assembled Systems Through Interparticle Material Transfer." Advanced Materials **19**(10): 1352-1358.
100. Mora-Huertas, C. E., H. Fessi and A. Elaissari (2010). "Polymer-based nanocapsules for drug delivery." International Journal of Pharmaceutics **385**(1-2): 113-142.
101. Moraes, C. M., A. P. de Matos, E. de Paula, A. H. Rosa and L. F. Fraceto (2009). "Benzocaine loaded biodegradable poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization." Materials Science and Engineering: B **165**(3): 243-246.
102. Mundargi, R. C., V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel and T. M. Aminabhavi (2008). "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives." J Control Release **125**(3): 193-209.
103. Nafee, N., M. Schneider, U. F. Schaefer and C.-M. Lehr (2009). "Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile." International Journal of Pharmaceutics **381**(2): 130-139.
104. Niwa, T., H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou and Y. Kawashima (1993). "Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior." Journal of Controlled Release **25**(1-2): 89-98.

- 105.** Nordtveit, R. J., K. M. Varum and O. Smidsrod (1996). "Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme." Carbohydrate Polymers **29**(2): 163-167.
- 106.** Oliveira, P. R., C. Mendes, L. Klein, M. d. S. Sangoi, L. S. Bernardi and M. A. S. Silva (2013). "Formulation Development and Stability Studies of Norfloxacin Extended-Release Matrix Tablets." BioMed Research International **2013**: 9.
- 107.** Orive, G., A. M. Carcaboso, R. M. Hernández, A. R. Gascón and J. L. Pedraz (2005). "Biocompatibility Evaluation of Different Alginates and Alginate-Based Microcapsules." Biomacromolecules **6**(2): 927-931.
- 108.** Owens III, D. E. and N. A. Peppas (2006). "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles." International Journal of Pharmaceutics **307**(1): 93-102.
- 109.** Pan, M.-H., T.-M. Huang and J.-K. Lin (1999). "Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice." Drug Metab Dispos **27**(4): 486-494.
- 110.** Papich, M. G. (2008). "An Update on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Small Animals." Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice **38**(6): 1243-1266.
- 111.** Park, H. and K. Y. Lee (2008). Alginate hydrogels as matrices for tissue engineering. En: Natural-based polymers for biomedical applications. Natural-based polymers for biomedical applications. W. Publishing. Cambridge, Inglaterra: 515-532.
- 112.** Park, M.-J., P. Balakrishnan and S.-G. Yang (2013). "Polymeric nanocapsules with SEDDS oil-core for the controlled and enhanced oral absorption of cyclosporine." International Journal of Pharmaceutics **441**(1-2): 757-764.
- 113.** Pasternak, A. S. and W. M. Miller (1996). "Measurement of trans-epithelial electrical resistance in perfusion: potential application for in vitro ocular toxicity testing." Biotechnol Bioeng **50**(5): 568-579.
- 114.** Patel, B. K., R. H. Parikh and P. S. Aboti (2013). "Development of Oral Sustained Release Rifampicin Loaded Chitosan Nanoparticles by Design of Experiment." Journal of Drug Delivery **2013**: 10.

115. Pawar, Y. B., H. Purohit, G. R. Valicherla, B. Munjal, S. V. Lale, S. B. Patel and A. K. Bansal (2012). "Novel lipid based oral formulation of curcumin: Development and optimization by design of experiments approach." International Journal of Pharmaceutics **436**(1–2): 617-623.
116. Pepić, I., J. Filipović-Grčić and I. Jalšenjak (2008). "Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **327**(1–3): 95-102.
117. Perez, C., A. Sanchez, D. Putnam, D. Ting, R. Langer and M. J. Alonso (2001). "Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA." Journal of Controlled Release **75**(1–2): 211-224.
118. Perilla, J. E. (2008). Desarrollo de materiales bioadherentes y biodegradables a partir de copolímeros derivados del ácido láctico. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia.
119. PLM (2011). Prontuario de Especialidades Veterinarias.
120. Pohlmann, A. R., G. Mezzalira, C. d. G. Venturini, L. Cruz, A. Bernardi, E. Jäger, A. M. O. Battastini, N. P. da Silveira and S. S. Guterres (2008). "Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content." International Journal of Pharmaceutics **359**(1–2): 288-293.
121. Prabhakara, V., T. Bibib and M. Aslam (2013). "Nanocapsules: A Self-assembly Approach Towards Future Medicine " International Journal of Current Engineering and Technology **3**(3): 977-982.
122. Prego, C., M. Fabre, D. Torres and M. J. Alonso (2006). "Efficacy and Mechanism of Action of Chitosan Nanocapsules for Oral Peptide Delivery." Pharmaceutical Research **23**(3): 549-556.
123. Prego, C., M. García, D. Torres and M. J. Alonso (2005). "Transmucosal macromolecular drug delivery." Journal of Controlled Release **101**(1–3): 151-162.
124. Prego, C., D. Torres, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, E. Quiñoá and M. J. Alonso (2006). "Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree." Journal of Controlled Release **111**(3): 299-308.
125. Quintanar-Guerrero, D. (1997). Tesis Doctoral N° 2950, Universidad de Ginebra.

126. Ramírez-Cabrera, M. A. (2010). Evaluación de la cinética de distribución y toxicidad de las nanopartículas de plata. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Nuevo León.
127. Rampino, A., M. Borgogna, P. Blasi, B. Bellich and A. Cesàro (2013). "Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability." International Journal of Pharmaceutics **455**(1–2): 219-228.
128. Reich, G. (1997). "In Vitro Stability of Poly(D,L-lactide) and Poly(D,L-lactide)/Poloxamer Nanoparticles in Gastrointestinal Fluids." Drug Development and Industrial Pharmacy **23**(12): 1191-1200.
129. Rivera, G. R. (2012). Nuevos Transportadores de Fármacos: Nanocápsulas de Poliarginina y Caseína. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela.
130. Rodrigues, S., M. Dionísio, C. R. López and A. Grenha (2012). "Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery." Journal of Functional Biomaterials **3**(3): 615-641.
131. Rodríguez, I. C., A. Cerezo and I. I. Salem (2000). "Sistemas de liberación Bioadhesivos." Ars Pharmaceutica **41**(1): 115-128.
132. Rokhati, N., P. Widjajanti, B. Pramudono and H. Susanto (2013). "Performance Comparison of α and β -Amylases on Chitosan Hydrolysis." ISRN Chemical Engineering **2013**: 5.
133. Roscigno, P., G. D'Auria, L. Falcigno, G. D'Errico and L. Paduano (2005). "Effect of the addition of a nonionic surfactant on the complex poly(asparagine)-cationic surfactant." Langmuir **21**(18): 8123-8130.
134. Rose, J. S., J. M. Neal and D. J. Kopacz (2005). Extended-duration analgesia : Update on microspheres and liposomes. Philadelphia, PA, ETATS-UNIS, Elsevier.
135. Sambuy, Y., I. De Angelis, G. Ranaldi, M. L. Scarino, A. Stammati and F. Zucco (2005). "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics." Cell Biol Toxicol **21**(1): 1-26.
136. Santander-Ortega, M., M. Lozano-López, D. Bastos-González, J. Peula-García and J. Ortega-Vinuesa (2010). "Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces." Colloid and Polymer Science **288**(2): 159-172.

137. Santander-Ortega, M. J., A. B. Jódar-Reyes, N. Csaba, D. Bastos-González and J. L. Ortega-Vinuesa (2006). "Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms." Journal of Colloid and Interface Science **302**(2): 522-529.
138. Santander-Ortega, M. J., J. M. Peula-García, F. M. Goycoolea and J. L. Ortega-Vinuesa (2011). "Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **82**(2): 571-580.
139. Santos-Magalhães, N. S., A. Pontes, V. M. W. Pereira and M. N. P. Caetano (2000). "Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules." International Journal of Pharmaceutics **208**(1-2): 71-80.
140. Sathyanarayanan, P. and G. Raina (2009). "Coating Thickness study of Biopolymer-Magnetite Core-Shell Nanoparticles." International Journal of Nanoscience **08**(04n05): 359-366.
141. Scherließ, R. (2011). "The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells." International Journal of Pharmaceutics **411**(1-2): 98-105.
142. Schipper, N. G., K. M. Varum and P. Artursson (1996). "Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells." Pharm Res **13**(11): 1686-1692.
143. Schipper, N. G. M., K. M. Vårum, P. Stenberg, G. Ocklind, H. Lennernäs and P. Artursson (1999). "Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs: 3: Influence of mucus on absorption enhancement." European Journal of Pharmaceutical Sciences **8**(4): 335-343.
144. Schliemann, C. and D. Neri (2007). "Antibody-based targeting of the tumor vasculature." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **1776**(2): 175-192.
145. Sharma, R. A., A. J. Gescher and W. P. Steward (2005). "Curcumin: the story so far." Eur J Cancer **41**(13): 1955-1968.
146. Sharma, R. A., W. P. Steward and A. J. Gescher (2007). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin." Adv Exp Med Biol **595**: 453-470.

147. Shrivastava, S., T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao and D. Dash (2007). "Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles." Nanotechnology **18**(22).
148. Siqueira-Moura, M. P., F. L. Primo, E. M. Espreafico and A. C. Tedesco (2013). "Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules." Materials Science and Engineering: C **33**(3): 1744-1752.
149. Smart, J. D. (2005). "The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion." Advanced Drug Delivery Reviews **57**(11): 1556-1568.
150. Smart, J. D., I. W. Kellaway and H. E. C. Worthington (1984). "An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery." Journal of Pharmacy and Pharmacology **36**(5): 295-299.
151. Smith, R., C. Oliver and D. F. Williams (1987). "The enzymatic degradation of polymers in vitro." J Biomed Mater Res **21**(8): 991-1003.
152. Soppimath, K. S., T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni and W. E. Rudzinski (2001). "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices." Journal of Controlled Release **70**(1-2): 1-20.
153. Strober, W. (2001). "Trypan blue exclusion test of cell viability." Curr Protoc Immunol **Appendix 3**: Appendix 3B.
154. Sun, C., R. Qu, H. Chen, C. Ji, C. Wang, Y. Sun and B. Wang (2008). "Degradation behavior of chitosan chains in the 'green' synthesis of gold nanoparticles." Carbohydrate Research **343**(15): 2595-2599.
155. Tadros, T., P. Izquierdo, J. Esquena and C. Solans (2004). "Formation and stability of nano-emulsions." Advances in Colloid and Interface Science **108-109**(0): 303-318.
156. Tomita, M., M. Hayashi and S. Awazu (1995). "Absorption-enhancing mechanism of sodium caprate and decanoylcarnitine in Caco-2 cells." J Pharmacol Exp Ther **272**(2): 739-743.
157. Underwood, C. and A. W. Van Eps (2012). "Nanomedicine and veterinary science: the reality and the practicality." Vet J **193**(1): 12-23.
158. Underwood, C. and A. W. Van Eps (2012). "Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality." The Veterinary Journal **193**(1): 12-23.

159. Van de Ven, H., M. Vermeersch, A. Matheussen, J. Vandervoort, W. Weyenberg, S. Apers, P. Cos, L. Maes and A. Ludwig (2011). "PLGA nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin β -aescin: Factor influence study and in vitro efficacy evaluation." International Journal of Pharmaceutics **420**(1): 122-132.
160. van der Lubben, I. M., J. C. Verhoef, G. Borchard and H. E. Junginger (2001). "Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery." European Journal of Pharmaceutical Sciences **14**(3): 201-207.
161. Vandervoort, J. and A. Ludwig (2002). "Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study." International Journal of Pharmaceutics **238**(1-2): 77-92.
162. Venkataraman, S., J. L. Hedrick, Z. Y. Ong, C. Yang, P. L. R. Ee, P. T. Hammond and Y. Y. Yang (2011). "The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery." Advanced Drug Delivery Reviews **63**(14-15): 1228-1246.
163. Vicent, M. J. and R. Duncan (2006). "Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer." Trends in Biotechnology **24**(1): 39-47.
164. Vila-Jato, J. L. (2008). Repercusiones de la Nanotecnología Farmaceutica en la Farmacoterapia del Cancer. Introduccion a la Nanotecnología S. A. L. Artes Gráficas Vicus. Santiago de Compostela.
165. Vila-Jato, J. L. (2009). Nanotecnología farmacéutica: realidades y posibilidades farmacoterapéuticas, Real Academia Nacional de Farmacia.
166. Wagner, V., A. Dullaart, A.-K. Bock and A. Zweck (2006). "The emerging nanomedicine landscape." Nat Biotechnol **24**(10): 1211-1217.
167. Wang, M. and M. Thanou (2010). "Targeting nanoparticles to cancer." Pharmacological Research **62**(2): 90-99.
168. Wang, X. and H. G. Spencer (1998). "Calcium alginate gels: formation and stability in the presence of an inert electrolyte." Polymer **39**(13): 2759-2764.
169. Wehrle, P., B. Magenheimer and S. Benita (1995). The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design. Amsterdam, PAYS-BAS, Elsevier.
170. Williams, D. F. (1992). "Mechanisms of biodegradation of implantable polymers." Clinical Materials **10**(1-2): 9-12.

171. Xiang, Y., Y. Liu, B. Mi and Y. Leng (2013). "Hydrated Polyamide Membrane and Its Interaction with Alginate: A Molecular Dynamics Study." Langmuir **29**(37): 11600-11608.
172. Yan, F., C. Zhang, Y. Zheng, L. Mei, L. Tang, C. Song, H. Sun and L. Huang (2010). "The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **6**(1): 170-178.
173. Yliperttula, M. and A. Urtti (2009). Nanotechnology for Improved Drug Bioavailability. Drug Bioavailability, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 597-611.
174. Yu, L. X., G. L. Amidon, J. E. Polli, H. Zhao, M. U. Mehta, D. P. Conner, V. P. Shah, L. J. Lesko, M. L. Chen, V. H. Lee and A. S. Hussain (2002). "Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions." Pharm Res **19**(7): 921-925.
175. Zhang, Y., M. Huo, J. Zhou, A. Zou, W. Li, C. Yao and S. Xie (2010). "DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles." The AAPS Journal **12**(3): 263-271.
176. Zhou, H., Y. Yue, G. Liu, Y. Li, J. Zhang, Q. Gong, Z. Yan and M. Duan (2010). "Preparation and Characterization of a Lecithin Nanoemulsion as a Topical Delivery System." Nanoscale Research Letters **5**(1): 224-230.
177. Zili, Z., S. Sfar and H. Fessi (2005). "Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin." International Journal of Pharmaceutics **294**(1-2): 261-267.

X. ANEXO I

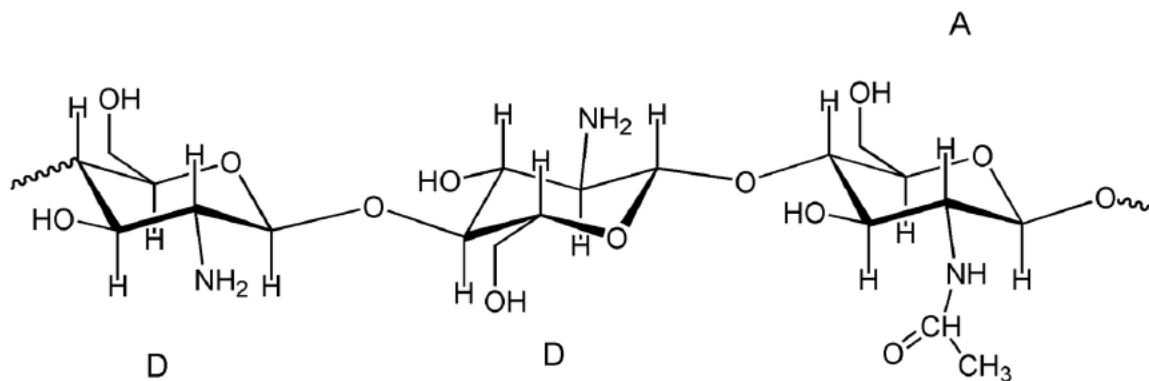
DISOLUCIÓN ESTEQUIOMÉTRICA DE QUITOSÁN: PROCEDIMIENTO GENERAL PARA DISOLVER QUITOSÁN EN SOLUCIONES DILUIDAS DE ÁCIDO ACÉTICO

Procedimiento:

1. Grado de acetilación (%DA): Relación molar de residuos acetilados (“A”) con el número total de residuos (“A” + “D”) en la molécula del polímero.

$$PM = 162.16 \text{ g/mol (o } 197.618 \text{ para Quitosán-HCl)}$$

$$PM = 204.09 \text{ g/mol}$$



2. El promedio de masa molar (MCS) por residuo de polímero es:

$$MCS = 162.16 * [1 - (DA/100)] + 204.09 * (DA/100) = \text{“D”} + \text{“A”}$$

Donde DA = % mol de residuos desacetilados (Residuos D)

3. Número de moles de amina en la molécula de polímero, n_{NH_2} :

$$n_{\text{NH}_2} = m_{\text{CS}} * (1-\text{DA} / 100) / M_{\text{CS}}$$

Donde, m_{CS} = masa de quitosán (g)

4. Solubilización estequiométrica (CS) en un exceso del 5% de ácido acético (HAc) 100%.

La masa de HAc (g) por agregar está dada por:

$$m_{\text{CH}_3\text{COOH}} = M_{\text{HAc}} * n_{\text{NH}_2} * 1.05$$

Donde, M_{HAc} = Peso molecular HAc (60.0529 g/mol)

5. El volumen de HAc (mL) a adicionar:

$$\text{Vol} = m_{\text{CH}_3\text{COOH}} / \rho_{\text{CH}_3\text{COOH}}$$

Donde, $\rho_{\text{CH}_3\text{COOH}}$ = 1.048 g/mL (densidad HAc 100%)

XI. ANEXO II

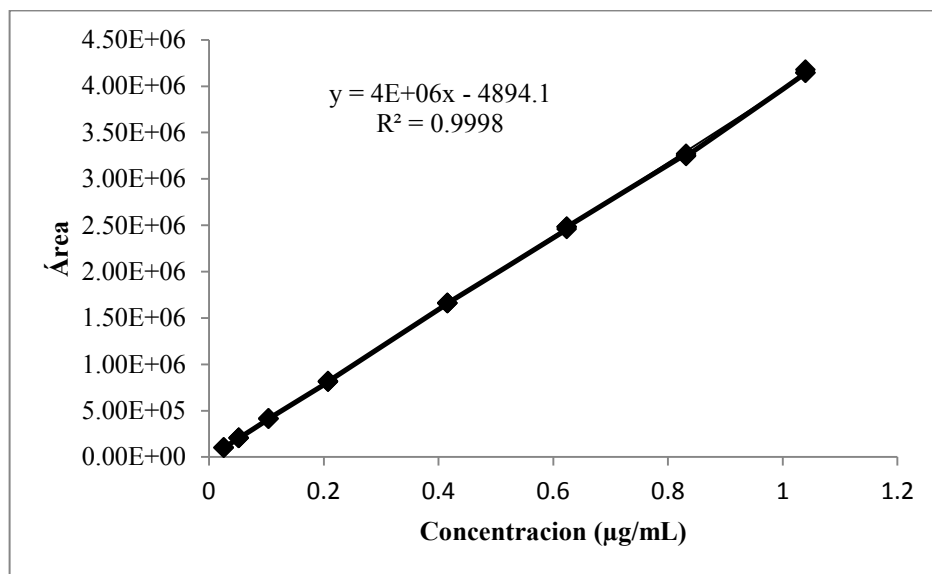
CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE CURCUMINA POR HPLC-DAD

Condiciones de análisis:

- Columna: C8 150mm X 3mm X 5 μ m
- Fase móvil: Acetonitrilo: H₂O (45:55)
- Velocidad de flujo: 0.5 mL/min
- Volumen de inyección: 80 μ L

Curva de Calibración			10% Solventes (Acetonitrilo)		
Conc. (μ g/mL)	Área	Área/Conc.	Conc. (μ g/mL)	Área	Área/Conc.
0.026	99461	3825423.077	0.416	1655988	3980740.385
0.026	99651	3832730.769	0.416	1659747	3989776.442
0.026	99995	3845961.538	0.416	1660209	3990887.019
0.052	204351	3929826.923	0.624	2456139	3936120.192
0.052	208309	4005942.308	0.624	2483068	3979275.641
0.052	202888	3901692.308	0.624	2482884	3978980.769
0.104	410331	3945490.385	0.832	3269798	3930045.673
0.104	412434	3965711.538	0.832	3252296	3909009.615
0.104	413624	3977153.846	0.832	3245546	3900896.635
0.208	809421	3891447.115	1.04	4141916	3982611.538
0.208	809547	3892052.885	1.04	4177711	4017029.808
0.208	816919	3927495.192	1.04	4145261	3985827.885

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA REGRESIÓN	VALOR OBTENIDO
r	0.9998
r²	0.9997
Pendiente	3970820.86
Intercepto	-4894.06
C. V.	1.3853
IC (Bo)	-19099.90 a 9311.78



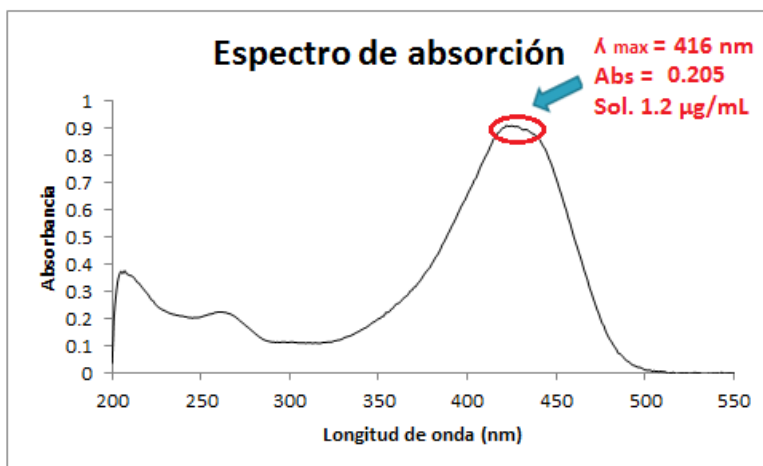
- Solubilidad de la curcumina en medio ácido (HCl pH=1.2) con Tween 80 (n=2)

% TWEEN 80	CONCENTRACIÓN (µg/mL)
0.1	19.48
0.2	29.94
0.3	38.83

XII. ANEXO III

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE CURCUMINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV

- Curva de calibración en acetonitrilo (100%)



Conc. (µg/mL)	Abs	ε
0.2048	0.034	0.166
0.2048	0.034	0.166
0.2048	0.035	0.171
0.4096	0.068	0.166
0.4096	0.068	0.159
0.4096	0.068	0.166
0.8192	0.136	0.166
0.8192	0.136	0.166
0.8192	0.137	0.167
1.2288	0.205	0.167
1.2288	0.204	0.166
1.2288	0.205	0.167
1.6384	0.272	0.166
1.6384	0.272	0.165
1.6384	0.272	0.166

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA REGRESIÓN	VALOR OBTENIDO
r	0.9999
r²	0.9998
Pendiente	0.1690
Intercepto	0.00003
C. V.	1.4560
IC (Bo)	-0.0013 a 0.0012

