



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ACARREADORES
LIPÍDICOS NANOESTRUCTURADOS CONTENIENDO CURCUMINOIDES PARA
SU ADMINISTRACIÓN TÓPICA**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE :

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. MARCO ANTONIO ESPINOSA OLIVARES

TUTORA:

**DRA. ADRIANA GANEM RONDERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

COMITÉ TUTOR:

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

**DRA. DRA. ELIZABETH PIÑÓN SEGUNDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2021



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM

A los integrantes del examen de candidatura y comité tutor ampliado:

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra (Facultad de Química, UNAM)

Al Dr. Andrés Navarrete Castro (Facultad de Química, UNAM)

Al Dr. Emilio Bucio Carrillo (Facultad de Química, UNAM)

A la Dra. Luz María Melgoza Contreras (UAM-Xochimilco)

A mi tutora Dra. Adriana Ganem Rondero (FES-Cuautitlán, UNAM)

A los integrantes del comité tutor:

Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook (Facultad de Química, UNAM)

Dra. Elizabeth Piñón Segundo (FES-Cuautitlán, UNAM)

A los colaboradores del proyecto:

A la Dra. Yolanda Irasema Chirino López (FES-Iztacala, UNAM)

A la Dra. Norma L. Delgado Buenrostro (FES-Iztacala, UNAM)

A la Dra. María Andrea Trejo Márquez (FES-Cuautitlán, UNAM)

A la Maestra Selene Pascual Bustamante (FES-Cuautitlán, UNAM)

Al Proyecto PAPIIT IN226119 y al Proyecto PI-API2021 por el apoyo financiero que permitió el buen desarrollo del trabajo

DEDICATORIA

Al creador por la vida y todo lo que ha construido a mí alrededor.

A mis Padres Sara Olivares y Antonio Espinosa por haberme dado la vida, valores, educación, un hogar donde crecer, equivocarme, aprender, desarrollarme, amor y su apoyo en todo momento.

A mi esposa Martha Patricia y mi hijo Marco A. Espinosa Saldaña por llegar a mi vida y llenarme de felicidad, amor, entusiasmo y comprensión.

A mis hermanas y sobrinos porque me hacen sentir especial.

A la Dra. Adriana Ganem por formarme y confiar en mí como si fuera parte de mi familia.

A la Química Paola Olleroides y Químico Sixto Espinoza por su apoyo en el proyecto.

A mis colegas y amigos: Lupita Nava, Angélica Villanueva, Laura Hernández, Marce Vargas, Iris Quiroz, Miguel Romero, Sergio Bernal, Sergio Miranda, Alegre Flores, Pamela Barbosa, Tere Pineda, Miguel Reyes, Juan Nevero, Carlos Palma, Janette Márquez, Claudia Farfán, Viridiana Martínez, Ernesto Cuahutencos, Rene Rebollo, Daniel Ruiz, Jonathan Mercadillo, Jonathan González, Joel Arenas y todos aquellos que han estado presente durante el trayecto de mi vida. De alguna forma enriqueciéndome con sus comentarios.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: ANDRÉS NAVARRETE CASTRO

VOCAL: HELGI HELEN FRANCISCA JUNG COOK

VOCAL: LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS

VOCAL: MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

SECRETARIO: GERARDO LEYVA GÓMEZ

LUGAR DONDE SE DESARROLLO LA INVESTIGACIÓN

Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica (L-322, Campo 1),
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México,
Av. 1º de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, 54740, Estado de México, México.

Laboratorio 10, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala,
Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios Número 1, Colonia
Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, C.P. 54090, México.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas (AFM), Septiembre 2017, Tequila, Jalisco, México, *“Preparación y caracterización de acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) conteniendo curcuminoides para aplicación tópica”*.

Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas (AFM), Septiembre 2018, Puerto Vallarta, Jalisco, México, *“Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) conteniendo curcuminoides para mejorar la penetración tópica como posibles sistemas antioxidantes”*.

PUBLICACIÓN

M.A. Espinosa-Olivares, N.L. Delgado-Buenrostro, Y.I. Chirino, M.A. Trejo-Márquez, S. Pascual-Bustamante, A. Ganem-Rondero, *Nanostructured lipid carriers loaded with curcuminoids: Physicochemical characterization, in vitro release, ex vivo skin penetration, stability and antioxidant activity*, European Journal of Pharmaceutical Science. 155 (2020), 105533.

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	5
2.1 Piel.....	5
2.1.1 Generalidades de la piel	5
2.1.2 Estructura de la piel	5
2.1.3 Consideraciones morfológicas de la piel como barrera	6
2.1.4 Protección contra la radiación ultravioleta y pigmentación	7
2.1.5 Mecanismos de penetración a través de la piel.....	8
2.1.6 Penetración de nanopartículas en la piel	9
2.1.7 Comportamiento de los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) en la piel.....	9
2.2 Enfermedades de la piel (estrés oxidativo).....	10
2.2.1 Papel de los oxidantes en las enfermedades de la piel	10
2.2.2 Oxidantes en la piel.....	10
2.2.3 Radicales libres / Estrés oxidativo	11
2.2.4 Antioxidantes en la piel.....	12
2.3 Generalidades de la Cúrcuma	20
2.3.1 Antecedentes de la cúrcuma	21
2.3.2 Obtención de los curcuminoides.....	21
2.3.3 Composición química, propiedades y estructura de la curcumina.....	23
2.3.4 Principales usos de la cúrcuma y curcumina	26
2.3.5 Biodisponibilidad y toxicidad	29
2.3.6 Actividad antioxidante.....	31
2.4 Nanopartículas	32
2.4.1 Nanotecnología y nanopartículas	32
2.4.2 Nanopartículas lipídicas.....	32
2.4.3 Acarreadores lipídicos nanoestructurados.....	33
2.4.4 La función del tensoactivo	34
2.4.5 Métodos de preparación.....	35
III. HIPÓTESIS	37
IV. OBJETIVOS.....	37
V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	38
5.1 Materiales	38
5.2 Equipos	38
5.3 Material biológico.....	39

5.4	Preparación de acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados de curcuminoides	39
5.5	Caracterización de nanopartículas conteniendo curcuminoides	41
5.6	Morfología de los sistemas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)	42
5.7	Liberación <i>in vitro</i> de curcuminoides a partir de los NLC	42
5.8	Permeación <i>ex vivo</i> con piel de cerdo	43
5.9	Profundidad de penetración y distribución <i>ex vivo</i> de curcuminoides en piel de cerdo mediante microscopía de escaneo láser confocal	44
5.10	Métodos analíticos para la cuantificación de curcuminoides	45
5.11	Prueba de estabilidad	45
5.12	Actividad antioxidante	46
5.13	Análisis estadístico	46
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1	Preparación de acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados de curcuminoides	47
6.2	Caracterización de los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados de curcuminoides	50
6.3	Perfil de liberación <i>in vitro</i> de NLC cargados de curcuminoides	52
6.4	Permeabilidad <i>ex vivo</i> de curcuminoides a través de piel de cerdo	54
6.5	Profundidad de penetración y perfil de distribución de curcuminoides en piel de cerdo <i>ex vivo</i> mediante microscopía de escaneo láser confocal	56
6.6	Estabilidad y actividad antioxidante	62
VII.	CONCLUSIONES	69
VIII.	REFERENCIAS	70
IX.	ANEXOS	78
Anexo I.	Caracterización de las formulaciones	78
Anexo II.	Perfiles de Liberación y ajuste a modelos	81
Anexo III.	Perfiles de Permeación	83
Anexo IV.	Intensidad de fluorescencia acumulada	84
Anexo V.	Estabilidad: Resultados de TP, PDI, potencial Z, % cantidad de curcuminoides y % inhibición	85
Anexo VI.	Curvas de calibración	91
Anexo VII.	Publicación	93

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE).....	41
Ecuación 2. Porcentaje de eficiencia de proceso (%EP).....	42
Ecuación 3. Capacidad de carga LC.....	42
Ecuación 4. Porcentaje de la cantidad de curcuminoides.....	45
Ecuación 5. Porcentaje de inhibición.....	46
Ecuación 6. Límite de cuantificación.....	92
Ecuación 7. Límite de detección.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las diferentes regiones de la piel	5
Figura 2. Estratos de la Epidermis	6
Figura 3. Algunos factores que influyen sobre la piel	8
Figura 4. Rutas de penetración percutánea	8
Figura 5. Hojas, flores y rizoma de la <i>Curcuma longa</i>	20
Figura 6. Métodos de extracción	21
Figura 7. Diagrama para la obtención de curcuminoides	23
Figura 8. Curcuminoides.....	24
Figura 9. Tautómeros de la curcumina	24
Figura 10. Actividades biológicas de la curcumina.....	27
Figura 11. Porcentaje de las diversas aplicaciones medicinales de los curcuminoides.....	27
Figura 12. Mecanismos de oxidación de la curcumina	31
Figura 13. Tipos de acomodo de los NLC: (I) imperfecto; (II) amorfo y (III) Múltiple	34
Figura 14. Representación geométrica del diseño factorial 2 ³	40
Figura 15. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para TP.....	49
Figura 16. Distribución del tamaño de partícula, así como una imagen representativa obtenida por TEM, de uno de los sistemas de NLC cargados con curcuminoides (CLT80-Cur)	52
Figura 17. Perfil de liberación <i>in vitro</i> para las diferentes formulaciones	52
Figura 18. Perfil de permeación <i>in vitro</i> para las diferentes formulaciones.....	55
Figura 19. Imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal, se muestra la proyección máxima de fluorescencia para cada sistema.	57
Figura 20. Imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal, se muestra la imagen ortogonal de un solo corte que muestra la ubicación y distribución de los curcuminoides.	58
Figura 21. Imágenes 3D obtenidas por microscopía de barrido láser confocal, se muestra la distancia de penetración de los curcuminoides.....	59
Figura 22. Perfil de penetración cutánea de curcuminoides formulados en NLC.....	60

Figura 23. Resultados de la prueba de estabilidad a 5°C y 25°C. Se muestran los valores de tamaño de partícula.....	63
Figura 24. Resultados de la prueba de fotoestabilidad de los NLC conteniendo curcuminoides. Se muestran los valores de tamaño de partícula.	64
Figura 25. Resultados de la prueba de estabilidad para los NLC conteniendo curcuminoides a 5°C y 25°C. Se muestran los valores del porcentaje de la cantidad de curcuminoides.....	66
Figura 26. Resultados de la prueba de fotoestabilidad de los NLC cargados de curcuminoides. Se muestran los porcentajes de la cantidad de curcuminoides	66
Figura 27. Resultados de la prueba de estabilidad para los NLC conteniendo curcuminoides a 5°C y 25°C. Se muestran los valores del porcentaje de inhibición de los curcuminoides.	68
Figura 28. Resultados de la prueba de fotoestabilidad de los NLC cargados con curcuminoides. Se muestran los porcentajes de inhibición de los curcuminoides	68
Figura 29. Distribución del tamaño de partícula y micrografía obtenida por TEM para el sistema CLP407-Cur.....	79
Figura 30. Distribución del tamaño de partícula y micrografía obtenida por TEM para el sistema PLT80-Cur.....	80
Figura 31. Distribución del tamaño de partícula y micrografía obtenida por TEM para el sistema PLP407-Cur.....	80
Figura 32. Curva analítica de calibración de curcuminoides, usando como medio de disolución etanol.	91
Figura 33. Curva analítica de calibración de curcuminoides, usando como medio disolución Etanol:Agua (1:1 v/v)	91
Figura 34. Curva analítica de calibración de curcuminoides, usando como medio disolución Etanol:Agua (1:1 v/v) en contacto con piel de oreja de cerdo.	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de 100 g y por 3 g de cúrcuma.	25
Tabla 2. Tabla general de lípidos sólidos y lípidos líquidos y su capacidad para disolver curcuminoides.....	47
Tabla 3. Capacidad para disolver los curcuminoides de la mezcla (85:15) de lípidos sólido-líquido	48
Tabla 4. Matriz de resultados para un diseño factorial 2 ³	48
Tabla 5. Composición y proporción de los acarreadores lipídicos nanoestructurados cargados de curcuminoides.....	49
Tabla 6. Características de los NLC preparados. TP, PDI, PZ, EE, Carga y EP	50
Tabla 7. Coeficiente de correlación (R ²), Criterio Akaike (AIC) y criterio de selección de modelo (MSC) para diferentes modelos matemáticos.....	53

Tabla 8. Valores de Flujo y coeficientes de permeabilidad	56
Tabla 9. Intensidades de fluorescencia acumulada	61
Tabla 10. Estabilidad: Resultados de potencial Z, muestras protegidas de la iluminación durante 3 meses (5 °C y 25 °C) y estudio de fotoestabilidad	64
Tabla 11. Resultados de tamaño de partícula, PDI y potencial Z (n=3) para cada formulación.	78
Tabla 12. Resultados de eficiencia de encapsulamiento, capacidad de carga y eficiencia del proceso para cada formulación	79
Tabla 13. Perfil de liberación de nanopartículas del sistema CLT80-Cur	81
Tabla 14. Perfil de liberación de nanopartículas del sistema CLP407-Cur	81
Tabla 15. Perfil de liberación de nanopartículas del sistema PLT80-Cur.....	81
Tabla 16. Perfil de liberación de nanopartículas del sistema PLP407-Cur.....	82
Tabla 17. Tabla: Perfil de liberación de solución de Curcuminoides.....	82
Tabla 18. Ajuste a modelos Orden cero, Primer orden, Higuchi y Peppas – Korsmeyer ...	82
Tabla 19. Perfil de permeación de nanopartículas del sistema CLT80-Cur	83
Tabla 20. Perfil de permeación de nanopartículas del sistema CLP407-Cur	83
Tabla 21. Perfil de permeación de nanopartículas del sistema PLT80-Cur	83
Tabla 22. Perfil de permeación de nanopartículas del sistema PLP407-Cur	83
Tabla 23. Perfil de permeación de solución de Curcuminoides	84
Tabla 24. Intensidad de fluorescencia acumulada para todos los sistemas	84
Tabla 25. Estabilidad: tamaño de partícula, muestras protegidas de la iluminación (5°C y 25°C, durante 3 meses)	85
Tabla 26. Estabilidad: tamaño de partícula, muestras expuestas a la iluminación total (Fotoestabilidad).....	86
Tabla 27. Estabilidad: potencial Z, muestras protegidas de la iluminación (5°C y 25°C durante 3 meses).....	87
Tabla 28. Estabilidad: potencial Z, muestras expuestas a la iluminación Total (Fotoestabilidad).....	88
Tabla 29. Estabilidad: porcentaje de la cantidad de curcuminoides, muestras protegidas de la iluminación (5°C y 25°C durante 3 meses)	89
Tabla 30. Estabilidad: porcentaje de la cantidad de curcuminoides, muestras expuestas a la iluminación Total (Fotoestabilidad)	89
Tabla 31. Estabilidad: porcentaje de inhibición, muestras protegidas de la iluminación (5°C y 25°C durante 3 meses)	90
Tabla 32. Estabilidad: porcentaje de inhibición, muestras expuestas a la iluminación Total (Fotoestabilidad).....	90
Tabla 33. Estabilidad: porcentaje de inhibición, solución de curcuminoides protegidos de la iluminación (5°C y 25°C durante 3 meses) y expuestos a la iluminación Total (Fotoestabilidad).....	90
Tabla 34. Parámetros de las curvas de calibración de curcuminoides.....	92

ABREVIATURAS

NLC	Acarreadores lipídicos nanoestructurados
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
NP	Nanopartículas
SLM	Micropartículas lipídicas sólidas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ERO/ROS	Especies reactivas de oxígeno/Reactive oxygen species
ERN/RNS	Especies reactivas de nitrógeno / reactive nitrogen species
EO	Estrés oxidativo
DOPA	Dihidroxifenilalanina
GSH	Glutación
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación-S-transferasa
SOD	Superóxido dismutasa
MMP	Metaloproteinasas de matriz
COX-2	Inhibidor de la ciclooxigenasa-2
TNF	Factor de necrosis tumoral
DCI	Dermatitis de contacto irritante
DCA	Dermatitis de contacto alérgica
NF-kB	Factor nuclear kappa B
Nrf2	Factor nuclear (derivado de eritroide 2)
DA	Dermatitis atópica
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
MDA	Malondialdehído
CAT	Catalasa
CAM	Medicina complementaria y alternativa
SAP	Ascorbil fosfato de sodio
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
CP-NN	Clobetasol-Propionate-Neomicina-Nistatina
FAK	Quinasa de adhesión focal
TRX	Tiorredoxina
PK	Piruvato Kinasa
LOX	Lipoxigenasa
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
CPF	Corteza prefrontal
DS	Dermatitis seborreica

LPO	Liquen plano oral
AA	Alopecia areata
PV	Pénfigo vulgar
MEC	Matriz extracelular
DSG1	Desmogleína 1
DSG3	Desmogleína 3
Ayurveda	Tratado de ciencia médica india
PIT	Método de temperatura inversión de fase
OMS	Organización Mundial de la Salud
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
OMT	O-metiltransferasa
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
MAE	Extracción asistida por microondas
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
SCF	Comité de alimentos
JECFA	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
IDA	Ingesta diaria aceptable
NOAEL	No se observaron efectos adversos nivel de efecto
DFT	Teoría funcional de la densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
GRAS	Generally recognized as safe
HLB	Balance hidrofílico - lipofílico
R ²	Coefficiente de correlación
AIC	Criterio Akaike
MSC	Criterio de selección de modelo
ER	Factor de promoción/ Enhancement Ratio
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
PDI	Índice de polidispersidad
PZ	Potencial Z
EE	Eficiencia de encapsulamiento
EP	Eficiencia de proceso
LC	Capacidad de carga
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
S.D.	Desviación estándar
Cur	Curcuminoides
C	Compritol® 888 ATO
P	Precirol® ATO 5
P407	Poloxámero 407
T80	Polisorbato 80

L	Labrasol®
Kg	Kilogramo
g	Gramo
mg	Miligramo
µg	Microgramo
h	Horas
nm	Nanómetro
µm	Micrómetro
mL	Mililitro
AFU	Unidades de fluorescencia arbitraria
UV	Ultra violeta

ABSTRACT

Four formulations of nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with curcuminoids were prepared, testing two types of solid lipids (Compritol® 888 ATO and Precirol® ATO 5) and two kinds of stabilizers (poloxamer 407 and polysorbate 80). Particle size values between 111 and 214 nm and polydispersity indices < 0.3 were registered, with low Z potential values due to the nonionic character of the stabilizers. The results showed that the type of surfactant had an impact on the *in vitro* release rate and on the *ex vivo* skin permeation capability of curcuminoids. Polysorbate 80 delayed the release, but favors the transport of a higher amount of curcuminoids to the receptor solution during the *ex vivo* permeation studies than the systems with poloxamer 407. Confocal microscopy confirmed that all systems favored the penetration of curcuminoids to deeper layers of the skin and in a greater amount than curcuminoids in solution. Exposure of the systems to intense radiation caused the degradation of curcuminoids, without loss of antioxidant activity, confirming that the degradation products also function as antioxidants. The NLC prepared can be valuable carriers to enhance the penetration of curcuminoids into the skin, to treat different disorders and skin diseases.

RESUMEN

Se prepararon cuatro formulaciones de acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados con curcuminoides, probando dos tipos de lípidos sólidos (Compritol® 888 ATO y Precirol® ATO 5) y dos tipos de estabilizantes (poloxámero 407 y polisorbato 80). Se registraron valores de tamaño de partícula entre 111 y 214 nm e índices de polidispersión < 0.3 , con valores de potencial Z bajos debido al carácter no iónico de los estabilizantes. Los resultados mostraron que el tipo de tensoactivo tenía un impacto en la velocidad de liberación *in vitro* y en la capacidad de penetración cutánea *ex vivo* de los curcuminoides. El polisorbato 80 retrasó la liberación, pero promovió el transporte de una mayor cantidad de curcuminoides a la solución receptora durante los estudios de permeación *ex vivo*, que los sistemas con poloxámero 407. La microscopía confocal confirmó que todos los sistemas favorecían la penetración de curcuminoides a capas más profundas de la piel y en mayor cantidad que los curcuminoides en solución. La exposición de los sistemas a una radiación intensa provocó la degradación de los curcuminoides, sin pérdida de actividad antioxidante, lo que confirma que los productos de degradación también funcionan como antioxidantes. Los NLC preparados pueden ser acarreadores valiosos para mejorar la penetración de curcuminoides en la piel, para tratar diferentes trastornos y enfermedades de la piel.

I. INTRODUCCIÓN

Una gran cantidad de enfermedades se atribuyen al estrés oxidativo [1]. Sin embargo, la generación de radicales libres se produce no sólo por la exposición a diversos factores ambientales sino también como resultado de los propios procesos metabólicos del cuerpo [2-4]. En los últimos años, los alimentos, los suplementos nutricionales y los fármacos con actividad antioxidante han ganado gran relevancia, entre ellos los curcuminoides, por sus reconocidas actividades antioxidantes y antiinflamatorias [5,6]. Estos compuestos actúan principalmente atrapando los radicales libres (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno), mejorando el rendimiento de las enzimas con actividad captadora de radicales libres (e.g., Glutación peroxidasa) e inhibiendo el efecto de las enzimas capaces de generar radicales libres (e.g., Xantina oxidasa / hidrogenasa) [7].

En el caso de la piel, se han realizado numerosos esfuerzos para prevenir o tratar diversas afecciones (e.g., Tumores de piel, envejecimiento de la piel y diferentes enfermedades cutáneas) que resultan de la presencia de radicales libres [1, 8-10]. La administración tópica es el método de elección para tratar enfermedades de la piel debido a la posibilidad de eludir el metabolismo de primer paso, mantener una concentración del fármaco en el sitio de acción durante períodos prolongados y reducir los efectos secundarios sistémicos (en comparación con la administración oral y parenteral) [11]. Sin embargo, la aplicación directa de curcuminoides a la piel está restringida por varios factores como su baja solubilidad en agua, inestabilidad (e.g., fotodegradación e inestabilidad química) y la barrera natural que representa el estrato córneo. Por tanto, para mejorar su penetración en la piel se han utilizado potenciadores de la absorción tanto físicos como químicos, así como la formulación en nanoacarreadores [5, 7, 12]. Entre ellos, las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) y los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) se han desarrollado como sistemas de liberación alternativos a las emulsiones, liposomas y nanopartículas poliméricas, atrayendo la atención de diversos grupos de investigación por su biocompatibilidad, facilidad de preparación, costo-beneficio y la posibilidad de producirse a gran escala. Los NLC han mostrado mejores características que los SLN debido a su estructura menos organizada, compuesta por una mezcla de lípidos sólidos y líquidos, lo que permite mejorar la carga del fármaco y evita la lixiviación del fármaco durante el almacenamiento [11]. Además, los NLC han recibido especial atención debido a la posibilidad de lograr una liberación prolongada y porque pueden actuar como potenciadores de la absorción [13]. Varios autores han formulado curcuminoides en NLC, encontrando resultados prometedores en relación al fármaco libre. Por ejemplo, Chen *et al.* [12], formularon y caracterizaron NLC y NLC-gel cargado con

curcumina, demostrando un efecto antiinflamatorio significativo en el edema del pabellón auricular de ratones; Aditya *et al.* ^[14], formularon curcumina y / o genisteína en NLC, mejorando la estabilidad en medios gástricos e intestinales simulados y aumentando la inhibición del crecimiento de células de cáncer de próstata y Rashidzadeh *et al.* ^[15] informaron resultados prometedores con NLC cargado de curcumina para el tratamiento de la malaria. Teniendo esto en cuenta, este trabajo se centra en la preparación y caracterización de NLC cargados de curcuminoides, con el objetivo de favorecer su penetración y asegurar su acción antioxidante al administrarlos en piel, ayudando así a contrarrestar los problemas que se derivan de la presencia de los radicales libres.

II. ANTECEDENTES

2.1 Piel

2.1.1 Generalidades de la piel

La piel es el órgano más apreciable y grande del cuerpo, con probablemente más funciones que cualquier otro órgano, tiene una superficie aproximada entre 1 ½ a 2 m² y pesa alrededor de 4 Kg. Su espesor, estructura y función varía dependiendo del sitio anatómico, uno solo tiene que comparar la piel facial con la del resto del cuerpo para reconocer que la piel no es homogénea.

La piel es una ruta atractiva para la administración de medicamentos, sin embargo, su estructura limita el paso de moléculas a través de ella, debido a sus propiedades como primera barrera contra el medio ambiente. La piel está compuesta por tres capas estructurales principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis [16-17].

2.1.2 Estructura de la piel

La piel se divide en tres regiones: epidermis, dermis e hipodermis, cada una de las cuales contiene múltiples componentes y funciones (Figura 1). En general, la epidermis es una capa compuesta de células epiteliales escamosas estratificadas llamadas queratinocitos, que cubren toda la superficie de la piel. Estas células comienzan como células madre ubicadas en la parte inferior de la epidermis. Su principal función, actúa como barrera protectora física y química de muchos factores externos. La dermis consiste en una capa papilar y una capa reticular más profunda. El colágeno y las fibras elásticas en la capa papilar se distribuyen como una malla fina, mientras que las de la capa reticular son gruesas y sirven como la principal fuente de resistencia a la tracción de la piel, estas dos capas le dan una estructura de soporte a la piel. La hipodermis, que se compone de tejido conectivo laxo y tejido graso, alcanza hasta 3 cm en el abdomen, participa en el almacenamiento de grasa y como termorregulador [16].

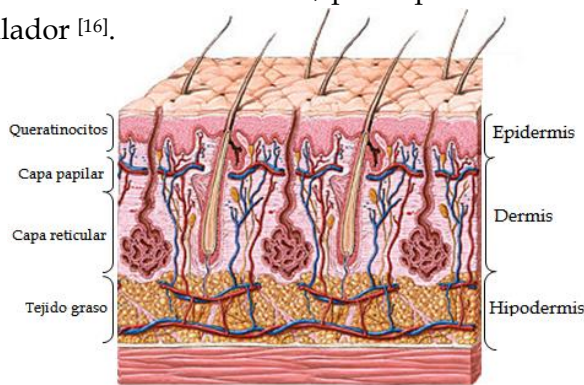


Figura 1. Estructura de las diferentes regiones de la piel [18]

2.1.3 Consideraciones morfológicas de la piel como barrera

La epidermis como capa externa, es la principal barrera de protección que cubre todo nuestro cuerpo, consta de varias estratos a su vez (Figura 2), la capa más profunda es el estrato basal, donde encontramos las siguientes células principales: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel; enseguida el estrato espinoso, constituido de 8 a 10 capas de células cuboidales unidas entre sí; luego se encuentra el estrato granular, compuesto entre 3 y 5 capas de células y gránulos con proteínas en su interior; después encontramos el estrato lúcido conformado de 3 a 5 capas de células planas muertas que contienen queratina o alguna sustancia precursora de la queratina. Este estrato solamente se encuentra en la epidermis de las palmas de las manos y las plantas de los pies. Por último, en la parte externa se localiza el estrato córneo formado por un conjunto de 25 a 30 capas de células planas muertas muy empaquetadas unas con otras, completamente llenas de queratina. El estrato córneo forma una barrera altamente impermeable, debido a las sustancias lipídicas que se encuentran entre las células que limitan el paso del agua [19].

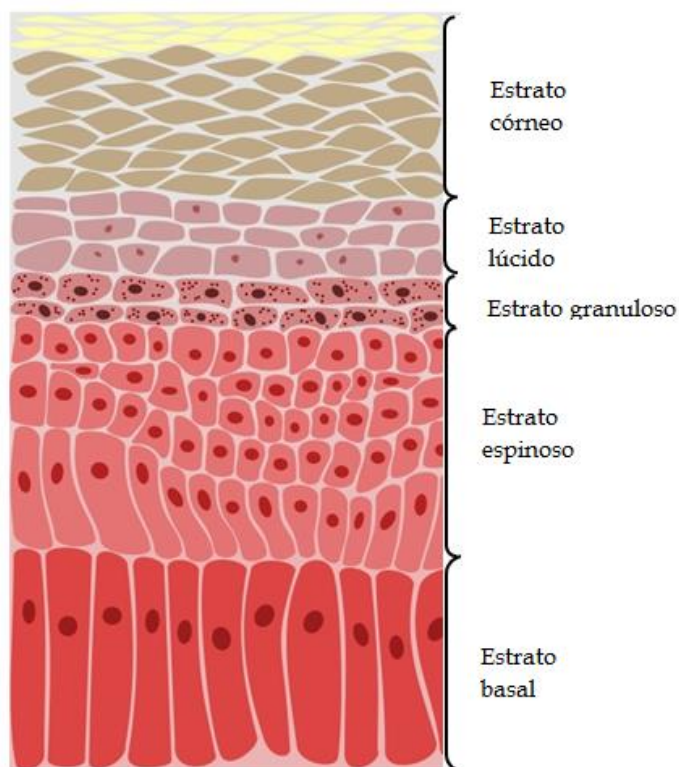


Figura 2. Estratos de la Epidermis [20]

2.1.4 Protección contra la radiación ultravioleta y pigmentación

La piel nos protege de varios factores externos como: cambios de temperatura, humedad, presión, golpes, rozaduras y sustancias químicas. Uno de los principales peligros es la exposición excesiva a la radiación ultravioleta proveniente de la luz solar (Figura 3) [21].

Para los humanos, el cabello es la primera línea protectora de los rayos UV, seguido de la pigmentación de la epidermis. La biología evolutiva de la pigmentación de la piel humana es interesante. La mayoría de los antropólogos creen que a medida que los humanos modernos evolucionaron en los trópicos y perdieron su vello corporal, aumentó la pigmentación en la epidermis como mecanismo de protección a las células, del daño inducido por los rayos UV al ADN.

El papel de la pigmentación como barrera contra los efectos de los rayos UV se basa en la presencia de gránulos de melanina, que están presentes en los melanocitos. La melanina se produce en los melanocitos a partir de la oxidación del aminoácido tirosina mediante un intermediario DOPA (dihidroxifenilalanina) antes de convertirse en melanina. Dentro de los melanocitos, los paquetes de melanina, llamados melanosomas, se distribuyen a lo largo de amplios procesos dendríticos que se interdigitan entre los queratinocitos epidérmicos. Muchos de estos paquetes de melanosomas se transfieren a los propios queratinocitos a través de la exocitosis de los procesos dendríticos, seguidos de endocitosis por los queratinocitos.

La protección contra los rayos UV debe equilibrarse con la necesidad de la luz solar para estimular la síntesis de vitamina D en la piel. La vitamina D se produce fotoquímicamente en las capas inferiores de la epidermis a partir del 7-deshidrocolesterol. La producción inadecuada de vitamina D por la piel puede compensarse con la ingesta oral, en el caso de estar expuesto a bajos niveles de luz solar o por el uso de protectores solares, que inhiben la producción de vitamina D dentro de la epidermis.

En la mayoría de los animales cuadrúpedos la pigmentación no se distribuye uniformemente, la pigmentación es mayor en la piel dorsal y más clara en el abdomen. Las pecas, que son más comunes en individuos ligeramente pigmentados, son el resultado de la distribución desigual de los melanocitos en toda la epidermis [16].

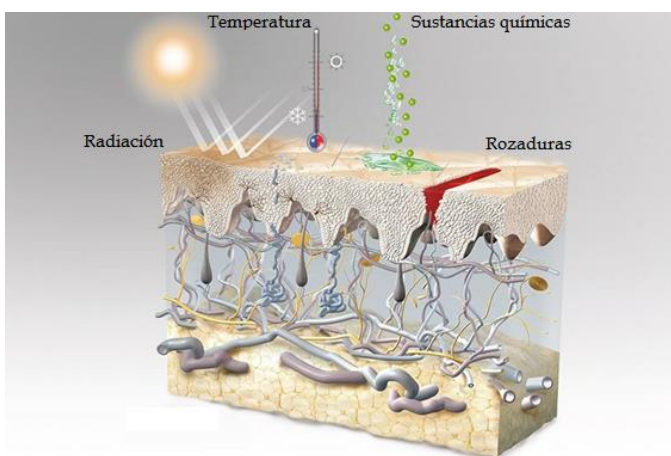


Figura 3. Algunos factores que influyen sobre la piel [21]

2.1.5 Mecanismos de penetración a través de la piel

A pesar de la eficiencia de la piel como barrera, esta no es absoluta, existen algunas sustancias que pueden penetrar a través de la piel, ya sea por difusión pasiva (sustancias lipofílicas y de bajo peso molecular) o utilizando promotores de absorción transdérmica. Una sustancia puede ingresar a la piel a través de varias rutas. Se han identificado cuatro vías de penetración a través de la piel dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos (Figura 4): dos rutas transepidérmicas, incluidas las rutas intercelular, transcelular y dos transapendiculares, a través de los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas; puede existir una combinación de todas las rutas. El término "penetración" se utiliza para indicar que un ingrediente activo está entrando en la piel hasta cierto punto. En contraste, el término "permeación" se usa para indicar el paso del ingrediente activo a la dermis y al sistema circulatorio. La absorción tiene un significado más general e indica penetración, permeación o ambas [22].

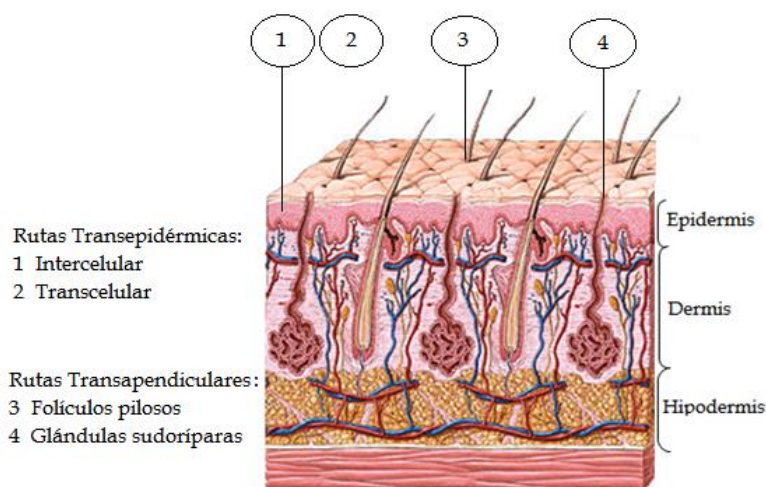


Figura 4. Rutas de penetración percutánea [18]

2.1.6 Penetración de nanopartículas en la piel

La penetración dérmica de nanopartículas (NP) se ha estudiado a partir de preparaciones farmacéuticas, cosméticas y dispositivos implantables, y sus usos potenciales han desencadenado la investigación de las interacciones de las NP con las diversas barreras biológicas. Esto ha originado el desarrollo y evaluación de nuevos nanoacarreadores tópicos, transdérmicos y agentes de diagnóstico, lo que podría dar como resultado el diseño de acarreadores "ideales" basados en sus propiedades fisicoquímicas. La finalidad de las NP es que deben penetrar la barrera cutánea, liberar su carga útil y eliminarse del cuerpo sin efectos adversos, sin embargo esta penetración depende de al menos 10 parámetros: (1) propiedades fisicoquímicas de NP; (2) efectos del vehículo; (3) área de aplicación, dosis, duración y frecuencia de exposición; (4) distribución; (5) vías subanatómicas (apéndices de la piel); (6) condiciones de la superficie de la piel; (7) factores adicionales de penetración como grosor y número de capas celulares; (8) pérdida de la formulación de la superficie de la piel por exfoliación o por efecto de lavado; (9) eliminación y transformación fotoquímica y (10) los métodos para determinar la absorción y la toxicidad. A pesar del creciente interés comercial y científico por desarrollar nuevos nanoacarreadores, es necesario conocer los riesgos asociados a su uso y disposición final, tanto para la salud humana, como para el medio ambiente. En este sentido, el conocimiento del riesgo humano y ambiental ayudará a las investigaciones a diseñar nanoacarreadores no tóxicos y biocompatibles [22].

2.1.7 Comportamiento de los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) en la piel

Cuando se considera la piel como una ruta de entrega de fármacos, se debe considerar la administración tópica, cutánea o dérmica y transdérmica, Si bien todos se aplican sobre la piel, solo las formulaciones transdérmicas están destinadas a penetrar y alcanzar la circulación sistémica, mientras que la administración tópica representa la acción del fármaco en las capas superficiales (por ejemplo, epidermis) y la administración cutánea ocurre cuando el fármaco llega a la dermis de la piel.

Datos científicos muestran a las nanopartículas lipídicas como una alternativa de administración de fármacos para aplicación en piel, ya que están compuestos de lípidos que se parecen a los de la piel, lo que contribuye a una mejor interacción y biocompatibilidad. Las nanopartículas lipídicas se componen tanto de nanopartículas lipídicas solidas (SLN) y acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC). Dependiendo de la composición de lípidos y tensoactivos, se pueden generar diferentes morfologías de nanopartículas, tanto para los SLN como para los NLC.

A pesar de que las nanopartículas lipídicas se han propuesto para la administración transdérmica y local (Cutánea y tópica), el uso local parece ser uno de los más prometedores, con fines terapéuticos. Respecto al tipo de nanopartícula, es evidente que los NLC han sido ampliamente apreciados por sus méritos por ejemplo mayor solubilidad, biodisponibilidad y estabilidad del fármaco en comparación con las SLN. Quizás por esta razón ha despertado el interés preferentemente de realizar sistemas que contengan fármacos lipofílicos y poco solubles en agua. Además, de la posibilidad de modular la liberación de moléculas, promoviendo su penetración y retención en la piel.

Por lo tanto, los acarreadores lipídicos nanoestructurados están relacionados con la composición lipídica fisiológica de la piel, pudiendo interactuar con el estrato córneo, creando un reordenamiento lipídico, que facilita la penetración. Así mismo, el tamaño pequeño de las nanopartículas y las propiedades fisicoquímicas de sus componentes, contribuyen a aumentar su adhesividad y capacidad de penetración en la piel [23-24].

2.2 Enfermedades de la piel (estrés oxidativo)

2.2.1 Papel de los oxidantes en las enfermedades de la piel

La piel, el órgano más grande del cuerpo humano, proporciona una interfaz importante entre el medio ambiente y el cuerpo y está constantemente expuesta a una variedad de contaminantes ambientales químicos y físicos [25]. Además, las células de la piel producen continuamente, a través de la respiración celular, durante los procesos metabólicos o bajo agresiones externas, productos de oxidación de moléculas altamente reactivas, generalmente llamados radicales libres. Estas moléculas son inmediatamente neutralizadas por sistemas enzimáticos y no enzimáticos en un equilibrio fisiológico y dinámico. En situaciones en las que este equilibrio se rompe, diversas estructuras celulares, como la membrana celular o el ADN nuclear o mitocondrial pueden sufrir modificaciones estructurales, desencadenando o agravando enfermedades de la piel [26]. Estos tóxicos ambientales o sus metabolitos son oxidantes inherentes que impulsan directa o indirectamente la producción de una variedad de oxidantes reactivos también conocidos como especies reactivas de oxígeno, mejor conocidas por sus siglas en inglés (ROS). Las ROS son entidades de vida corta que se generan continuamente a niveles bajos durante el curso del metabolismo aeróbico normal [25].

2.2.2 Oxidantes en la piel

La piel está bajo exposición constante de especies reactivas de fuentes endógenas y exógenas. Es afectada más directamente por especies reactivas de oxígeno, debido a

su generación a partir de fuentes endógenas [27]. Especies reactivas del oxígeno es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y son fácilmente convertidos a radicales. El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, las células que lo utilizan para su metabolismo son las principales responsables de la producción de especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, no todas las especies oxidantes tienen un origen endógeno; la existencia de factores exógenos, como la radiación solar, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, pueden incrementar su nivel. En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno (O_2) con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje (5%) forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son literalmente radicales libres (el anión superóxido y el hidroxilo). En situaciones en las que exista una mayor actividad metabólica (etapas del crecimiento, desarrollos activos o procesos inflamatorios) ocurre una mayor demanda tisular de O_2 y parte de él se metaboliza, generándose un alto número de sustancias oxidantes. La segunda gran fuente de ROS también es endógena y está constituida por el metabolismo de las células de defensa, tales como los polimorfonucleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos. Para que éstas puedan cumplir su misión, están dotadas de diversas proteínas, así como de vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas como peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, cuyo fin último es lesionar y destruir elementos extraños. Es importante mencionar que el papel de los radicales libres no ha de ser abordado sólo desde una perspectiva negativa o patológica. Estos compuestos cumplen también una función fisiológica al participar, en condiciones normales, en la defensa frente a las infecciones, en el metabolismo normal, así como en la fagocitosis e inflamación, es decir, en la actividad de las células de defensa tales como los polimorfonucleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos. En condiciones normales estas especies reactivas son producidas y utilizadas en compartimentos celulares como los lisosomas, y aún en el interior de los fagocitos, no tienen por qué dañar a las células siempre y cuando los mecanismos antioxidantes de éstas funcionen adecuadamente [28].

2.2.3 Radicales libres / Estrés oxidativo

Un radical libre es un átomo o molécula con uno o más electrones no apareados en el último orbital, capaz de reaccionar con múltiples biomoléculas a través de su oxidación. Dentro de este concepto general, las formas reducidas del O_2 se denominan, como ya se ha mencionado especies reactivas de oxígeno; en las que se incluyen radicales libres y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [29]. En los diversos campos de la biología y la medicina, los radicales libres se conocen más generalmente como ROS o especies reactivas de nitrógeno (RNS). Entre las ROS más importantes se

encuentran el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) y los radicales peroxilo ($\text{ROO}\bullet$), así como especies no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), ácido hipocloroso (HOCl) y peroxinitrito (ONOO^-) [30].

Las ROS tienen una participación dual en la célula, ya que pueden adoptar un papel benéfico o perjudicial en los sistemas vivos. Los efectos benéficos de las ROS se presentan a bajas concentraciones, participando en diferentes funciones fisiológicas de la célula; como defensa contra agentes infecciosos y sistemas de señalización celular (mitosis). En contraparte, el efecto dañino de los radicales libres en los sistemas biológicos produce estrés oxidativo (EO) generado por la deficiencia de antioxidantes e incremento de las ROS. El EO es el resultado de reacciones metabólicas que utilizan O_2 y representa una alteración en el equilibrio prooxidante/antioxidante en los sistemas vivos con capacidad de oxidar biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN) e inhibir su estructura y función normal [29]. Un equilibrio sostenido entre los efectos beneficiosos y nocivos de ROS/RNS es un aspecto importante de los organismos sanos y se logra mediante una colección de mecanismos que se describen como regulación redox. El estrés oxidativo/nitrosativo resulta de un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes [30].

2.2.4 Antioxidantes en la piel

Para hacer frente al estrés oxidativo, el organismo está equipado con mecanismos de defensa eficientes, principalmente antioxidantes. Previenen el daño oxidativo de los lípidos y proteínas estructurales importantes para la integridad de la barrera, que es esencial para la homeostasis de la piel. Esto sugiere que el estado redox celular juega un papel fundamental en un entorno de piel saludable y que un desequilibrio entre los mecanismos prooxidantes y antioxidantes podría resultar en enfermedades de la piel. Las moléculas antioxidantes consisten en un grupo de enzimas y proteínas antioxidantes de alto peso molecular y un grupo de antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular [31]. Estas moléculas antioxidantes incluyen glutatión (GSH), alfa-tocoferol o vitamina E, ácido ascórbico o vitamina C, glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), catalasa y quinona reductasa. El GSH y el ácido ascórbico son antioxidantes solubles, mientras que la vitamina E está unida a la membrana y es capaz de interceptar reacciones en cadena mediadas por radicales libres. El GSH está presente en concentraciones milimolares en prácticamente todas las células normales. Sin embargo, mutaciones raras en genes humanos que codifican las enzimas glutamato-cisteína ligasa, glutatión sintasa y γ -glutamil transferasa en el ciclo γ -glutamilo pueden disminuir los niveles de GSH en tejido y sangre [26].

La principal defensa celular contra el daño que puede causar el $O_2\bullet$ está mediada por las enzimas superóxidos dismutasas (SOD). Hay tres formas de SOD en células de mamíferos: Mn-SOD mitocondrial, Cu citoplásmico, Zn-SOD (que también se encuentra en peroxisomas) y SOD extracelular, que es un Cu, Zn-SOD que es inmunológicamente distinto del Cu, Zn-SOD. Generalmente, el hierro (Fe^{2+}) juega un papel crítico en la función de la enzima antioxidante, en la que interviene en la función catalítica durante la reducción de H_2O_2 a $\bullet OH$. Los niveles celulares de Fe^{2+} se mantienen al mínimo para evitar la producción excesiva de $\bullet OH$ a través de la reacción de Fenton. Esto es posible parcialmente por la ferritina, la proteína de almacenamiento de hierro, que limita la disponibilidad catalítica de Fe^{2+} para participar en la generación de radicales de oxígeno [31].

El ascorbato citosólico participa en la regeneración continua de vitamina E, lo que demuestra la relación de cooperación entre la síntesis de antioxidantes celulares. Las funciones principales de la vitamina E son prevenir las reacciones en cadena de la peroxidación de los lípidos y apagar el O_2 en los compartimentos de lípidos celulares. El ácido úrico protege contra el daño oxidativo al eliminar el O_2 , $\bullet OH$ y otros oxidantes celulares. El ácido úrico se oxida a alantoína en presencia de O_2 y H_2O_2 (ácido úrico + O_2 + H_2O → 5-hidroxiisourato + H_2O_2 → alantoína + CO_2) [31].

También podemos obtener antioxidantes de forma exógena a través de la ingesta alimentaria. Ejemplos de esta clase de antioxidantes, o alimentos que los contienen, son licopeno, curcumina, té verde, Coffea arábica, silimarina, polypodium leucotomos, resveratrol, extracto de semilla de uva, granada, pycnogenol, isoflavonas de soja, propóleo y escualeno. En la piel, la epidermis contiene concentraciones más altas de antioxidantes que la dermis. Estos antioxidantes generalmente se distribuyen en forma de gradiente con concentraciones crecientes hacia la capa más profunda del estrato córneo. Cada vez es más evidente que el estrés oxidativo está implicado en numerosas enfermedades de la piel y que las estrategias de antioxidantes de forma exógena pueden servir como métodos eficaces y sencillos para mejorar estas enfermedades [1]. Se menciona a continuación el conocimiento literario sobre el estrés oxidativo y las estrategias antioxidantes en varias enfermedades cutáneas.

a) Dermatitis de contacto

Encontramos en la literatura dos tipos de dermatitis de contacto, tanto la irritante (DCI) como la alérgica (DCA), aunque tienen características clínicas, histológicas y moleculares similares, exhiben diferentes formas de patogénesis. La DCI es una reacción inflamatoria no inmunológica en respuesta a materiales tóxicos, mientras que la DCA es una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada mediada por

células T de memoria, específica de antígeno. Las ROS juegan un papel central en el desarrollo de ambas formas de dermatitis de contacto. La respuesta a irritantes o alérgenos implica la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias, así como la generación de señales para atraer leucocitos, regular el aumento de moléculas coestimuladoras de superficie, activar metaloproteinasas de matriz (MMP) y proteínas carboniladas. Las ROS también activan directamente o proporcionan señales coestimuladoras para el factor nuclear kappa B (NF- κ B), lo que resulta en la regulación de la vía de las prostaglandinas y la expresión de COX-2. La N-acetilcisteína, el resveratrol y los polifenoles del té inhiben la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMP) regulada por ROS. En los queratinocitos, la SOD permeable a las células suprime la MMP-9 inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF); por tanto, se cree que la SOD es un agente inmunomodulador en las enfermedades inflamatorias de la piel [1].

b) Dermatitis atópica

La dermatitis atópica (DA) es un trastorno cutáneo pruriginoso crónico que afecta a muchas personas, especialmente a los niños pequeños. Es una enfermedad causada por la combinación de predisposición genética, desregulación inmunológica y defecto de la barrera cutánea. El estrés oxidativo se ha implicado en la dermatitis atópica durante más de 15 años, principalmente en los siguientes tres aspectos: (1) la presencia de estrés oxidativo; (2) aumento del estrés oxidativo durante la exacerbación de la DA; y (3) disminución de la capacidad antioxidante. Se demostró que los marcadores urinarios de estrés oxidativo están alterados en niños con DA, incluyendo 8-OHdG, nitrito/nitrato y selenio. Esos niveles de marcadores son más altos en niños con DA que en niños sin DA. Se sugirió que la alteración de la homeostasis de los radicales de oxígeno/nitrógeno y el aumento del estrés oxidativo están implicados en la fisiopatología de la DA infantil. Más recientemente, Amin *et al.* [32] y Sivaranjani *et al.* [33] realizaron estudios de casos y controles en pacientes con eccema con individuos sanos como controles. Encontraron que, en comparación con el grupo de control, los pacientes con eccema tienen un nivel significativamente más alto de peroxidación lipídica midiendo el malondialdehído sérico (MDA) y niveles más bajos de antioxidantes, incluidas las vitaminas A, C y E. Se informaron hallazgos similares de la presencia de estrés oxidativo y aumento de la peroxidación lipídica en pacientes con alopecia areata, una condición inflamatoria de la piel estrechamente relacionada con la DA [34].

c) Dermatitis seborreica

La dermatitis seborreica (DS) es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica común que afecta principalmente al cuero cabelludo. Ozturk *et al.* [35] evaluaron las

actividades de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) y los niveles de malondialdehído (MDA) en muestras de raspado del cuero cabelludo de pacientes con DS. Las actividades de SOD y CAT y los niveles de MDA de los pacientes fueron significativamente más altos que en los controles. No hubo correlación significativa entre las edades, los sexos, la duración y la gravedad de la enfermedad, tampoco en la evaluación de picazón, enzimas antioxidantes y niveles de MDA en el grupo de pacientes. El estrés oxidativo cutáneo en pacientes con DS puede jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

d) Esclerodermia

La esclerodermia es una enfermedad del tejido conectivo caracterizada por daño vascular, acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC) y presencia de fibrosis en la piel y otros órganos viscerales. La esclerosis de la piel es el síntoma típico de la esclerodermia, que es muy resistente al tratamiento y afecta la calidad de vida de los pacientes. Aunque numerosos estudios han intentado dilucidar la patogenia de la esclerodermia, la etiología y los eventos iniciales de la esclerodermia siguen sin estar claros. Recientemente, se ha propuesto que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, la terapia antioxidante puede ser útil para pacientes con un mecanismo de defensa oxidativo deteriorado. Estudios han confirmado que los pacientes con esclerodermia tienen una mayor producción de radicales libres (radicales hidroxilo y peroxinitrito) y que los niveles séricos de 8-isoprostano, como marcador de estrés oxidativo, aumentan en pacientes con esclerodermia y se correlacionan con la gravedad de la enfermedad [36].

e) Acné

El acné es una afección dermatológica común caracterizada por una sobreproducción de sebo mediada por hormonas, hiperqueratinización folicular e inflamación crónica de la unidad pilosebácea. Los microbios, las susceptibilidades genéticas y varios factores ambientales se han relacionado con la patogenia de la afección. Últimamente se ha hecho evidente que los pacientes con acné están sometidos a un mayor estrés oxidativo cutáneo y sistémico [36]. El uso de antioxidantes como medicina complementaria y alternativa (CAM) tienen un impacto significativo, por ejemplo el uso del ascorbil fosfato de sodio (SAP) tiene utilidad en el tratamiento del acné debido a su fuerte actividad antimicrobiana mediante la reducción de la oxidación de lípidos, lo que puede conducir a una disminución de la inflamación y la queratinización folicular. Otro ejemplo lo presenta Kallis *et al.* [37] quienes investigaron que el 5% de SAP y el 0.2% de retinol tenían efectos sinérgicos en la reducción de las lesiones inflamatorias del acné.

f) Rosácea

La rosácea es una afección cutánea común que se cree que es principalmente un trastorno inflamatorio. Los neutrófilos, en particular, se han implicado en la inflamación asociada con la rosácea y median muchos de sus efectos a través de la liberación de especies reactivas de oxígeno. Recientemente, se ha reconocido el papel de las especies reactivas del oxígeno en la fisiopatología de la rosácea. Muchos agentes eficaces para la rosácea, incluidos el ácido azelaico tópico y el metronidazol tópico, tienen propiedades antiinflamatorias. Los modelos *in vitro* han demostrado los potentes efectos antioxidantes del ácido azelaico, proporcionando una posible explicación mecanicista de su eficacia en el tratamiento de la rosácea [38].

g) Úlcera venosa crónica

Las úlceras venosas de las piernas son frecuentes y causan una morbilidad considerable en la población. Se cree que el estrés oxidativo, como consecuencia de un desequilibrio en la homeostasis prooxidante-antioxidante impulsa una secuencia deletérea de eventos que finalmente resulta en un estado de no curación en las heridas crónicas. La mayoría de las especies reactivas de oxígeno son probablemente liberadas por neutrófilos y macrófagos y en un grado desconocido, por fibroblastos residentes y células endoteliales. Como en las heridas crónicas, la fase inflamatoria no se resuelve, la carga de especies reactivas de oxígeno persiste durante un largo período de tiempo con el consiguiente daño continuo y la perpetuación de la inflamación [39].

El estrés oxidativo da como resultado una alterada cicatrización en pacientes con ulceración venosa. Un estudio que se realizó en pacientes con ulceración venosa, reveló una disminución de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (SOD) en la sangre aproximadamente del 15%, mientras que la liberación de superóxido de los neutrófilos aumentó hasta un 170%. Estos datos permiten concluir que en la cicatrización de heridas es necesario mejorar el sistema de defensa antioxidante [39].

h) Cáncer de piel y fotoenvejecimiento cutáneo asociado a los rayos UV

Las ROS pueden dañar el ADN, lo que resulta en mutagénesis y carcinogénesis. Algunos compuestos fitoquímicos pueden prevenir la carcinogénesis inducida por los rayos UV a través de su función antioxidante. Se conoce que el té negro y verde, las antocianidinas de semillas de uva, el resveratrol, la quercetina, la apigenina, la silimarina, la curcumina, la genisteína, el ácido ascórbico y los derivados del ajo inhiben o reducen la tumorigénesis en modelos o líneas celulares murinas. Los rayos UV inducen la generación de ROS y productos de peroxidación lipídica

(TBARS) y el agotamiento de antioxidantes endógenos. Los rayos UV agotan GPx, ascorbato, GSH, SOD, catalasa, alfa-tocoferol y ubiquinol en la piel. El daño a los sistemas antioxidantes es más prominente en la epidermis que en la dermis, por lo que es importante prevenir daños en la piel con antioxidantes antes de la exposición a los rayos UV. Los antioxidantes, que incluyen vitamina C, vitamina E, coenzima Q10, licopeno, carotenoides, tretinoína, GSH, zinc, resveratrol, genisteína, cacao y selenio, pueden ejercer efectos fotoprotectores [1].

i) Liquen plano

El estrés oxidativo está involucrado en la patogénesis del liquen plano oral (LPO); Se ha demostrado que la presencia de estrés oxidativo provoca un desequilibrio en la producción de especies reactivas y la capacidad de los tejidos para neutralizar los reactivos intermediarios o reparar el daño resultante. Esto da como resultado un ADN potencialmente mutagénico, relacionado con la inflamación, lesiones ampollas y erosivas. Con base en estas observaciones fisiopatológicas, se realizó un estudio con antocianinas (antioxidantes naturales), extraídas de la piel de la uva y se comparó con la crema de propionato de clobetasol-neomicina-nistatina (CP-NN) que se utiliza para el tratamiento de LPO. Los resultados fueron favorables, ya que los pacientes presentaron mejor respuesta terapéutica sobre el alivio del dolor con antocianinas [40].

j) Alopecia areata

La alopecia areata (AA) es una enfermedad de la piel autoinmune que no deja cicatrices, en la que los anticuerpos atacan los propios folículos pilosos y provocan la caída del cabello. Se sabe poco sobre las alteraciones de la peroxidación lipídica y las enzimas antioxidantes del cuero cabelludo de los pacientes con AA. Sin embargo, Naziroglu *et al.* [41] evaluaron los niveles en sangre de vitamina E, betacaroteno y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como estado de degradación oxidativa de los lípidos, GSH y GPx. Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo de TBARS en pacientes con alopecia en comparación con los controles; coincidiendo con otro estudio realizado por Akar *et al.* [42]. en donde evaluaron los niveles de TBARS, GPx y SOD en sangre en pacientes con AA, encontrando que los niveles aumentaron a un grado estadísticamente significativo. A partir de estos resultados, los autores afirman que los altos niveles de enzimas antioxidantes se deben a la producción excesiva de radicales libres en los pacientes [27].

k) Pénfigo vulgar y otras enfermedades ampollosas

El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad cutánea autoinmune en la que los autoanticuerpos se unen principalmente a desmogleína 3 (DSG3) y en algunos casos, a desmogleína1 (DSG1), dos moléculas de adhesión celular expresadas en la superficie de los queratinocitos. La unión de autoanticuerpos interfiere con la unión célula-célula y conduce a la acantólisis de los queratinocitos por mecanismos que aún no se comprenden completamente. El resultado final es una ampolla intraepitelial. En un estudio realizado por Naziroglu *et al.* [43], se analizaron las concentraciones plasmáticas de vitamina A, betacaroteno, vitamina E, GSH, GPx, catalasa y MDA y concentraciones de GSH, GPx, catalasa y MDA en globulos rojos, encontrando una disminución significativa tanto en las concentraciones plasmáticas como en concentraciones de globulos rojos de vitamina A, betacaroteno, vitamina E, GSH y catalasa en pacientes con PV en comparación con los controles. También se pudo observar un aumento significativo de MDA para ambas concentraciones. Estos hallazgos apoyan el caso de un desequilibrio oxidante/antioxidante en pacientes con PV [27].

l) Vitiligo

El vitiligo es un trastorno de la piel caracterizado por secciones de piel despigmentada. Se desconoce la etiología, sin embargo, en general se acepta que hay una pérdida de función de los melanocitos. Se han sugerido varias hipótesis: i) ataque inmunomediado a los melanocitos, ii) una liberación neuroquímica de las terminaciones nerviosas que da como resultado la destrucción de los melanocitos, iii) acumulación de metabolitos tóxicos por exposición ambiental o rutas intrínsecas de síntesis de melanina que dan como resultado daño a los melanocitos, iv) desregulación de las vías de la biopterina que conducen a la citotoxicidad de los melanocitos y estado redox alterado o una defensa de radicales libres defectuosa con toxicidad para los melanocitos [27]. Estas diferentes hipótesis pueden atribuirse a variaciones en los niveles innatos en diferentes muestras de tejido, duración de la enfermedad o actividad de la enfermedad. Entre las ROS, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) juega un papel fundamental en la aparición y progresión del vitiligo, así como el factor de transcripción Nrf2, que regula la expresión de la hemo oxigenasa-1, implicada en la protección de melanocitos humanos contra el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 . Nrf2 regula la expresión de varias enzimas antioxidantes, incluidas la catalasa, GPx y SOD, mediante el uso de GSH como sustrato. Recientemente se demostró que la fototerapia ultravioleta (UV) de banda estrecha, conocido tratamiento del vitiligo, reduce los niveles de malonildialdehído (MDA) en los eritrocitos y aumenta los niveles de GPx en pacientes con vitiligo [1].

m) Psoriasis

Existen signos sistémicos constantes de estrés oxidativo en pacientes con psoriasis activa: los niveles plasmáticos de malonildialdehído (MDA) están significativamente elevados, lo que sugiere el agotamiento de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos naturales, y en consecuencia, la prevalencia de procesos de peroxidación en las membranas celulares y los lípidos plasmáticos. De manera similar, la SOD se reduce en los eritrocitos de los pacientes psoriásicos. El propio proceso inflamatorio en las áreas de la lesión induce la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Sin embargo, el uso eventual de antioxidantes debe tener como objetivo recuperar el equilibrio redox, lo que lleva a un efecto antiinflamatorio, posiblemente mediante la activación de vías antiproliferativas y proapoptóticas, tanto en las células locales como en las inflamatorias [26].

2.3 Generalidades de la cúrcuma

La cúrcuma es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Zingiberáceas que alcanza una altura de hasta un metro y posee flores zigomorfas [44, 45], su nombre común fue descrito como *Cúrcuma longa* por Linnaeus [46], su género consiste en alrededor de 110 especies, distribuidas en la región tropical y pacífica de Asia [47]. Esta planta (Figura 5) se cultiva en regiones tropicales y subtropicales. El mayor productor mundial de cúrcuma es India, donde se ha utilizado como remedio casero para varios padecimientos. Dependiendo de su origen y las condiciones del suelo donde se cultiva, la proporción de curcuminoides que se obtiene de su rizoma (tallo subterráneo de la planta) puede variar [45]. La cúrcuma tiene diferentes nombres dependiendo de su procedencia, los nombres más citados son Azafrán de la india o jengibre amarillo [45], habitualmente se emplea el nombre de curcumina para referirse a la planta; sin embargo, es un término mal empleado ya que la curcumina pertenece a los curcuminoides que contiene la planta, es decir la planta cúrcuma contiene "curcuminoides" que agrupa diferentes compuestos como la curcumina, desmetoxicurcumina, bis-desmetoxicurcumina y la curcumina cíclica. De estos, la curcumina es el componente principal, y la curcumina cíclica es el componente menor. De estos compuestos los investigadores se han centrado en conocer toda actividad biológica y química de la curcumina. Desde que la curcumina se aisló por primera vez en 1815 y su estructura química fue determinada en 1870. Los investigadores han confirmado los diversos efectos farmacológicos y terapéuticos contra varias enfermedades crónicas [48-50].

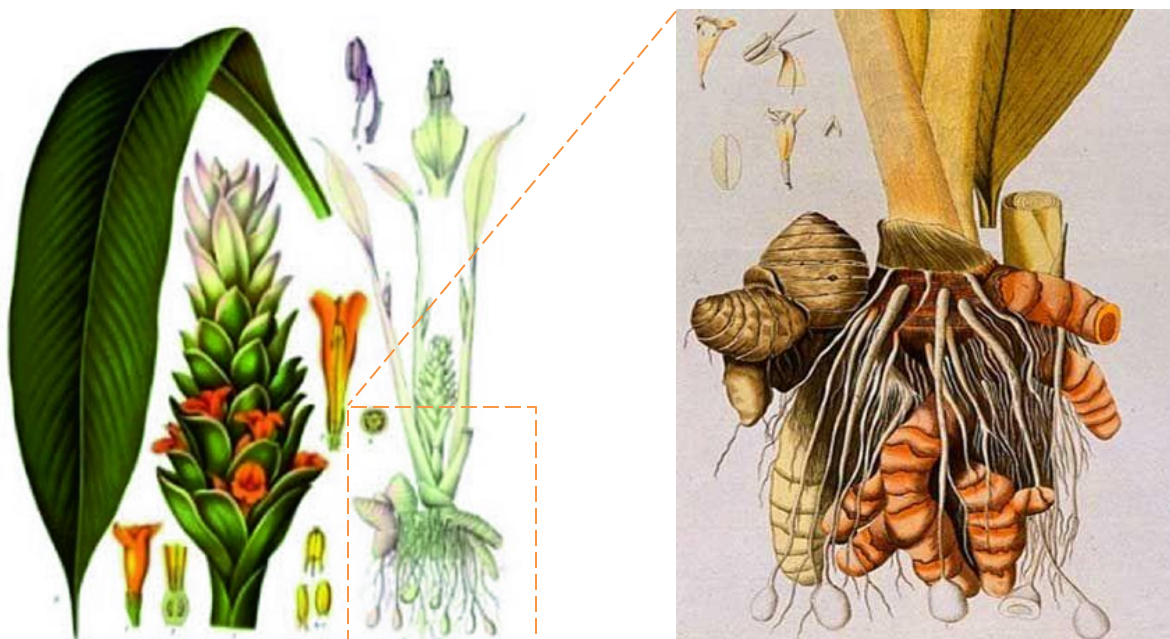


Figura 5. Hojas, flores y rizoma de la *Cúrcuma longa* [45]

2.3.1 Antecedentes de la cúrcuma

El reporte más antiguo que se tiene sobre la utilización de la cúrcuma data de la India entre los años 610 y 320 a. C. Se utilizaba como colorante amarillo para teñir algodón, lana, seda, cuero, papel, lacas, barniz y ceras. En la gastronomía, ha sido utilizado como condimento de diversos platillos, en conjunto con otras especias como el cardamomo, jengibre, cilantro, comino, el sésamo y la pimienta; plantas aromáticas que condimentan y conservan los alimentos. Respecto al ámbito medicinal, en los escritos del Ayurveda (tratado de ciencia médica india redactado en el siglo V a. C.) se autorizaba el uso de la cúrcuma para tratar diversas enfermedades. En la Edad Media (476 - 1492) la planta de cúrcuma se empleó para combatir la ictericia o fiebres biliares. Estos conocimientos experimentales se documentaron en la obra "Herbal" de William Turner, que ya han sido aprobadas por la fitoterapia moderna. Estos conocimientos se sustentaron con dos escritos importantes. El primero "De materia Medica", texto escrito en cinco volúmenes por Pedanio Dioscórides Anazarbeo (40 a. C. - 90 a. C.), médico militar Romano en la época de Nerón y el segundo, publicado en 1570 por el médico, herborista y naturalista John Gerard, que ilustra por medio de dibujos muy detallados, las hierbas y plantas que habían sido estudiadas, encontrándose entre ellas el rizoma de cúrcuma [45].

2.3.2 Obtención de los curcuminoides

Para aislar la curcumina y otros curcuminoides de los rizomas de *Cúrcuma longa*, se han descrito numerosos métodos (Figura 6): desde la extracción con disolventes convencionales: soxhlet y percolación, hasta la extracción utilizando dióxido de carbono supercrítico (SC CO₂), extracción asistida por microondas (MAE) y técnicas de extracción asistida por ultrasonido (EAU) [51].

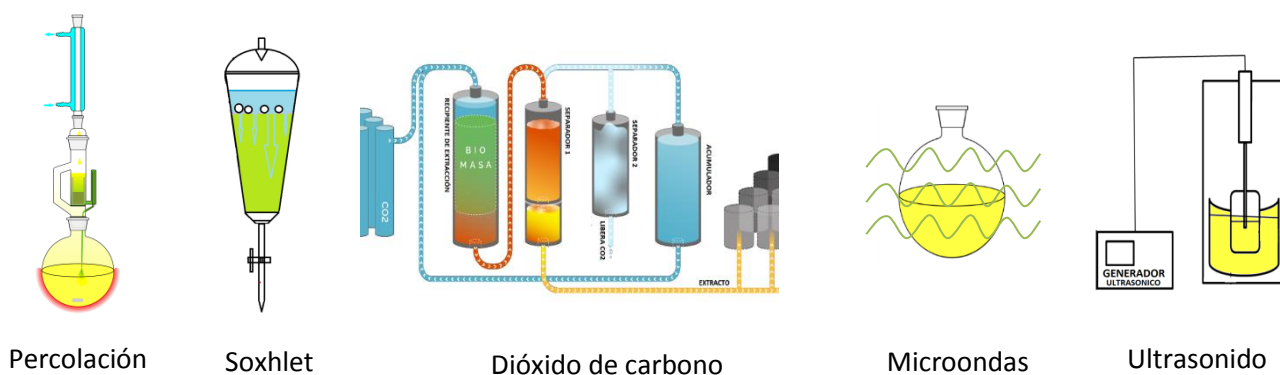


Figura 6. Métodos de extracción empleados para aislar curcumina y curcuminoides

El procedimiento general de la obtención de los curcuminoides de la cúrcuma se muestra en la Figura 7 y se describe a continuación. En la etapa de curado, los rizomas son calentados para disminuir el tiempo de deshidratación durante 1 a 6 horas; posteriormente se secan al aire libre (expuestos al sol) durante 10 a 15 días o utilizando un horno a 65 °C durante 2 días, generando un producto de color uniforme. Después del secado, los rizomas se vuelven duros, frágiles y de color amarillo uniforme. La humedad final puede ser alrededor de 5%, pero, por razones económicas, los rizomas se secan parcialmente aproximadamente de un 15 a un 30% y se transportan a los centros de montaje. El procedimiento de pulido mejora la apariencia de cúrcuma seca mediante la eliminación de la superficie exterior mate. La cúrcuma pulida es más atractiva, con un color amarillo brillante. A veces, el alumbre, semilla de suelo de ricino y polvo de cúrcuma se utilizan para dar un color más brillante. Los rizomas procesados se almacenan en bolsas dobles de yute en almacenes donde la fumigación se lleva a cabo periódicamente para prevenir o eliminar las plagas. La cúrcuma molida es bastante estable al calor moderado y no requiere un cuidado especial durante su producción. El polvo de la cúrcuma se almacena a granel en contenedores en el que se evita la absorción de humedad y la exposición a la luz, siendo estable hasta por 6 meses [52].

La oleorresina de cúrcuma es una mezcla de compuestos: ácidos grasos volátiles y no volátiles y material resinoso, entre otros. La oleorresina se utiliza principalmente como colorante alimentario y en segundo lugar como especia. El disolvente que se utiliza para extraer una oleorresina de buena calidad es la acetona. El tiempo de extracción es variable, pero en un equipo Soxhlet el rendimiento es de aproximadamente 5%, el cual contiene 42% de curcuminoides en 4 a 5 h. En la extracción a nivel industrial, el rendimiento está en el rango de 10 a 12%, aunque el contenido de la curcumina es menor que la obtenida en el Soxhlet. El producto final es un aceite altamente viscoso con 4.5 a 5% de curcuminoides, un producto de color marrón-naranja intenso, de 30 a 40% de curcumina, y de 15 a 20% de aceite volátil. Para un fácil manejo, el producto altamente viscoso se mezcla con frecuencia con disolventes permitidos tales como propilenglicol o polisorbato para obtener un producto homogéneo y que se pueda verter [52].

La oleorresina de cúrcuma se utiliza esencialmente en la cocina internacional en la carne y los productos de pescado y en algunos productos transformados como la mostaza preparada, encurtidos y condimentos para los filetes de pescado, croquetas de patatas congeladas, mantequilla y queso. La oleorresina se utiliza en el rango de 2 a 640 ppm [52].

Rizomas de Cúrcuma

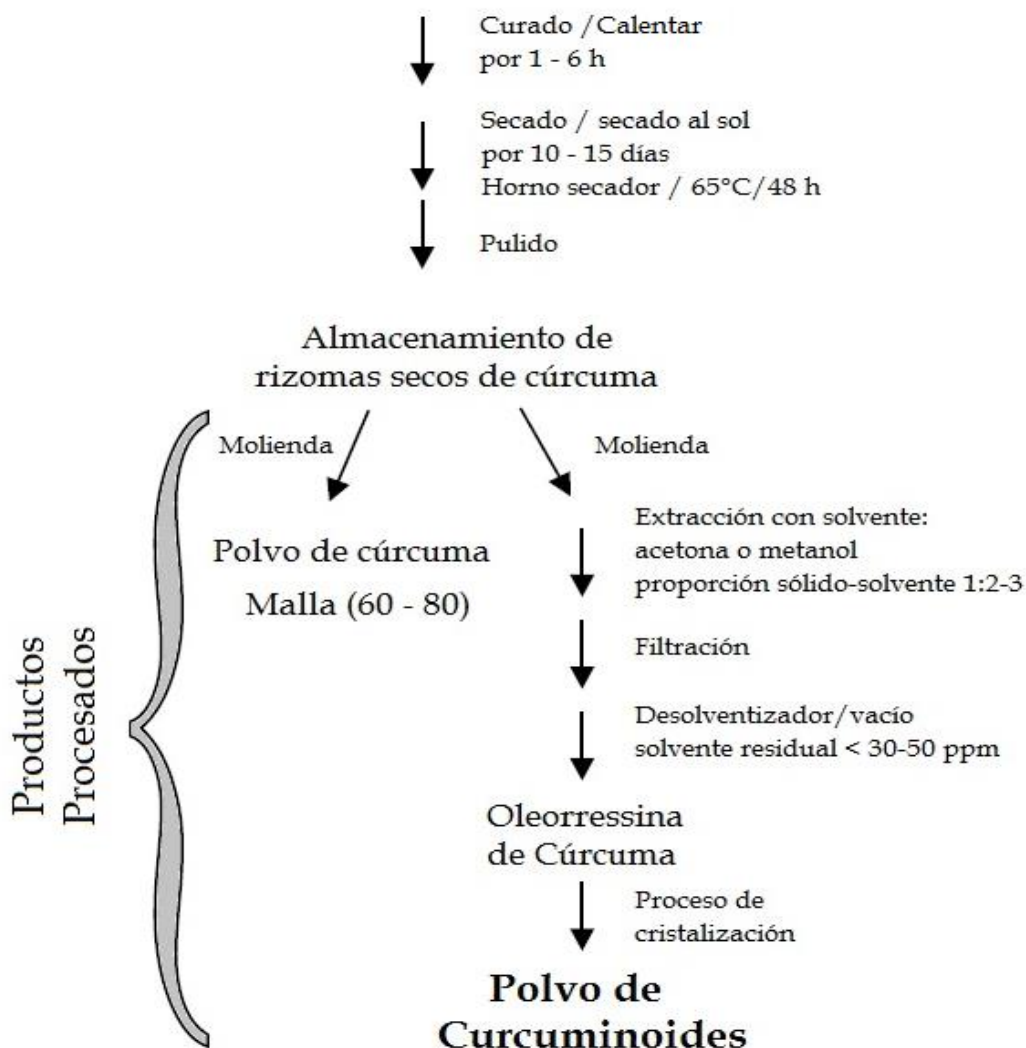


Figura 7. Diagrama para la obtención de curcuminoides [52]

2.3.3 Composición química, propiedades y estructura de la curcumina

La planta cúrcuma contiene del 2 al 9% curcuminoides, partiendo de este porcentaje aproximadamente un 77% corresponde a curcumina, 17% desmetoxicurcumina y 3% bisdesmetoxicurcumina además de otros compuestos relacionados. Está se utiliza comúnmente como colorante y como aditivo alimentario. La OMS declaró la ingesta diaria aceptable de curcumina como aditivo alimentario en el rango de 0 a 3 mg/kg [53].

La curcumina, de composición química $C_{21}H_{20}O_6$, es un derivado de la desmetoxicurcumina a través de una reacción mediada por una hidrolasa y la enzima O-metiltransferasa (OMT), que a su vez proviene de la bisdesmetoxicurcumina a partir de una hidrolasa y la OMT (Figura 8) [54].

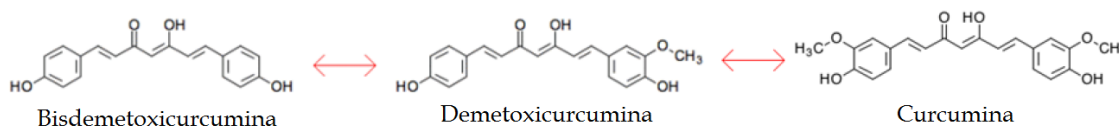


Figura 8. Curcuminoides

a) Propiedades de la curcumina

La curcumina 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, es una bis- α,β -insaturado β -dicetona, se describe como un compuesto cristalino con un color amarillo anaranjado brillante tiene un punto de fusión entre 183 a 186 °C con un peso molecular 368.39 g/mol, poco soluble en agua, éter de petróleo y benceno; soluble en alcoholes metílico y etílico, ácido acético glacial, y en propilenglicol; muy soluble en acetona y éter etílico; es un compuesto lipofílico, su estructura se compone de dos metoxifenoles α y β -dicetona. Estos grupos funcionales poseen la propiedad de ser antioxidantes [52,53,55].

b) Estructura de la curcumina

La estructura química de la curcumina, se detallan en la Figura 9. La curcumina presenta tautomería cetoenólica dependiente de la acidez de la solución. En medios ácidos y neutros, la forma ceto (1a) es dominante, mientras que en medios alcalinos existe en forma enólica (1b). La forma enólica se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno asistidos por resonancia [53].

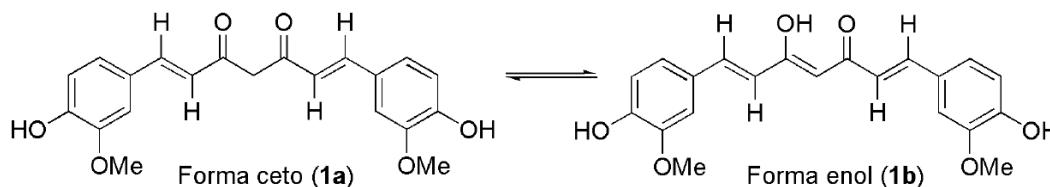


Figura 9. Tautómeros de la curcumina [56]

c) Composición nutricional de la cúrcuma

De acuerdo “*National Nutrient Database for Standard Reference*” del Centro de información de alimentos y nutrición de la USDA, la cúrcuma es una planta poco calórica, baja en grasas y fundamentalmente compuesta por carbohidratos. Presenta una alta proporción de minerales como el potasio, el fósforo y el magnesio, y es una buena fuente de vitaminas C y E. En la Tabla 1 se desglosa la composición nutricional por cada 100g de cúrcuma y por 3 g que equivalen a una ración por persona [54].

Tabla 1. Resumen sobre la composición nutricional de 100g de cúrcuma y por 3 g que equivalen a una ración por persona (“*National Nutrient Database for Standard Reference*”) [57].

NUTRIENTES	UNIDAD	VALOR POR 100g	VALOR POR 3g
Agua	g	12.85	0.39
Energía	kcal	312	9
Proteínas	g	9.68	0.29
Lípidos totales (grasas)	g	3.25	0.10
Carbohidratos	g	67.14	2.01
Fibra dietética total	g	22.7	0.7
Azúcares totales	g	3.21	0.10
MINERALES			
Calcio, Ca	mg	168	5
Hierro, Fe	mg	55.00	1.65
Magnesio, Mg	mg	208	6
Fósforo, P	mg	299	9
Potasio, K	mg	2080	62
Sodio, Na	mg	27	1
Zinc, Zn	mg	4.50	0.14
VITAMINAS			
Vitamina C total (ácido ascórbico)	mg	0.7	0.0
Tiamina	mg	0.058	0.002
Riboflavina	mg	0.150	0.004
Niacina	mg	1.350	0.041
Vitamina B-6	mg	0.107	0.003
Folato, DFE	µg	20	1
Vitamina B-12	µg	0.00	0.00
Vitamina A, RAE	µg	0	0
Vitamina A, IU	IU	0	0
Vitamina E (alfa-tocoferol)	mg	4.43	0.13
Vitamina D (D2 + D3)	µg	0.0	0.0
Vitamina D	IU	0	0
Vitamina K (filoquinona)	µg	13.4	0.4
LÍPIDOS			
Ácidos grasos saturados, total	g	1.838	0.055
Ácidos grasos monoinsaturados, total	g	0.449	0.013
Ácidos grasos poliinsaturados, total	g	0.756	0.023
Ácidos grasos trans, total	g	0.056	0.002

2.3.4 Principales usos de la cúrcuma y curcumina

La curcumina y cúrcuma son utilizadas en el sector alimentario, en medicina y en cosmética, debido a sus principales características funcionales, como colorante, actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas y antitumorales [7].

a) Industria alimentaria

La cúrcuma ha sido aprobada por el Comité Científico de Alimentación de la Comunidad Europea y presenta el número de E100 en la lista de aditivos. La cúrcuma se puede utilizar como antioxidante, aromatizante y colorante natural alimenticio (color amarillo brillante) [7]. En la industria se emplea como colorante alimentario natural para helados, salsas, sopas, confitería, postres, quesos, alimentos precocidos, bebidas, condimentos, entre otros; así como también para encurtidos, como mostazas, adobos y para los polvos del curry [58]. Sin embargo, las aplicaciones alimentarias de curcumina se han visto limitadas por su baja solubilidad en agua y una dispersabilidad inadecuada en los sistemas alimentarios debido a su naturaleza hidrofóbica. Las técnicas de nanoencapsulación pueden mejorar la capacidad antimicrobiana y antioxidante de compuestos fenólicos como la curcumina, porque proporcionan una liberación sostenida, estabilidad y solubilidad mejorada en medios acuosos, lo que lleva a promover su funcionalidad y bioactividad sin ningún cambio considerable en la calidad y las propiedades sensoriales de los alimentos [7].

b) Medicina

En este campo se han investigado ampliamente los beneficios de la curcumina, ya que presenta un importante potencial terapéutico, debido a la diversidad de moléculas diana sobre las que puede actuar en diferentes patologías (Figura 10). Siendo una molécula altamente pleiotrópica o pluripotente, la curcumina presenta diferente actividad biológica dependiendo del nivel estructural en el que nos centremos. Puede actuar directamente y modular la actividad de moléculas diana, o puede actuar indirectamente para regular determinadas funciones. Se han encontrado más de treinta proteínas diferentes que interactúan directamente con la curcumina, incluyendo ADN polimerasa, quinasa de adhesión focal (FAK), tioredoxina (TRX) reductasa, proteína piruvato quinasa (PK) C, lipoxigenasa (LOX), tubulina, el factor nuclear-kappa B (NF-κB) y la actina. También se ha demostrado que la curcumina puede unirse a ciertos iones metálicos divalentes tales como Fe, Cu, Mn y Zn formando complejos con alto potencial farmacológico [56].

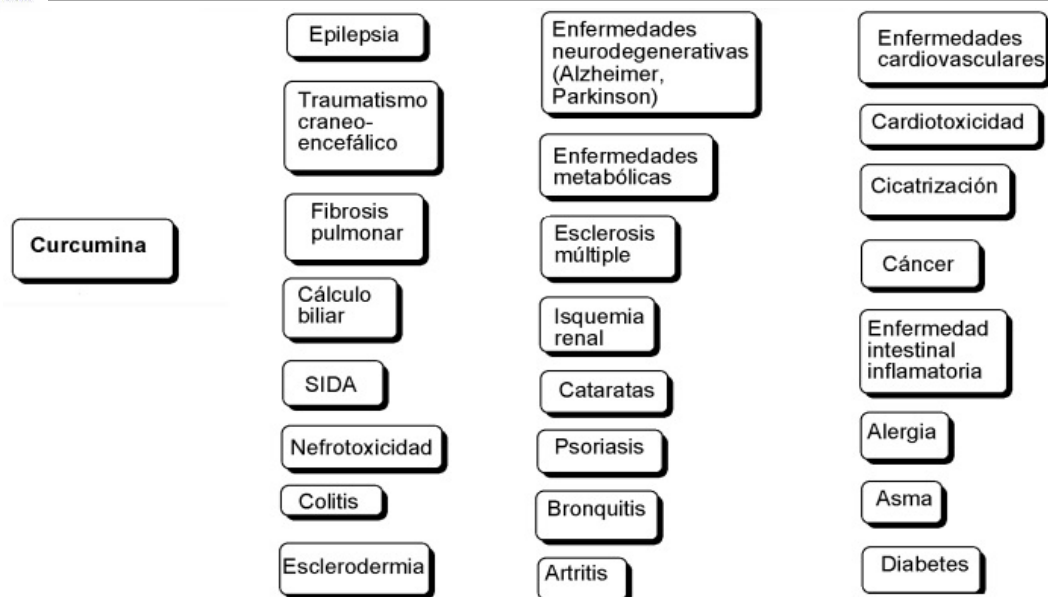


Figura 10. Actividades biológicas de la curcumina [56]

Las citas bibliográficas sobre la relación de la curcumina con aspectos biológicos que incluyen actividades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, tratamiento de enfermedades como la de Alzheimer, entre otros, son innumerables, por ello solo mostraremos el porcentaje de las diversas aplicaciones medicinales de los curcuminoides (Figura 11) y comentaremos algunas de ellas [59].

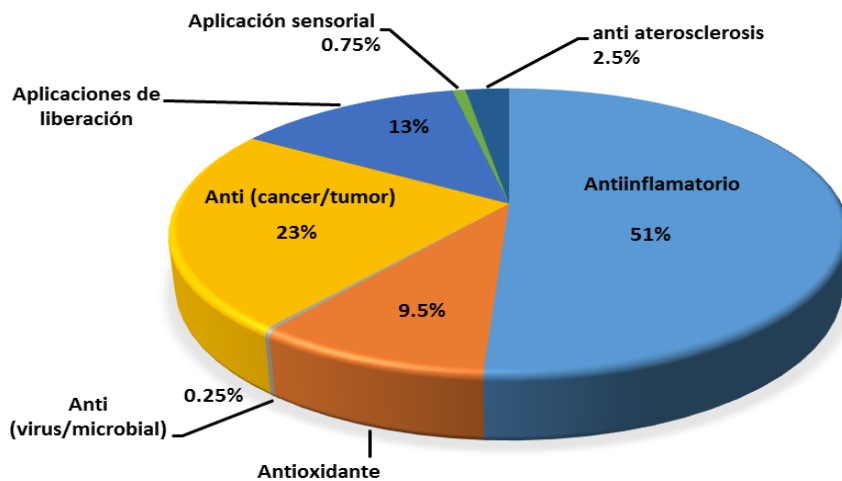


Figura 11. Porcentaje de las diversas aplicaciones medicinales de los curcuminoides [59]

Curcumina – Tratamiento Antiinflamatorio

La curcumina tiene un papel antiinflamatorio bien establecido al regular numerosos factores de transcripción y citocinas relacionados con la inflamación [8]. La artritis, una inflamación de las articulaciones, suele ser una enfermedad crónica que resulta de la desregulación de citocinas proinflamatorias (e.g., factor de necrosis tumoral e interleucina-1b), enzimas proinflamatorias que median en la producción de prostaglandinas (e.g., ciclooxigenasa-2) y leucotrienos (e.g., lipooxigenasa), junto con la expresión de moléculas de adhesión y metaloproteinasas de matriz, e hiperproliferación de fibroblastos sinoviales. Todos estos factores están regulados por la activación del factor de transcripción nuclear- κ B. Por tanto, los agentes que suprimen la expresión del factor de necrosis tumoral α , interleucina 1b, ciclooxigenasa 2, lipooxigenasa, metaloproteinasas de matriz o moléculas de adhesión que suprimen la activación de NF- κ B, tienen potencial para el tratamiento de artritis. Trabajos recientes han demostrado que la curcumina puede regular negativamente la activación del factor de transcripción NF- κ B, lo que conduce a la regulación negativa de la expresión de TNF- α , moléculas de adhesión, MMP, COX-2, 5-LOX y otros intermediarios inflamatorios, todos los cuales están asociados con la artritis [60].

Curcumina – tratamiento cáncer

Las enfermedades cancerosas son la principal causa de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Respecto al cáncer de estómago hay muchas propuestas para combatir los tumores malignos que incluyen cirugía, terapias biológicas, terapias dirigidas, crioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, radioterapia y quimioterapia. De estas, aunque la quimioterapia ha sido una forma eficaz, se siguen buscando mecanismos que permitan disminuir el efecto citotóxico en relación a las células normales [61]. En este sentido, existe evidencia de que la curcumina actúa disminuyendo los efectos citotóxicos. Varios estudios demostraron que la curcumina podría inhibir factores proinflamatorios e inflamatorios como NF- κ B, COX, STAT3, xantina oxidasa y óxido nítrico sintasa inducible, sensibilizando las células cancerosas frente a la quimioterapia y reduciendo la toxicidad [62].

Curcumina – Tratamiento Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer constituye una causa creciente de deterioro cognitivo en la población que envejece. A pesar de los múltiples esfuerzos, los tratamientos actuales no producen los efectos terapéuticos deseados (detener o ralentizar la progresión de la enfermedad). La evidencia acumulada sugiere que las respuestas al estrés inflamatorio y oxidativo son posibles factores causales de los deterioros cognitivos en la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento saludable. La

curcumina ha recibido un mayor interés debido a su estructura molecular única que se dirige a las vías inflamatorias y antioxidantes, así como a la agregación (directamente) de amiloide; una de las principales características de la enfermedad de Alzheimer. El principal mecanismo de la curcumina para este tratamiento es por la activación de la vía óxido nítrico sintasa neuronal / óxido nítrico (nNOS/NO), en donde se demostró que el pretratamiento con curcumina aumentó significativamente la actividad de la vía nNOS/NO en la corteza prefrontal (CPF), la amígdala y el hipocampo. Por lo tanto, mejoró los déficits de memoria en ratones viejos evaluados en tareas de reconocimiento de objetos y evitación pasiva [63].

c) Industria cosmética

La cúrcuma normalmente se ha utilizado como rutina diaria para el cuidado de la piel entre las mujeres del sur de la India, debido a sus propiedades como agente antienvjecimiento, retención de humedad y actividad antioxidante en productos de belleza. Aunque la cúrcuma tiene múltiples actividades beneficiosas, su inestabilidad bajo ciertas condiciones ambientales, hacen que los investigadores busquen nuevas alternativas de administración para aplicaciones de belleza y cuidado de la piel. Las técnicas de nanoentrega, como los nanoacarreadores de lípidos sólidos, los nanoliposomas, los nanoniosomas y las nanoemulsiones, resuelven la mayoría de los problemas asociados a la cúrcuma y mejoran la biodisponibilidad de sus compuestos polifenólicos [64].

2.3.5 Biodisponibilidad y toxicidad

a) Biodisponibilidad

La biodisponibilidad de la curcumina se ha estudiado en numerosas investigaciones en roedores de laboratorio (ratón, rata) así como en humanos. Generalmente, la biodisponibilidad oral de la curcumina es baja debido a una absorción intestinal (intestino delgado) y un metabolismo rápido en el hígado, seguido de la eliminación a través de la vesícula biliar. Se ha demostrado en ratas Sprague Dawley que, tras la administración oral de curcumina (1 g kg^{-1} peso corporal), la mayor parte de la curcumina se elimina inalterada a través de las heces. La curcumina, por lo tanto, se elimina principalmente por excreción fecal con una eliminación mínima en la orina [65]. La curcumina es eliminada dentro de las primeras 24 horas después de su administración [66].

Se han estudiado las propiedades farmacocinéticas en ratones, después de la administración intraperitoneal de 0.1g/kg de curcumina, observando que 2.25 $\mu\text{g/g}$ de curcumina aparece en plasma en los primeros 15 minutos, una hora después de la administración, los niveles de curcumina en el intestino, bazo, hígado y riñones fueron de 177, 26, 27 y 7.5 $\mu\text{g/g}$ respectivamente [67].

Sharma R. [68] menciona que la curcumina tiene una pobre absorción y que su biodisponibilidad sistémica es limitada. Con un consumo diario de 3.6 g de curcumina oral, los niveles de activo y conjugados en plasma están cercanos al límite de detección (5 pmol/mL). Estos hallazgos son consistentes con los encontrados en un estudio de ensayo clínico (Fase I) realizado por Cheng Ann-Lii [69]. En este estudio participaron 25 pacientes que tenían diferentes lesiones precancerosas, en donde demostraron que con dosis diarias orales de 4, 6 y 8 g de curcumina durante tres meses no registraron ninguna toxicidad [69].

Se sabe que la curcumina es más estable a pH ácido, siendo su degradación extremadamente lenta a pH's entre 1 y 7 (en condiciones del estómago, pH 1-2 y del intestino delgado, pH 6.5). Su elevada lipofilia permite una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva. Tras su administración, es metabolizada y excretada principalmente por bilis, heces y orina [44].

b) Toxicidad

La cúrcuma se consume generalmente a diario en la India y varios otros países asiáticos. De hecho, la ingesta diaria máxima de cúrcuma en Nepal es de aproximadamente 1.5 g (que corresponde a aproximadamente 50 mg de curcumina) y en la India puede llegar a 2.0-2.5g (que corresponde a un máximo de aproximadamente 100 mg de curcumina). Los ensayos clínicos han utilizado dosis de curcumina farmacológicamente eficaces que superan la ingesta dietética normal. En numerosos estudios de fase I, no se observaron efectos adversos en humanos que tomaron hasta 12 g de curcumina por día por vía oral (200 mg kg^{-1} peso corporal) durante un período de cuatro meses. En 2 de cada 15 sujetos, sin embargo, la ingesta diaria de curcumina provocó diarrea (grado 1-2) y en un sujeto, náuseas (grado 2) [65].

La curcumina ha sido evaluada por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y el comité científico de alimentos (SCF), en donde el JECFA estableció un valor de ingesta diaria aceptable (IDA) de 0 a 3 mg kg^{-1} peso corporal por día para la curcumina en 2004. El valor de la IDA de 3 mg kg^{-1} peso corporal por día, se basó en el NOAEL (no se observaron efectos adversos nivel de efecto) de 250-320 mg kg^{-1} peso corporal por día. El SCF, por otro lado, no ha realizado ninguna especificación para el valor de la IDA de la curcumina. Según la

Directiva 67/548 / EWG, la curcumina no representa una amenaza para el hombre ni para el medio ambiente. El JECFA evaluó cuatro estudios de toxicidad oral aguda en ratones y ratas y encontró valores de LD₅₀ de 2-10 g kg⁻¹ peso corporal para ratones y 5-10g kg⁻¹ peso corporal para ratas [65].

2.3.6 Actividad antioxidante

La curcumina y sus derivados carbocíclicos son buenos agentes antioxidantes mostrando una importante actividad frente a los radicales libres. Respecto a la curcumina el mecanismo de oxidación puede seguir dos rutas (Figura 12). En una de ellas se forma un radical fenoxilo (PR1) en el grupo OH fenólico y en la otra es el grupo CH₂ de la heptanodiendiona quien pierde un H· para generar el correspondiente radical (CR1). Por la teoría funcional de la densidad (DFT), se calcularon las energías de disociación del OH fenólico y el grupo CH₂ metilénico y se determinó que el OH fenólico poseía una energía de disociación menor que la disociación del enlace CH del CH₂ central de la curcumina, lo que sugiere que el OH fenólico es el grupo de mayor vulnerabilidad para los radicales libres en la curcumina [56].

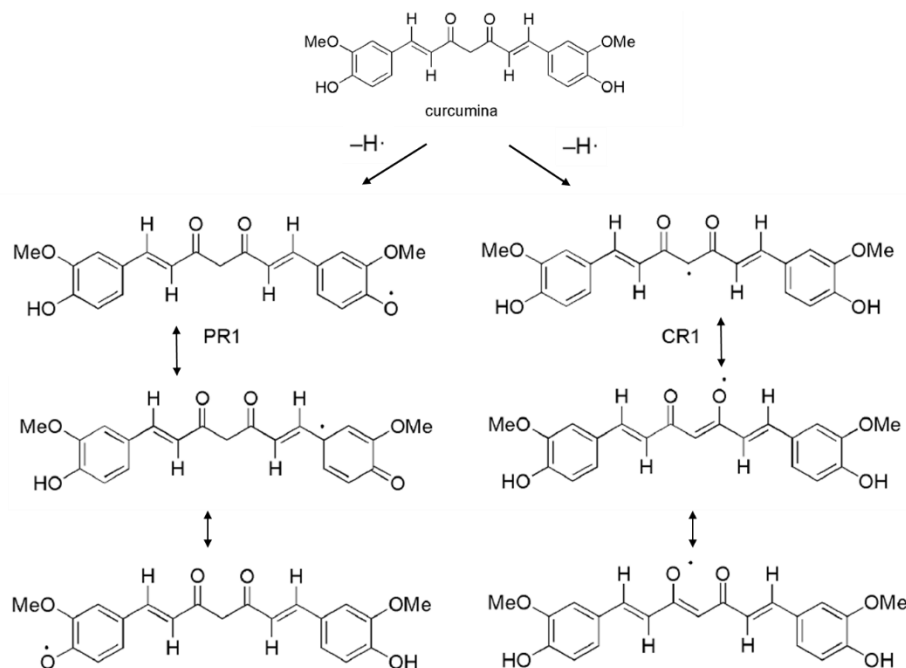


Figura 12. Mecanismos de oxidación de la curcumina [56]

2.4 Nanopartículas

2.4.1 Nanotecnología y nanopartículas

El uso de tecnologías a nanoescala en medicina ha estado en el centro de atención en los últimos años, por su potencial de innovar la atención médica. La nanomedicina está emergiendo como una de la más proyectadas en un futuro cercano debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. Dentro de la gran variedad de ramas de la nanomedicina, encontramos el diseño de nanosistemas de liberación de fármacos que proponen modificar los tratamientos convencionales de la administración de activos, incluyendo la focalización específica, seguridad y disminución de la toxicidad mientras se mantienen los efectos terapéuticos [70]. Estos sistemas de suministro pueden definirse como partículas con dimensiones de 1-1000 nm y pueden prepararse a partir de cualquier tipo de material biocompatible, mejorando sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas [71], teniendo como principal objetivo, la protección de los agentes terapéuticos y mejorar su distribución.

Existen una gran variedad de sistemas nanoparticulados, dependiendo de su naturaleza química; los sistemas que son específicos para la nanomedicina incluyen principalmente vehículos basados en polímeros o lípidos como: liposomas, micelas, dendrímeros, nanocristales, nanocápsulas, nanopartículas (NP) de carbono, NP de sílice, NP de cerámica, NP de quitosán, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y nanoemulsiones [72-74].

2.4.2 Nanopartículas lipídicas

Los sistemas coloidales formados por lípidos tienen mayor aceptación para ser utilizados como acarreadores de medicamentos pocos solubles. En términos generales los lípidos pueden definirse como moléculas hidrofóbicas o anfipáticas insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Los primeros sistemas que se desarrollaron fueron en los años 80, llamados micropartículas lipídicas sólidas (SLM), que se preparaban mediante secado por atomización o congelación atomización, posteriormente en los años 90 se diseñaron dispersiones acuosas de nanopartículas lipídicas (SLN) en un rango de tamaño submicrónico que contienen entre 0.1% y 30% p/p de lípidos sólidos y son estabilizadas por un surfactante cuya concentración varía entre 0.5% y 5% p/p. Se ha mencionado que los SLN tienen varias características que los hacen interesantes como buena capacidad de carga, viabilidad de encapsular sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas y permiten modular el comportamiento de liberación de sustancias activas, sin embargo, se hizo evidente que la solidificación y cristalización del lípido sólido de la fase dispersa conducen a la expulsión de las sustancias activas, provocando un grave problema de inestabilidad.

Para resolver esta inestabilidad, se desarrolló un nuevo sistema coloidal a partir de mezclas binarias de lípidos en las que parte del lípido sólido se reemplaza por un lípido líquido (aceite) o una mezcla de lípidos líquidos, dando lugar a los acarreadores de lípidos nanoestructurados (NLC) [75].

2.4.3 Acarreadores lipídicos nanoestructurados

Los NLC están compuestos por un lípido sólido, lípido líquido y tensoactivo. Los lípidos utilizados se parecen a los de la piel y el sebo, lo que contribuye a una mejor biocompatibilidad, con un riesgo toxicológico limitado. El estado sólido de la nanopartícula se mantiene a temperatura ambiente y temperatura corporal. A diferencia de los SLN, el lípido líquido evita la recristalización del lípido sólido durante su almacenamiento, así como el incremento en el tamaño de partícula; permitiendo una mayor estabilidad y contribuyendo a aumentar la capacidad de carga, ya que una buena cantidad puede alojarse en las imperfecciones de la partícula [75-23].

Los NLC presentan las siguientes ventajas, algunas relacionadas con los SLN, ya que se consideran en la literatura sistemas de segunda generación de las nanopartículas lipídicas [23-76].

- Menor toxicidad (lípidos reconocidos como GRAS) (generally recognized as safe)
- Alta capacidad de carga
- Mayor estabilidad (hasta 3 años)
- Excelente reproducibilidad en producción
- Incorporación de activos hidrofílicos y lipofílicos
- Amplio espectro de aplicaciones (intravenoso, oral, tópico)

Se han desarrollado diferentes formulaciones utilizando una amplia variedad de excipientes y moléculas activas. A fin de conocer el acomodo preferencial del fármaco, se describen tres tipos de estructuras [76]: (I) tipo imperfecto, (II) tipo amorfo y (III) tipo múltiple (Figura 13).

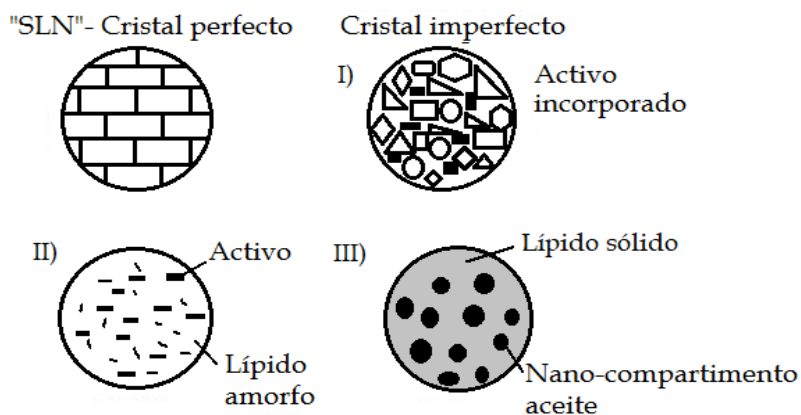


Figura 13. Los tres tipos de acomodación de los NLC: (I) imperfecto; (II) amorfo y (III) Múltiple [76]

La estructura de tipo imperfecto (I): el orden de los cristales se obtiene, mezclando lípidos espacialmente diferentes, por ejemplo, glicéridos con ácidos grasos en donde hay un aumento en las distancias entre las cadenas de ácidos grasos, esta matriz no puede formar una estructura altamente ordenada, creando espacios que permite una mayor carga del medicamento.

La estructura tipo amorfo (II): se puede lograr mezclando lípidos sólidos con lípidos especiales, por ejemplo: hidroxioctacosanilhidroxiestearato, miristato de isopropilo o triglicéridos de cadena media como Miglyol 812. En donde la estructura especial de la matriz lipídica previene la expulsión del fármaco causada por el proceso de cristalización del activo, ya que los NLC son sólidos en estado amorfo pero no cristalino.

Estructura tipo múltiple (III): esta estructura se forma cuando una mayor cantidad de lípido líquido se mezcla en lípidos sólidos. A bajas concentraciones, las moléculas de lípido líquido se dispersan fácilmente en la matriz lipídica. El exceso de lípido líquido conduce a una separación de fases que produce pequeños nanocompartimentos oleosos rodeados por la matriz de lípidos sólidos. Dichos compartimentos permiten la liberación controlada de fármacos y la matriz lipídica evita la fuga de fármacos [76-77].

2.4.4 La función del tensoactivo

Los tensoactivos reducen la tensión interfacial entre el lípido y la fase acuosa, contribuyen en la estabilidad de la formulación. Los tensoactivos son de naturaleza anfifílica, es decir una porción hidrofóbica no polar (no miscible al agua), generalmente una cadena de hidrocarburo y una porción hidrofílica (soluble en agua) que puede ser no iónica, iónica o de ion híbrido. Estas moléculas se ubican de preferencia en la interfaz. La selección del tipo de tensoactivo se realiza de acuerdo al

HLB de los lípidos, concentración en la fase lipídica de la dispersión, capacidad para solubilizar el activo y a la naturaleza de los grupos de cabeza polar [23, 78].

2.4.5 Métodos de preparación

Se han desarrollado varios métodos de elaboración de nanopartículas lipídicas, adaptables para sistemas como las SLN o los NLC. La selección del tipo de método se relaciona con las siguientes recomendaciones generales como: la solubilidad y estabilidad del fármaco, propiedades morfológicas lipídicas deseadas, el costo-beneficio y limitaciones técnicas [77].

a) Método de Homogenización a alta Presión

La homogenización a alta presión es el método principal para la producción de SLN y NLC. Las ventajas de esta técnica van más allá del corto tiempo de producción. Este método permite la producción a escala de investigación (laboratorio o piloto). Además, evita el uso de disolventes orgánicos, lo que produce un tamaño de partícula promedio en la región submicrométrica. En este método el homogeneizador empuja un líquido con alta presión (100–2000 bar) a través de un espacio muy estrecho (tamaño de micras): al aplicar alta presión en el líquido, este se acelera a una velocidad (más de 1000 km/h). El alto esfuerzo cortante y las fuerzas de cavitación reducen las partículas aceleradas a un tamaño submicrométrico. La homogenización a alta presión de SLN y NLC se puede realizar tanto a altas como a bajas temperaturas [23].

b) Método de alta homogenización de corte y / o ultrasonidos

La alta homogenización de cizallamiento y la ultrasonicación son técnicas de dispersión. Las nanopartículas lipídicas se obtienen por el calentamiento de un lípido sólido, aproximadamente entre 5 a 10 °C por encima de su punto de fusión. Posteriormente el lipídico se dispersa en una solución acuosa con tensoactivo a la misma temperatura, bajo agitación a una alta velocidad para formar una emulsión. La sonicación posterior reduce el tamaño de gota de la emulsión [77].

c) Método emulsificación/evaporación de disolvente

En esta técnica, la matriz lipídica y el fármaco se disuelve en un disolvente orgánico inmiscible con agua y se emulsiona por la fase acuosa. El disolvente se evapora a presión reducida, favoreciendo la formación de dispersión de nanopartículas por precipitación de lípidos en el medio acuoso. Este método es totalmente libre de calor, dando como resultado nanopartículas muy pequeñas de hasta 100 nm, dependiendo de los componentes integrados en la fase orgánica. Sin

embargo, un inconveniente es el uso de disolventes orgánicos, además de que pueden dejar residuos tóxicos en la muestra [23].

d) Método emulsificación/difusión de disolvente

Este método implica la formación de una emulsión aceite en agua con un disolvente parcialmente miscible en agua de baja toxicidad. El método se basa en dos fases, una orgánica y otra acuosa. La fase orgánica se prepara a partir de un disolvente orgánico parcialmente soluble en agua en el que se disuelve el material lipídico y la sustancia activa. La fase acuosa consiste en una dispersión de un agente estabilizante. Previo a la preparación de las fases orgánica y acuosa, el disolvente orgánico y el agua deben saturarse mutuamente lo que permite alcanzar el equilibrio termodinámico de ambos líquidos y gracias a lo cual, al mezclar la fase orgánica con la fase acuosa es posible la formación de una emulsión del tipo aceite en agua utilizando un sistema de agitación de elevada fuerza de corte. Una vez formada, esta emulsión transitoria de aceite en agua es diluida en una cantidad de agua que asegure la disolución de todo el disolvente orgánico utilizado, lo que permite su difusión desde el interior de las gotas de la fase orgánica dispersa hacia la fase externa, dando como resultado la solidificación de la fase dispersa y la formación de nanopartículas [23].

e) Método inyección de disolvente

El método implica la precipitación instantánea de un polímero a partir de una solución orgánica por difusión del disolvente al medio acuoso. Los lípidos y fármaco se disuelven en un disolvente miscible con agua (por ejemplo, acetona, isopropanol y metanol) y se inyectan rápidamente en una solución acuosa de surfactantes a través de una aguja de inyección. En este método, el tamaño de partícula de los SLN/NLC puede verse influenciado y controlado por la variación de los parámetros del proceso, tales como disolvente inyectado, concentración de lípidos, volumen inyectado de disolvente, concentración de lípidos en la fase disolvente y viscosidad de la fase acuosa [77].

f) Método de temperatura de inversión de fase (PIT)

Este método es libre de disolventes. Consiste en mezclar los componentes de la formulación (lípidos, fármaco, agua y surfactante) bajo agitación magnética y aplicar tres ciclos de temperatura (85 - 60 °C) para inducir la inversión de fase, y la temperatura a la que ocurre la inversión se denomina PIT. Posteriormente, se aplica un choque térmico diluyendo la mezcla en agua destilada fría, dando como resultado un proceso inverso y se forman espontáneamente partículas lipídicas [77].

III. HIPÓTESIS

Si se formulan curcuminoides en acarreadores lipídicos nanoestructurados, esto permitirá preservar su estabilidad, se logrará una liberación prolongada y se favorecerá su penetración en piel, mejorando con ello su actividad antioxidante.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

- ❖ Evaluar la capacidad de los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) para favorecer la penetración en piel de curcuminoides, con el fin de proponerlos como un sistema de liberación para vía tópica y transdérmica, que preserve la actividad antioxidante de estos activos.

Objetivos particulares

- Preparar NLC conteniendo curcuminoides, mediante el método de homogenización a alto cizallamiento, definiendo las condiciones óptimas en cuanto al tipo de lípido líquido-sólido, estabilizante, tiempo de agitación y velocidad de agitación.
- Caracterizar los NLC preparados mediante determinaciones de tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial Zeta, morfología, contenido de principio activo, cinética de liberación y estabilidad.
- Determinar la cantidad y la distancia de penetración de los NLC mediante pruebas de permeación *in vitro* y empleando la técnica de microscopía de láser confocal.
- Determinar la capacidad antioxidante de los curcuminoides en los diferentes sistemas nanoparticulados, empleando la prueba de ABTS⁺.

V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 Materiales

Los curcuminoides ($\geq 81\%$ curcumina y 19% otros curcuminoides) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (México). Lípidos sólidos: Compritol® 888 ATO (dibehenato de glicerilo), Precirol® ATO 5 (diestearato de glicerilo), Labrafil® M 2130 CS (lauroyl polioxil-6 glicéridos), Gelot™ 64 (monoestearato de glicerilo y estearato de Peg-75), Apifil® (cera de abejas Peg-8), Gelucire® 44/14 (lauroyl Peg-32 glicéridos) y Suppocire® AP (glicéridos poliglicolizados saturados) de Gattefossé (Francia), fueron donados por Lyontec (México). La lecitina de soya fue proporcionada por Reactivos Meyer (México). El ácido esteárico fue adquirido en Merck (EEUU). Los lípidos líquidos: Labrafac™ Lipophile WL 1349 (triglicéridos de cadena media), Labrasol® (caprilocaproil polioxil-8 glicéridos), Lauroglycol™ FCC (monolaurato de propilenglicol tipo I) y Capryol™ 90 (monocaprilato de propilenglicol tipo II) de Gattefossé (Francia), fueron amablemente donados por Lyontec (México). El miristato de isopropilo y los triglicéridos caprílico / cáprico se adquirieron en la Droguería Cosmopolita (México) y la glicerina fue proporcionada por la fábrica de jabón La Corona (México). Los tensoactivos Pluronic® F-68 (poloxámero 188) y Pluronic® F-127 (poloxámero 407) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (México) y el Tween 80 (Polisorbato 80) se adquirió de Hycel de México. Para la microscopía confocal se usaron los siguientes materiales: Albúmina de suero bovino pH 7.0 $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, México), Triton® X-100 (USB™, EEUU), Glicerol anhidro (JT Baker, México), Hoechst 33,342 (Thermo Scientific, Alemania), In Vitrogen® molecular Probes® Rodamina Faloidina TRITC (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y cloruro de sodio (Fermont, México). El agua se obtuvo de un sistema Milli-Q® (Millipore® Corp., MA; EEUU). Para la actividad antioxidante se usaron los siguientes materiales: ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), sal de diamonio de 2,29-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), comprada en Diagnostics Roche (Alemania); persulfato de potasio, adquirido de Sigma-Aldrich (México) y fosfato de sodio monobásico $\geq 99.0\%$ de J. T. Baker (México). Todos los reactivos eran de grado analítico y se usaron sin purificación adicional.

5.2 Equipos

Parrilla con agitador magnético multiplazas RT15 (IKA®, USA), Ultra-Turrax® T18 basic (IKA®, Alemania), Balanza analítica ATX224 (Shimadzu corporation, Japón), Parrillas con agitador magnético C-MAG HS 7 (IKA®, Alemania), Centrifuga Z326K (HERMLE, Alemania), Espectrofotómetro U-5100 (Hitachi, Japón), Liofilizadora (Labconco freeZone 2.5, USA), Zetasizer ZS90 (Malvern, USA), Microscopio electrónico

de transmisión JEM-1010 (JEOL, USA), Agitador magnético RO-15 (IKA-WERKE, Alemania), dermatoma (Zimer 901, USA), Celdas de permeación tipo Franz modificadas, área de exposición 0.78 cm², (fabricadas en el Taller de Vidrio Soplado de la FESC/UNAM), centrifuga EBA 12 (Hettich Zentrifugen, Alemania), Incubadora MRC (orbital shaker incubator, Alemania), Microscopio de láser confocal (Leica TCS SP8, Alemania), cámara de foto estabilidad (Binder, México), pH-metro 700 (Oakton Instruments, Singapur) y Equipo Millipore para la filtración y desionización de agua (Millipore, USA).

5.3 Material biológico

Orejas de cerdo obtenidas directamente del rastro antes de ser sometidas a tratamiento con agua caliente o vapor.

5.4 Preparación de acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados de curcuminoides

La selección de lípidos es un punto crítico para elaborar dispersiones de NLC, en donde la combinación de lípidos le proporciona al sistema, una alta solubilidad del activo y estabilidad termodinámica. Se estudiaron los siguientes lípidos sólidos: Apifil®, Compritol® 888 ATO, Precirol® ATO 5, Lecitina, Labrafil® M 2130 CS, Gelot™ 64, ácido esteárico, Gelucire® 44/14 y Suppocire® AP; lípidos líquidos: Labrafac™ Lipophile WL 1349, Labrasol®, Glicerol, Miristato de isopropilo, Triglicéridos caprílico/cáprico, Lauroglycol™ FCC y Capryol™ 90). Las determinaciones se llevaron a cabo, realizando pruebas de solubilidad de curcuminoides en cada uno de los lípidos, con el fin de elegir aquellos en que los curcuminoides fueran más solubles. La determinación se llevó a cabo de manera cualitativa, observando si el activo se disolvía en el lípido fundido, considerando como evidencia la presencia o ausencia de activo no disuelto a 75 °C con agitación constante.

Después de realizar pruebas de solubilidad con cada uno de los lípidos, se realizaron evaluaciones de compatibilidad con los lípidos que disolvieran en mayor cantidad a los curcuminoides, preparando mezclas binarias del lípido sólido / lípido líquido en una proporción 85:15 respectivamente, para observar si se presentaba separación de fases.

Los componentes lipídicos de los NLC se eligieron de acuerdo con los resultados de las pruebas de solubilidad y compatibilidad. Después de este cribado, a fin de encontrar los materiales y condiciones óptimas de elaboración de NLC, se prepararon una serie de sistemas de NLC-Placebo mediante el método de homogenización de alto

cizallamiento (método descrito en el siguiente párrafo) siguiendo un diseño factorial 2^3 , representado geoméricamente como se muestra en la Figura 14. Los factores estudiados fueron: tipo de lípido sólido, tipo de tensoactivo y concentración de tensoactivo. El tamaño de partícula (TP) y el índice de polidispersidad (PDI) se midieron mediante dispersión dinámica de luz, utilizando un Zetasizer ZS90 (Malvern, USA). Evaluando como respuesta el TP y el PDI, así como la estabilidad de los sistemas, eligiendo aquellos que mantuvieran sus propiedades originales y una distribucional unimodal al menos durante una semana.

Las dispersiones se prepararon por el método de homogenización de alto cizallamiento. Brevemente, el proceso consistió en preparar la fase oleosa y la fase acuosa por separado. La fase oleosa estuvo conformada por una mezcla de lípido sólido:lípido líquido 85:15 y curcuminoides. Esta fase se calentó a 75 °C en baño de agua durante 15 minutos con agitación magnética. Al mismo tiempo se preparó una solución acuosa, disolviendo el surfactante en agua (1 y 3% p/v), bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación que la fase lipídica. La dispersión coloidal se produjo añadiendo la solución acuosa a la fase oleosa y agitando a 15,000 rpm durante 5 minutos a 75 °C, empleando un Ultra Turrax® T18 Basic (IKA®, Alemania), calentando previamente el útil a 75 °C. Finalmente las nanopartículas lipídicas solidificaron enfriando la dispersión coloidal en baño de agua a 2 °C durante 15 minutos. El volumen final de los sistemas fue de 50 mL.

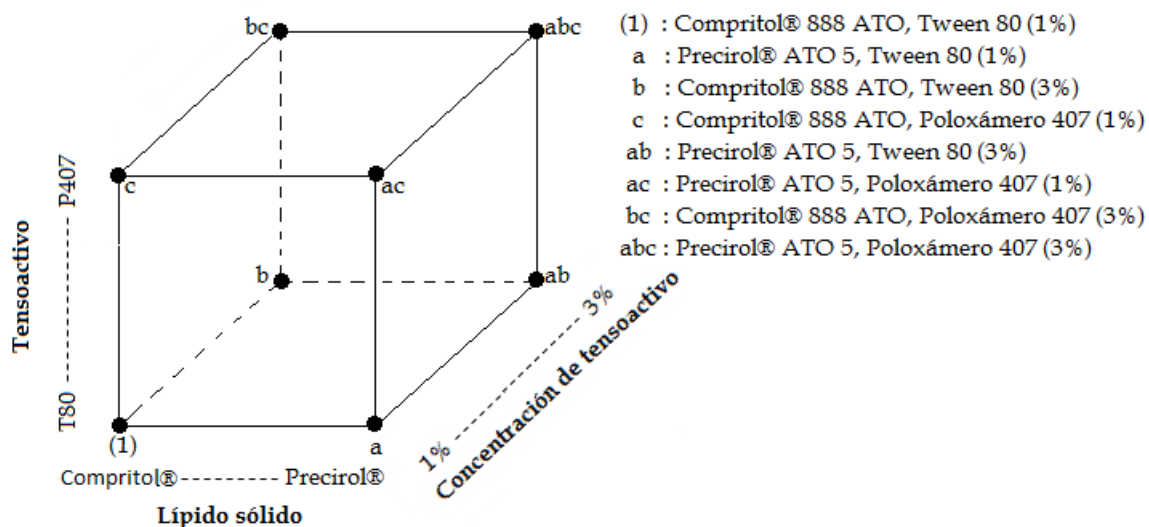


Figura 14. Representación geométrica del diseño factorial 2^3

5.5 Caracterización de nanopartículas conteniendo curcuminoides

El tamaño de partícula (TP), índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (PZ) de los sistemas nanoparticulados, se determinaron mediante espectroscopía de correlación de fotones utilizando un analizador de partículas (Malvern, USA). Para el tamaño de partícula e índice de polidispersión las muestras se diluyeron con agua destilada, agregando 145 μL de muestra a 1.2 mL de agua, el análisis se realizó a 25 °C con un ángulo de detección de 90°. Para medir el potencial Z la muestra se diluyó con agua desionizada, agregando 145 μL de muestra a 1.2 mL de agua.

Se determinó el porcentaje de curcuminoides atrapado en la matriz de lípidos (%EE), así como los curcuminoides libres para cada uno de los sistemas de la siguiente forma: Se colocaron en un tubo cónico, 10 mL de la dispersión de NLC y se centrifugó a 12,000 rpm (Centrífuga Z326K HERMLE, Alemania) durante 2 h a 10 °C para separar los curcuminoides libres. Al término de la centrifugación, el sobrenadante (conteniendo los NLC) se extrajo con ayuda de una pipeta Pasteur. Tanto el sobrenadante como el sedimento (conteniendo de curcuminoides libres), se disolvieron por separado en alcohol etílico. En el caso del sobrenadante el alcohol etílico permitió solubilizar la estructura lipídica. El sedimento por su parte, se agitó en un vórtex (IKA®, Alemania) durante 10 minutos a 16,000 rpm para facilitar la disolución de los curcuminoides en el etanol. Las muestras se filtraron a través de membranas de 0.45 μm (Merck Millipore, Ltd), tamaño de poro suficiente para retener los lípidos, analizando el contenido de curcuminoides por espectrofotometría UV a 424.5 nm (Espectrofotómetro U-5100, Hitachi, Japón).

La determinación del porcentaje de eficiencia de proceso (%EP) se realizó empleando placebos, siguiendo el procedimiento descrito para el %EE, descrito en el párrafo anterior, hasta el punto en que se centrifugaron, extrayendo el sobrenadante y el sedimento, los cuales se liofilizaron (Liofilizadora, labconco freeZone 2.5, USA) y se pesaron por separado.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a temperatura de aproximadamente 25 °C. Los valores de porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE), porcentaje de la eficiencia de proceso (%EP) y capacidad de carga (LC), se calcularon de acuerdo con las ecuaciones:

$$\%EE = \frac{W \text{ Activo NLCs}}{W \text{ Activo Total}} \times 100$$

$$\%EP = \frac{W \text{ NLC Placebo}}{W \text{ sólidos Totales}} \times 100$$

$$LC = \frac{W \text{ Activo NLCs}}{(W \text{ sólidos totales}) (\chi_{EP})}$$

Donde **W Activo NLCs** es la cantidad de curcuminoides cargados; **W Activo Total** es la cantidad total de curcuminoides añadida al momento de preparar los NLC; **W NLC Placebo** es la cantidad de lípidos que formaron los NLCs; **W sólidos Totales** es la cantidad de lípidos totales más surfactante empleados en la preparación de los NLC; χ_{EP} es la fracción de la eficiencia del proceso.

Estas determinaciones se llevaron a cabo empleando placebos cargados, asegurando con ello la cuantificación del 100% de los curcuminoides y evitando la obtención de valores erróneos.

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, calculando el valor promedio \pm S.D.

5.6 Morfología de los sistemas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las nanopartículas preparadas para cada sistema se observaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010, JEOL, USA). Una gota de nanopartículas fue aplicada en una rejilla de cobre recubierta de Formvar durante 2 minutos para formar una película delgada. Para mejorar el contraste se tiñó con una gota de ácido fosfotúngstico (1% p/v) y se eliminó el exceso con papel de filtro, después la rejilla se dejó secar a temperatura ambiente para su análisis.

5.7 Liberación *in vitro* de curcuminoides a partir de los NLC

El estudio de liberación de curcuminoides se llevó a cabo durante 24 horas por el método de diálisis, evaluando cuatro sistemas: CLT80-Cur, CLP407-Cur, PLT80-Cur, PLP407-Cur (los cuales se describen más adelante) y una solución de curcuminoides en etanol:agua (1:1 v/v). La determinación se realizó colocando 1 mL de cada sistema en bolsas de diálisis de 10 cm de largo con un corte de 6 - 8 kDa (tubo de diálisis Spectrum Laboratories, Inc.). Las membranas contenían el equivalente a 50 μ g de curcuminoides. El medio receptor consistió en 25 mL de etanol-agua (1:1 v/v), el cual se cubrió con papel Parafilm® y se mantuvo a 37 °C en un baño de agua, bajo agitación constante mediante una barra magnética, utilizando un agitador (IKA-WERKE modelo RO-15, Alemania). A intervalos de tiempo definido (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 h) se tomaron 2 mL de muestra del medio receptor, reponiendo inmediatamente con nuevo medio,

previamente calentado a 37 °C para mantener las mismas condiciones y el volumen constante; después las muestras se filtraron usando filtros de 0.45 µm (Merck Millipore, Ltd). La concentración del fármaco se evaluó por espectrofotometría (HITACHI, Japón modelo U-5100) a 428 nm. La cantidad de curcuminoides liberada de los NLC se calculó considerando la cantidad acumulada de curcuminoides por intervalo de tiempo. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

Para analizar la cinética de liberación *in vitro* de los curcuminoides y examinar el mecanismo que controla la liberación en los NLC, se seleccionaron diferentes modelos matemáticos (orden cero, primer orden, Higuchi y Peppas-Korsmeyer), empleando el software DDSolver.

5.8 Permeación *ex vivo* con piel de cerdo

Para este estudio se utilizó piel de oreja porcina y celdas de difusión tipo Franz. La piel de oreja de cerdo se retiró del cartílago sin eliminar el pelo y se almacenó a -20 °C hasta su uso. El grosor de la piel de cerdo se uniformó a aproximadamente 750 µm, usando un dermatoma (Zimer 901, USA). La piel se enjuagó con solución salina fisiológica y se montó entre el compartimento donador y el compartimento receptor de celdas tipo Franz, con el estrato corneo hacia el compartimento donador (Área de difusión 0.78 cm²). El medio receptor consistió de 2 mL de etanol-agua (1:1 v/v) a 37 °C en baño de agua y agitación constante mediante una barra magnética, durante todo el experimento, utilizando un agitador (IKA-WERKE modelo RO-15, Alemania). Después de alcanzar la temperatura se colocaron en el compartimento donador 0.5 mL de cada formulación y se utilizó como referencia una solución de curcuminoides (con una concentración de 100µg/mL de curcuminoides). A intervalos de tiempo regulares (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 h) se tomaron muestras del medio receptor (2 mL) reemplazando inmediatamente el volumen tomado con medio nuevo previamente calentado a 37 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 30 minutos (Centrifuge EBA 12 Hettich Zentrifugen, Alemania) para su análisis. La concentración del fármaco en el medio receptor se determinó por espectrofotometría (HITACHI, Japón modelo U-5100) a 428 nm. La cantidad permeada se calculó considerando la cantidad acumulada de curcuminoides por intervalo de tiempo. A partir de los gráficos obtenidos de cantidad permeada / área vs tiempo, se calculó el flujo y el coeficiente de permeabilidad para los diferentes sistemas. El experimento se llevó a cabo por sextuplicado.

5.9 Profundidad de penetración y distribución *ex vivo* de curcuminoides en piel de cerdo mediante microscopía de escaneo láser confocal

La determinación se llevó a cabo después de realizar las pruebas de permeación durante 24 horas para cada formulación y la solución de referencia. Una vez transcurrido ese tiempo, el exceso de formulación se eliminó de la superficie de la piel y se enjuagó tres veces con solución salina al 0.9%. Enseguida las muestras de piel se almacenaron en congelación para ser analizadas por microscopía de láser confocal.

El análisis se llevó a cabo por la técnica de marcaje de fluorescencia específica, es decir, se cortó el área permeada (0.78 cm²), se permeabilizó con una solución de Tritón X-100 al 1% en solución salina al 0.9% durante 20 minutos a 37 °C en una incubadora MRC (orbital shaker incubator, Alemania) agitando a 50 rpm con movimiento oscilatorio. Después se bloqueó con una solución de albúmina al 1% en solución salina al 0.9% durante 90 minutos, bajo las mismas condiciones de incubación. Transcurrido el tiempo se marcó con DAPI-Faloidina-Rodamina durante 120 minutos en las condiciones de incubación ya mencionadas, y finalmente las muestras se montaron en un portaobjetos, agregando una gota de glicerol - solución salina 0.9% (1:1 v/v) como hidratante, para después ser cubiertas con un cubreobjetos y ser analizadas en el microscopio.

Una vez que la piel se montó entre el portaobjetos de vidrio y el cubreobjetos, se obtuvieron imágenes con un microscopio confocal de escaneo láser invertido (Leica TCS SP8, Alemania), equipado con un láser de argón, sin ningún procesamiento adicional de la piel o fijación o seccionamiento mecánico. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 488 nm y 550 nm, respectivamente. El examen de la piel se realizó utilizando una apertura numérica de 20X/0.4, analizando las imágenes con el software Leica Las X.

Las imágenes resultantes fueron codificadas por colores. La fluorescencia de la piel porcina tenía un color rojo, originado por el marcador faloidina-rodamina; azul originado por Hoechst y de color verde originado por los curcuminoides. Cada formulación se analizó por triplicado con su respectivo placebo y como referencia una solución de curcuminoides.

5.10 Métodos analíticos para la cuantificación de curcuminoides

La cantidad de curcuminoides se determinó mediante un método espectrofotométrico UV usando un espectrofotómetro Hitachi (modelo U-5100, Japón).

En todas las determinaciones, se prepararon curvas de calibración, evaluando especificidad, linealidad, repetibilidad y exactitud [79]. Las condiciones en cada caso fueron las siguientes:

(a) *Determinación de la cantidad cargada en el NLC.* Disolvente: etanol; rango de concentración: 0.4 µg / mL - 2.0 µg / mL. La lectura se registró a 424.5 nm.

(b) *Cuantificación en los estudios de liberación in vitro.* Disolvente: etanol: agua (1: 1 v/v); rango de concentración: 0.4 µg / mL - 2.0 µg / mL. La lectura se registró a 428 nm.

(c) *Cuantificación en los estudios de permeación ex vivo.* Disolvente: etanol: agua (1:1 v/v), en contacto con la piel de las orejas de cerdo durante 24 h, posteriormente se filtró a través de una membrana de 0.45 µm. Rango de concentración: 0.2 µg / mL - 1.6 µg / mL. La lectura se registró a 430 nm.

5.11 Prueba de estabilidad

Se prepararon tres lotes distintos y se analizaron por triplicado. Las formulaciones se almacenaron protegidas de la luz en frascos de vidrio ámbar (volumen 5 mL, 1.5 cm de diámetro) a 5 °C y 25 °C, por un periodo de 3 meses. La estabilidad fisicoquímica se evaluó un día después de su fabricación y 3 meses después, midiendo TP, PDI, potencial Z, porcentaje de la cantidad de curcuminoides y porcentaje de inhibición. El porcentaje de la cantidad de curcuminoides se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cantidad de curcuminoides} = \left(\frac{C_f}{C_0} \right) \times 100$$

Donde C_f = Cantidad final y C_0 = Cantidad inicial. Además, se realizó un estudio de fotoestabilidad en donde las formulaciones de NLC que contenían curcuminoides se almacenaron en frascos de vidrio (volumen de 5 mL, 1.5 cm de diámetro) a 25 °C. Se probaron dos condiciones: con protección de luz (control oscuro) y sin protección, exponiendo las muestras a una iluminación global de no menos de 1.2 millones de lux-hora y una energía ultravioleta integrada de no menos de 200 vatios hora / metro

cuadrado durante 9 días. Las determinaciones de TP, PDI, potencial Z, contenido de curcuminoides y porcentaje de inhibición se evaluaron un día después de la preparación de los sistemas y después de haber sido expuestos a la radiación. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada sistema.

5.12 Actividad antioxidante

Esta prueba se realizó mediante el método del radical catiónico ABTS⁺, método propuesto por Re *et al.* [80] con algunas modificaciones, para esto, se hace reaccionar una solución de 7mM de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) con 5 mL de persulfato de potasio 2.45 mM en agua destilada a temperatura ambiente en la oscuridad durante 16 horas. Después de este tiempo, se toma 1 ml de la solución y se lleva a un volumen de 100 ml con solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.4 (solución de ABTS⁺). La absorbancia de la solución de ABTS⁺ se determinó a 734 nm (la lectura de esta solución fue de aproximadamente 0.70 ± 0.02 , utilizando una celda vacía para ajuste a cero). Los curcuminoides se extrajeron de las formulaciones lipídicas utilizando una solución de metanol:agua (1:1 v/v), centrifugando a 12,000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomó un volumen de 100 μ L de esta solución y se añadió a 1.9 mL de una solución de ABTS⁺, agitando manualmente durante 7 minutos. La absorbancia se midió a 734 nm. La solución sin muestra se utilizó como control. El efecto antioxidante se expresó en términos de reducción de la absorbancia ABTS⁺ referida como el porcentaje de inhibición de acuerdo con la ecuación.

$$\% \text{ Inhibición} = [1 - (A_F / A_0)] \times 100$$

Donde A_F = es la absorbancia en presencia de la muestra y A_0 = es la absorbancia de la reacción control. Se comparó el porcentaje de inhibición de curcuminoides incluidos en los NLC con el obtenido para una solución de curcuminoides en metanol en las mismas condiciones.

5.13 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Tukey o la prueba t de Student para evaluar las diferencias entre los grupos de datos. El nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Preparación de acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados de curcuminoides

De acuerdo con los resultados de solubilidad de curcuminoides (Tabla 2), compatibilidad entre los lípidos y capacidad para disolver los curcuminoides (Tabla 3), se encontró que Compritol® 888 ATO (s) Precirol® ATO 5 (s) y Labrasol® (l), muestran mayor solubilidad y buena compatibilidad. Por lo tanto, estos lípidos son adecuados para formar la matriz lipídica sólida-líquida y evaluar el tipo y concentración de surfactante a través del método de homogenización de alto cizallamiento previamente reportado por López G. *et al.* [81].

Solubilidad de curcuminoides en diferentes materiales

Tabla 2. Tabla general de lípidos sólidos y lípidos líquidos y su capacidad para disolver curcuminoides a 75 °C durante 15 minutos; "+" = Soluble, "(+)" = Soluble en caliente pero recristaliza a temperatura ambiente, "-" = No soluble.

Tipo de lípido	Lípidos (240 mg)	Capacidad para disolver curcuminoides (5mg)
Lípidos sólidos	Apifil®	-
	Compritol® 888 ATO	+
	Precirol® ATO 5	+
	Lecitina	-
	Labrafil® M 2130 CS	(+)
	Gelot™ 64	+
	Ácido esteárico	-
	Gelucire® 44/14	+
	Suppocire® AP	-
Lípidos líquidos	Miristato de isopropilo	(+)
	Labrafac™ Lipophile WL 1349	+
	Labrasol®	+
	Glycerol	-
	Caprylic / Capric Triglycerides	(+)
	Lauroglycol™ FCC	-
	Capryol™ 90	-

Las pruebas de compatibilidad, se realizaron preparando mezclas binarias lípido sólido:lípido líquido en proporción 85:15, con el fin de determinar si se producía separación de fases. Las mezclas de lípidos mostradas en la Tabla 3 no presentaron separación de fases. Posteriormente se evaluó su capacidad para disolver los curcuminoides.

Tabla 3. Capacidad para disolver los curcuminoides a una temperatura de 75 °C durante 15 minutos; "+" =Soluble y "-" = No Soluble.

Lípidos sólidos (204 mg)	Lípidos líquidos (36 mg)	Capacidad para disolver Curcuminoides (2.5 mg)
Compritol® 888 ATO	Labrasol®	+
	Labrafac™ Lipophile WL 1349	-
Precirol® ATO 5	Labrasol®	+
	Labrafac™ Lipophile WL 1349	-
Gelof™ 64	Labrasol®	+
	Labrafac™ Lipophile WL 1349	-
Gelucire® 44/14	Labrasol®	+
	Labrafac™ Lipophile WL 1349	-

De acuerdo con los resultados anteriores se consideraron los siguientes materiales para el diseño factorial 2³: tipo de lípido sólido (Compritol® 888ATO y Precirol® ATO 5), tipo de surfactante (Pluronic® F-127 y Tween® 80) y concentración de surfactante (1 y 3% p/v). El Labrasol® fue seleccionado como el lípido líquido para todos los sistemas. La tabla 4 muestra los resultados de tamaño de partícula obtenidos para los sistemas preparados de acuerdo al diseño de experimentos planteado. No se encontraron diferencias significativas en los 3 factores de acuerdo con el diagrama de Pareto, cajas y bigotes (Figura 15). Sin embargo, se observó que el tamaño de partícula depende de la concentración de surfactante, causando distribuciones unimodales y multimodales, por lo que solo se tomaron en cuenta las distribuciones unimodales que se obtuvieron con la concentración al 1%, descartando los sistemas con concentraciones al 3% de tensoactivo que presentaron distribuciones multimodales.

Tabla 4. Matriz de resultados para un diseño factorial 2³. No se incluye como factor el lípido líquido, ya que el Labrasol® fue seleccionado como el lípido líquido para todos los sistemas. El tamaño de partícula corresponde al promedio de los resultados.

Tipo de lípido sólido	Tipo de surfactante	% surfactante	nm
Precirol® ATO 5	Polysorbate 80	3	118
Precirol® ATO 5	Polysorbate 80	1	147
Compritol® 888 ATO	Polysorbate 80	3	244
Compritol® 888 ATO	Poloxamer 407	3	148
Compritol® 888 ATO	Poloxamer 407	1	164
Precirol® ATO 5	Poloxamer 407	1	116
Compritol® 888 ATO	Polysorbate 80	1	138
Precirol® ATO 5	Poloxamer 407	3	130

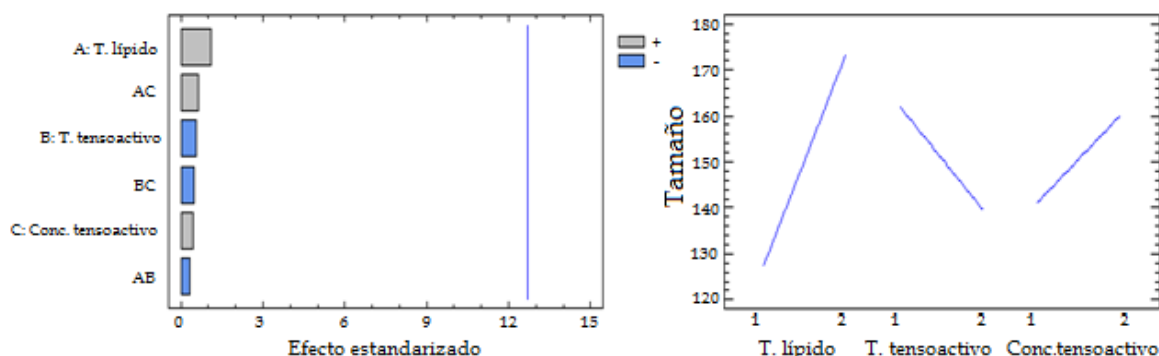


Figura 15. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para tamaño de partícula

Finalmente el método para preparar los NLC cargados de curcuminoides se optimizó con los siguientes materiales y concentraciones: como lípidos sólidos al 85% Compritol® 888 ATO (C) y Precirol® ATO 5 (P); lípido líquido al 15% Labrasol®; Polisorbato 80 (T80) y Poloxámero 407 (P407) como surfactantes a una concentración del 1% (Tabla 5). Esta nomenclatura se utilizará para referirse a los sistemas preparados con estos componentes.

Tabla 5. Composición y proporción de los acarreadores lipídicos nanoestructurados cargados de curcuminoides.

Formulación	Activo (mg)	Lípidos sólidos		Lípido líquido	Surfactante		Agua (mL)
		Compritol® 888 ATO (mg)	Precirol® ATO 5 (mg)	Labrasol® (mg)	Polisorbato 80 (mg)	Poloxámero 407 (mg)	
1	5.0	0.850	-	0.150	0.5	-	50
2	5.0	0.850	-	0.150	-	0.5	50
3	5.0	-	0.850	0.150	0.5	-	50
4	5.0	-	0.850	0.150	-	0.5	50

6.2 Caracterización de los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) cargados de curcuminoides

Se caracterizaron los siguientes sistemas CLT80-Cur, CLP407-Cur, PLT80-Cur y PLP407-Cur. Los parámetros analizados fueron, Tamaño de partícula, PDI, Potencial Z, %EE, %EP, capacidad de carga y morfología. La caracterización se realizó un día después de la elaboración de los sistemas.

Tabla 6. Características de los NLC preparados. Tamaño de partícula (TP); Índice de polidispersión (PDI); Potencial Z (PZ); Eficiencia de encapsulamiento (EE); Capacidad de carga y Eficiencia de Proceso (EP). C (Compritol® 888 ATO); P (Precirol® A ATO 5); T80 (Tween 80), P407 (Poloxámero 407), Cur (curcuminoides); todos los sistemas contienen Labrasol® (L).

Formulaciones	PARÁMETROS					
	TP (nm)	PDI	PZ (mV)	EE (%)	Carga (µg/mg)	EP (%)
CLT80-Cur	213.9 ± 8.1	0.20 ± 0.02	-15.5 ± 0.6	79.70 ± 1.0	2.63 ± 0.03	92.9 ± 2.1
CLP407-Cur	149.9 ± 15.1	0.24 ± 0.04	-7.2 ± 0.9	86.67 ± 3.1	3.18 ± 0.11	91.7 ± 3.3
PLT80-Cur	148.4 ± 6.6	0.20 ± 0.02	-14.6 ± 0.9	90.36 ± 1.5	2.97 ± 0.05	90.4 ± 3.2
PLP407-Cur	111.7 ± 7.9	0.24 ± 0.02	-4.1 ± 0.6	96.89 ± 0.3	3.26 ± 0.01	93.9 ± 4.5

El tamaño de partícula de las cuatro formulaciones estudiadas, cargadas de curcuminoides, se encontró aproximadamente entre 111 y 214 nm (Tabla 6). Dado que la formulación está destinada para uso tópico, este tamaño de partícula es adecuado, ya que favorece su adhesividad, permitiendo un contacto prolongado con la superficie de la piel [11, 12, 82, 83]. Por otro lado, también debe considerarse la penetración de los NLC a través de los folículos pilosos, lo que constituye otra forma de entrada. A partir de estas dos rutas, es posible que se forme un depósito, desde el cual la sustancia activa se puede liberar gradualmente para alcanzar capas más profundas de la piel [24]. El índice de polidispersión en todos los sistemas fue menor a 0.3, lo cual indica que hay uniformidad en el tamaño de partícula en la dispersión de NLC [11-84]. En la Figura 16 y Anexo I. se muestran las distribuciones del tamaño de partícula para los sistemas CLT80-Cur, CLP407-Cur, PLT80-Cur y PLP407-Cur, observando una distribución unimodal para cada sistema.

El análisis de potencial Z permite predecir la estabilidad física de las partículas en suspensión a través de la repulsión electrostática entre ellas. En teoría, las dispersiones requieren como mínimo un potencial Z ± 30mV para la estabilización electrostática [11, 85], sin embargo, los sistemas presentaron cargas superficiales negativas mucho menores de -4.1 a -15.5 mV (Tabla 6). Las dos formulaciones basadas en Tween 80 (CLT80-Cur y PLT80-Cur) tuvieron valores más altos (-15.5 y -14.6 mV,

respectivamente) que las que contienen poloxámero (-7.2 mV para CLP407-Cur y -4.1 mV para PLP407-Cur), que se puede atribuir a la presencia de algunas impurezas aniónicas (e.g., ácidos grasos libres) en el Tween como producto comercial ^[86]. En general, los valores de potencial Z encontrados están en concordancia con los reportados por otros autores ^[87], ya que ambos son surfactantes no iónicos, cuyo efecto estabilizador se atribuye principalmente al efecto estérico que imponen al ubicarse en la interfase partícula/agua, que previene su coalescencia ^[11, 78, 87].

Para evaluar la cantidad retenida de curcuminoides en la matriz lipídica, se estudió la eficiencia de encapsulación (EE), eficiencia de proceso (EP) y capacidad de carga (LC). En general se obtuvo una EE alta para todos los sistemas (79.7 y 96.89%). Esto se atribuye a varios factores: (i) Las características hidrofóbicas de los curcuminoides que favorecen la afinidad con los componentes del NLC; (ii) la selección de lípidos líquidos y sólidos, realizada a través de estudios de solubilidad, eligiendo aquellos donde los curcuminoides fueran más solubles; y (iii) la estructura desorganizada de los NLC, que permite una mayor incorporación de curcuminoides en el sistema de nanopartículas. Como muestra la Tabla 6, la EE más alta se obtuvieron con los sistemas basados en Precirol (PLT80-Cur y PLP407-Cur). Con respecto a la LC, esta fue mayor para los sistemas que contienen poloxámero 407 como estabilizante (entre 3.18 y 3.26 $\mu\text{g}/\text{mg}$) que para los sistemas con Tween 80 (entre 2.63 y 2.97 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Finalmente, en todos los casos se encontró un EP mayor al 90%.

Respecto a las micrografías obtenidas por TEM, las cuatro formulaciones (CLT80-Cur, CLP407-Cur, PLT80-Cur y PLP407-Cur) mostraron estar conformadas por partículas esféricas con tamaños nanométricos. La figura 16 muestra la distribución del tamaño de partícula para el sistema CLT80-Cur, donde se observa una distribución unimodal que coincide con los resultados determinados mediante la técnica de dispersión dinámica de luz. Se obtuvieron distribuciones similares para el resto de los sistemas (Anexo I).

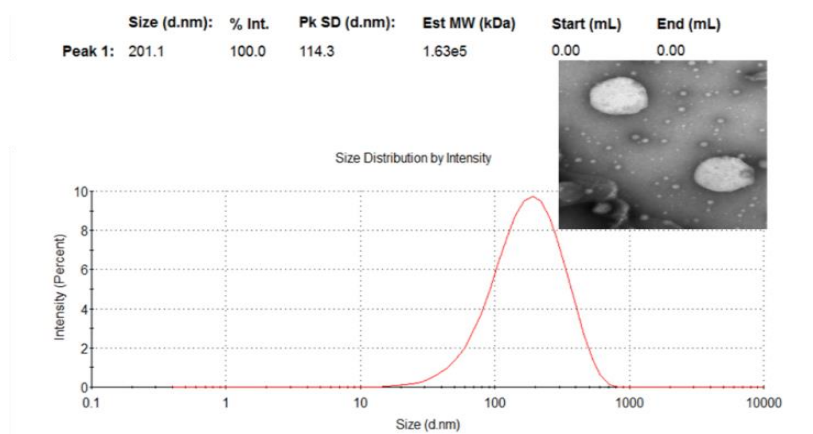


Figura 16. Distribución del tamaño de partícula, así como una imagen representativa obtenida por TEM, de uno de los sistemas de NLC cargados con curcuminoides (CLT80-Cur). C (Compritrol® 888 ATO); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); Cur (curcuminoides).

6.3 Perfil de liberación *in vitro* de NLC cargados de curcuminoides

Como se presenta en la figura 17, todas las formulaciones fueron capaces de liberar gradualmente la carga de activo. Se puede observar que la mayor tasa de liberación correspondió a las formulaciones con poloxámero 407 (en promedio 73% para PLP407-Cur y 89% para CLP407-Cur a las 9 h). La solución de curcuminoides presentó un perfil muy similar al del sistema PLP407-Cur. La tasa de liberación para los sistemas con Tween 80 fue más baja y de acuerdo con los perfiles mostrados, se podría suponer una liberación prolongada (aproximadamente 38% liberado de CLT8-Cur y 43% de PLT80-Cur a las 9 h).

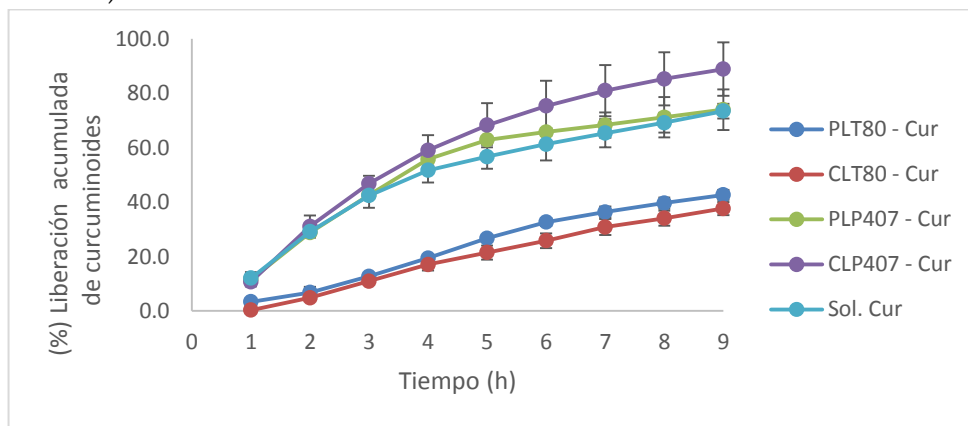


Figura 17. Perfil de liberación *in vitro* para las diferentes formulaciones cargadas de curcuminoides, utilizando el método de diálisis y como medio receptor mezcla etanol - agua (1:1) a 37 °C. C (Compritrol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides); Sol. (Solución). Los puntos corresponden al promedio de los resultados y las barras de error representan la desviación estándar (n=3)

Para determinar el mecanismo predominante de liberación, se recurrió a diferentes modelos cinéticos, empleando el programa Ddsolver. La selección del modelo se basó en los siguientes criterios: el coeficiente de correlación (R^2), el criterio Akaike (AIC) y el criterio de selección de modelo (MSC). La Tabla 7 muestra los parámetros cinéticos, obtenidos a partir de los perfiles de liberación de cada formulación.

Tabla 7. Coeficiente de correlación (R^2), Criterio Akaike (AIC) y criterio de selección de modelo (MSC) para diferentes modelos matemáticos y exponente de liberación “n” para el modelo de Peppas-Korsmeyer.

FORMULACIONES	MODELOS				n
	Orden Cero	Primer Orden	Higuchi	Peppas - Korsmeyer	
	R^2 (AIC) (MSC)				
CLT80 – Cur	0.9710 ⁽⁵²⁾ (3.4)	0.8470 ⁽⁶⁸⁾ (1.7)	0.7484 ⁽⁷²⁾ (1.2)	0.9816 ⁽⁵⁰⁾ (3.6)	1.14
PLT80 – Cur	0.9765 ⁽⁵⁰⁾ (3.5)	0.8578 ⁽⁶⁷⁾ (1.7)	0.7799 ⁽⁷¹⁾ (1.3)	0.9780 ⁽⁵²⁾ (3.4)	1.04
CLP407 – Cur	0.8527 ⁽⁶⁵⁾ (1.7)	0.9449 ⁽⁵⁵⁾ (2.7)	0.7634 ⁽²⁶⁾ (1.0)	0.9807 ⁽¹⁶⁾ (3.4)	1.04
PLP407 – Cur	0.7038 ⁽⁷⁰⁾ (1.1)	0.9348 ⁽⁵⁶⁾ (2.7)	0.7659 ⁽²⁷⁾ (1.0)	0.9874 ⁽¹⁶⁾ (3.7)	1.06

C (Compritol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); T80 (Tween® 80), P407 (Poloxámero 407), L (Labrasol®), Cur (Curcuminoides).

AIC: Se considera que el modelo con un valor bajo es el apropiado

MSC: Se considera que el modelo con un valor alto es el apropiado (valores entre 2 y 3 indican un buen ajuste).

Los resultados mostraron que los sistemas que contienen el tensoactivo polisorbato 80 (PLT80-Cur y CLT80-Cur), presentaron coeficientes de correlación superiores a 0.97, AIC \approx 50 y MSC \approx 3.5 para los modelos de orden cero y para Peppas-Korsmeyer. De hecho, existe correlación entre los dos modelos, es decir, en el caso del modelo de Peppas y Korsmeyer, se encontró un exponente “n” muy cercano a 1, que correspondería a un “transporte caso II”, referenciado como de orden cero, por lo tanto, estas dos formulaciones presentan una velocidad de liberación constante en relación al tiempo e independiente de la concentración de soluto. En el caso de los sistemas que contienen el tensoactivo poloxámero 407 (CLP407-Cur y PLP407-Cur), los perfiles de liberación mostraron un patrón bifásico; durante las primeras 4 horas (primera fase) presentan un coeficiente de correlación superior a 0.98, AIC \approx 16 y MSC \approx 3.5 y un exponente “n” cercano a 1, también ajustándose al modelo de Peppas-Korsmeyer, correspondiendo a un “transporte caso II”; no obstante, a partir de la quinta hora (segunda fase) se observa una disminución en la cantidad liberada por unidad de tiempo para ambas formulaciones, por lo que al analizar el perfil de liberación, integrado por las dos tendencias, de acuerdo a las condiciones de cada

modelo, se ajusta predominantemente al modelo de un primer orden con un coeficiente de correlación por arriba de 0.93, $AIC \approx 55$ y $MSC \approx 2.7$, demostrando que son dependientes de la concentración. Esto concuerda con lo informado por otros autores [11], que encuentran una liberación inicial rápida (incluso con un efecto “burst”) debido a la presencia del fármaco en la superficie del NLC, seguido de una liberación prolongada del fármaco que se encuentra dentro de las partículas. La liberación puede controlarse mediante la difusión del fármaco y / o la erosión de la matriz lipídica, dependiendo de la composición de los lípidos. El tipo de estabilizante también es importante, ya que puede influir en la acción de las enzimas sobre las partículas. En el caso de los estabilizantes estéricos como los utilizados en este trabajo, se esperaría una degradación más lenta debido al efecto estérico que funciona como una especie de escudo [11].

6.4 Permeabilidad *ex vivo* de curcuminoides a través de piel de cerdo

En las formulaciones de aplicación tópica, es importante estudiar su capacidad de permeación hacia y a través de la piel. Para esto se analizaron las siguientes formulaciones CLT80-Cur, CLP407-Cur, PLT80-Cur, PLP407-Cur y como referencia una solución de curcuminoides.

De manera general, se ha reportado que los NLC pueden funcionar como potenciadores de la permeación. Esto se atribuye a varios factores [12, 80, 88, 89]: (i) Los NLC pueden establecer una interacción cercana con la superficie de la piel, formando una película hidrófoba. Esto causa un efecto oclusivo que previene la pérdida de agua trans-epidérmica y aumenta la hidratación de la piel, generando defectos en el empaquetamiento tanto de los corneocitos (con la apertura de espacios entre corneocitos), como de los lípidos (aumentando su fluidez). (ii) Los tensoactivos utilizados como estabilizantes de los NLC también pueden interactuar con los componentes de la piel (es decir, lípidos y proteínas) provocando la disrupción de la estructura de la piel. (iii) Los NLC son capaces de formar un reservorio al penetrar en los intersticios de la piel (por ejemplo, arrugas) o folículos pilosos, liberando el fármaco desde estos sitios. Esto promueve la penetración de fármacos al formar un gradiente de alta concentración en la piel.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio (Figura 18), La cantidad máxima de curcuminoides permeada fue de aproximadamente $2.0 \mu\text{g}$ (4.0%) en el transcurso de 8 horas, de un total de $50 \mu\text{g}$. De los componentes para elaborar los NLC, se puede observar que el material que modula la permeabilidad de los curcuminoides a través de la piel, fue el estabilizante, más que el material lipídico. En este sentido, se observó que la cantidad acumulada de curcuminoides en el medio receptor fue mayor para las formulaciones con polisorbato 80 (T80) que para las que contienen poloxámero

407 (P407), no importando el tipo de lípido. La razón del resultado se atribuye al hecho de que el polisorbato 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitano) tiene una cadena de 18 carbonos con una insaturación *cis* en la posición 9-10, que puede intercalarse entre las cadenas lipídicas del estrato córneo, provocando la "fluidización" de la matriz lipídica, lo que implica un aumento en el desorden lipídico. Esto significa que estaría actuando como un potenciador de la permeación, favoreciendo el transporte de curcuminoides a través de la piel. Debido a que su estructura es muy similar a la del ácido oléico, se esperaría que su mecanismo como potenciador fuera muy similar [89].

Los valores de flujo, coeficiente de permeabilidad y la cantidad total en el medio receptor fueron más altos para los sistemas con Tween 80 (Tabla 8). De hecho, el factor de promoción (ER = coeficiente de permeabilidad de las formulaciones/coeficiente de permeabilidad de la solución), presentado en la Tabla 8, muestra valores de 1.60 para el CLT80-Cur y 1.16 para el PLT80-Cur. Por el contrario, los sistemas a base de poloxámero presentaron valores de ER inferiores a 1, lo que implica que hubo una inhibición en la permeación con este surfactante, especialmente para la formulación con Precirol (PLP407-Cur) con un ER = 0.63. En cuanto a la solución de curcuminoides, no hubo una mejoría en el perfil de permeación con respecto a las formulaciones que contienen polisorbato 80; el hecho de que la solución estuviera constituida por una mezcla agua:etanol (1:1 v/v) no promovió la permeación, a pesar de las bien conocidas propiedades del etanol como promotor de permeación [90].

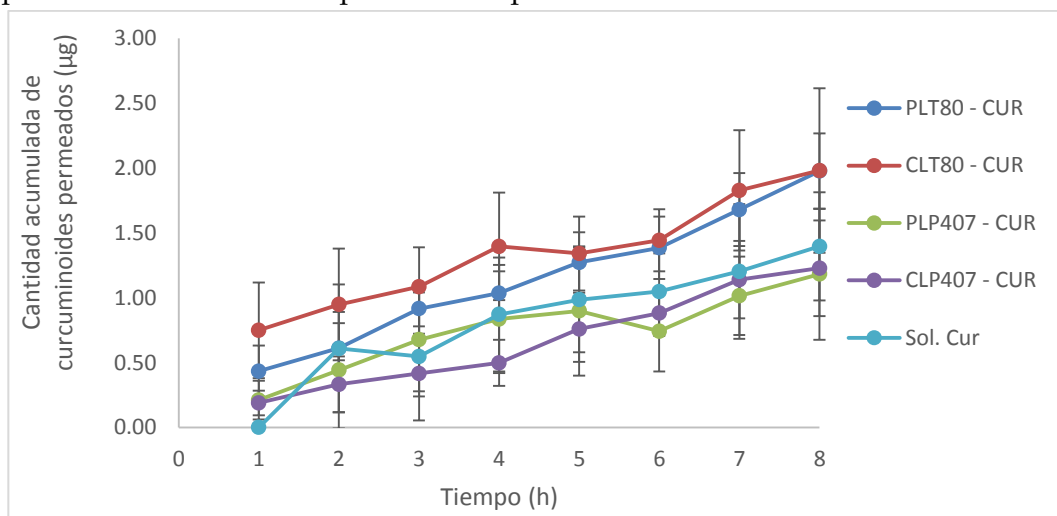


Figura 18. Perfil de permeación *in vitro* para las diferentes formulaciones conteniendo curcuminoides, utilizando piel de oreja de cerdo y como medio receptor mezcla etanol-agua (1:1) a 37 °C durante 8 horas. C (Compritol ATO 888®); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides); Sol. (Solución). Los puntos corresponden al promedio de los resultados y las barras de error representan la desviación estándar (n = 6)

Tabla 8. Valores de Flujo y coeficientes de permeabilidad obtenidos a partir de los datos de permeación de las diferentes formulaciones. Los resultados se muestran como media \pm S.D. (n = 6)

Sistemas	Flujo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) (1×10^{-1})	Coefficiente de permeabilidad (cm/h) (1×10^{-3})	Cantidad total permeada (μg)	ER
CLT80-Cur	1.95 ± 0.62	4.8 ± 1.5	1.98	1.60
CLP407-Cur	1.20 ± 0.41	2.6 ± 0.8	1.23	0.87
PLT80-Cur	1.65 ± 0.31	3.5 ± 0.6	1.98	1.16
PLP407-Cur	0.92 ± 0.47	1.9 ± 0.9	1.18	0.63
Sol. Cur	1.33 ± 0.35	3.0 ± 0.8	1.40	---

C (Compritol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides); Sol. (Solución). ER, por sus siglas en inglés, Enhancement Ratio (Factor de promoción) = Coeficiente de permeabilidad de formulación / Coeficiente de permeabilidad de solución.

6.5 Profundidad de penetración y perfil de distribución de curcuminoides en piel de cerdo *ex vivo* mediante microscopía de escaneo láser confocal

Se conoce que el estrés oxidativo influye en numerosas enfermedades cutáneas, por lo que se espera que la administración de antioxidantes exógenos pueda ayudar a combatir estas enfermedades. Como se producen especies reactivas de oxígeno por los queratinocitos y por prácticamente todo tipo de células de la piel en respuesta a diferentes señales [1], la penetración de antioxidantes a través del estrato córneo y su retención en las capas internas de la piel, es deseable para que estos agentes alcancen el tejido blanco. Por ello, en este trabajo se determinó la capacidad de penetración y el patrón de distribución de los curcuminoides en la piel, a través de imágenes por microscopía de escaneo láser confocal, aprovechando la capacidad de fluorescer de los curcuminoides. Con esto en mente, la piel se trató previamente con las cuatro formulaciones de NLC conteniendo curcuminoides, para examinarla posteriormente mediante microscopía confocal, realizando cortes ópticos de determinada profundidad, como se explica en la Sección 5.9.

Aunque se han utilizado otras técnicas para estudiar la penetración de la curcumina en la piel, como el *tape-stripping* [91], seguido de la separación de la epidermis viable de la dermis por un método térmico [87], la microscopía de barrido láser confocal brindó información valiosa, permitiendo comparar la influencia de las formulaciones en el grado de penetración de los curcuminoides, a través de imágenes como las que se muestran en la Figuras 19, 20 y 21: La proyección de fluorescencia máxima, que representa la suma de la fluorescencia de las 36 láminas obtenidas (Figura 19); la proyección ortogonal (Figura 20), que permite localizar áreas de penetración del

principio activo; y finalmente, la reconstrucción 3D de la imagen que muestra la distribución del fármaco en el espesor total escaneado de la piel (Figura 21).

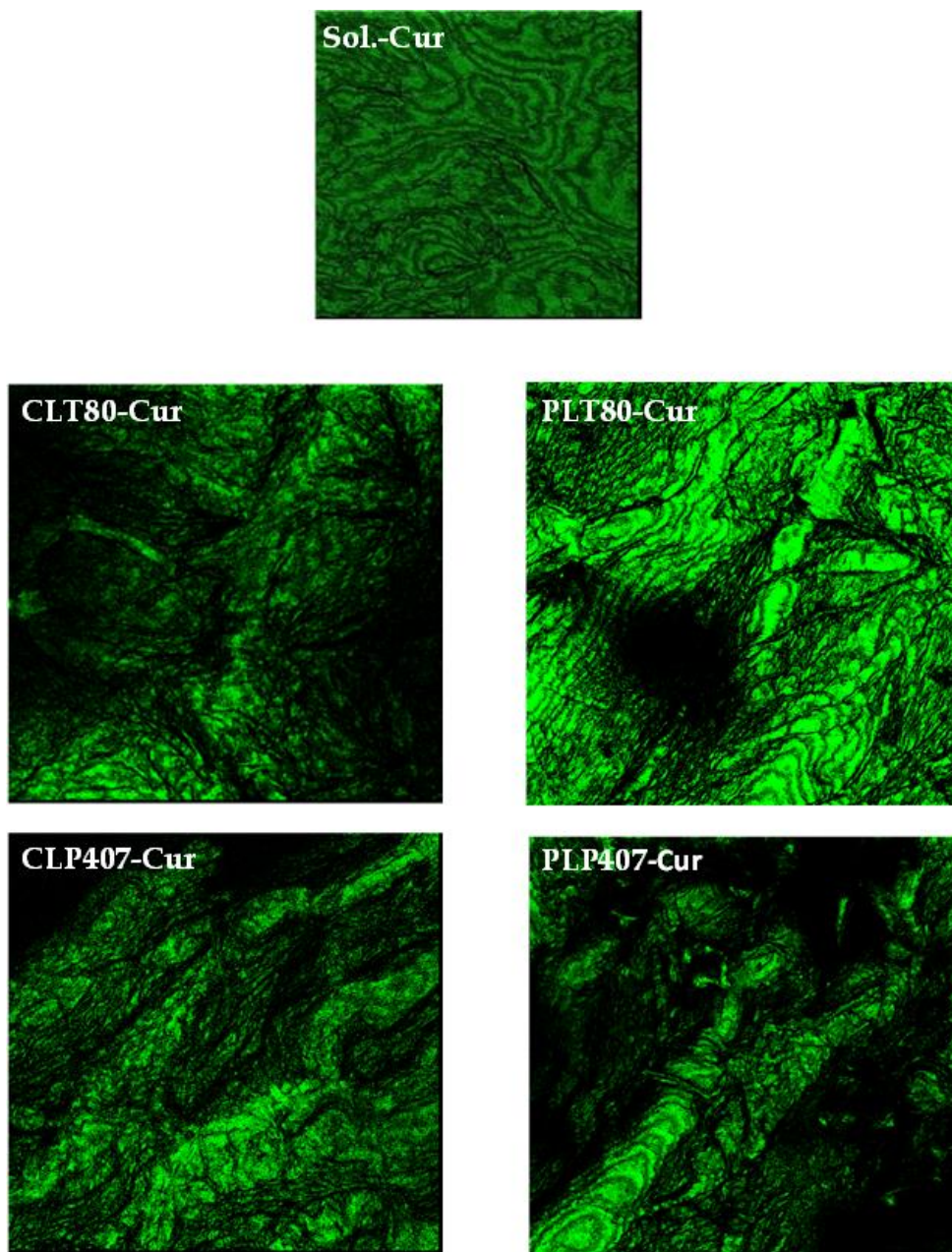


Figura 19. Imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal para cada uno de los sistemas preparados, donde se muestra la proyección máxima de fluorescencia emitida por 36 láminas. C (Compritol ATO 888®); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides); Sol. (Solución).

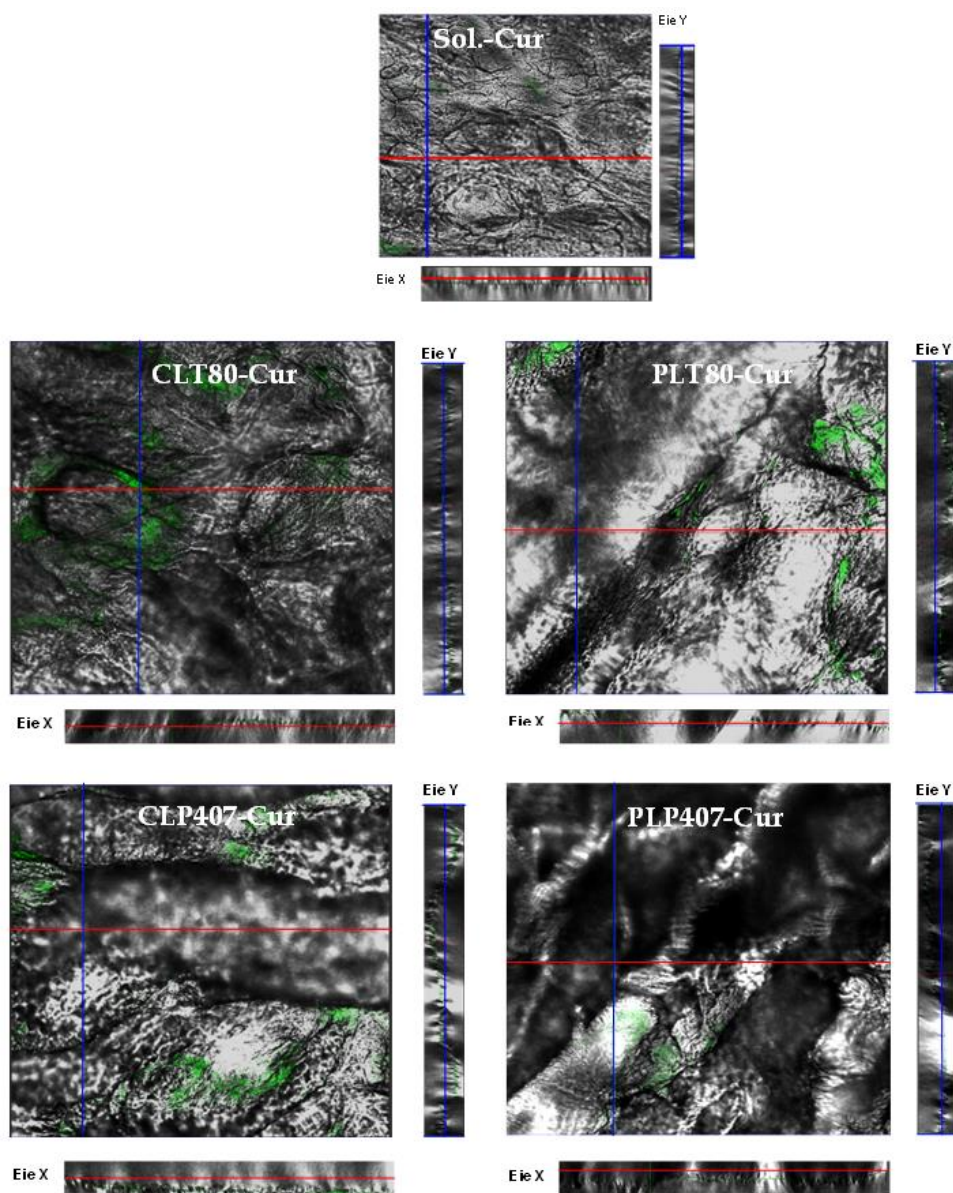


Figura 20. Imágenes obtenidas por microscopía de barrido láser confocal que muestran la imagen ortogonal de un solo corte, señalando la ubicación y distribución de los curcuminoides. C (Compritol ATO 888®); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides); Sol. (Solución).

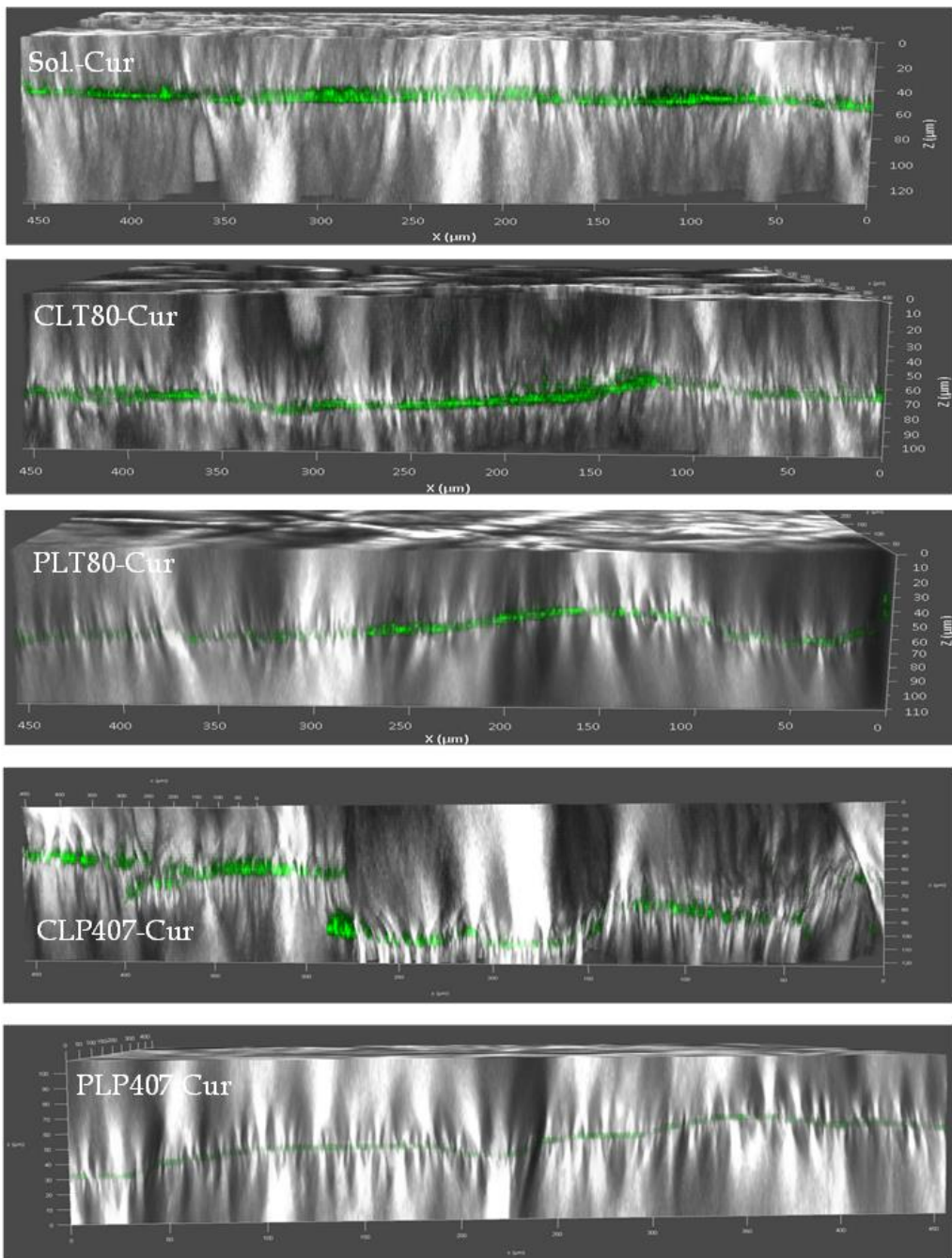


Figura 21. Imágenes 3D obtenidas por microscopía de barrido láser confocal, donde se visualiza la distancia de penetración de los curcuminoides. C (Compritol ATO 888®); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides); Sol. (Solución).

Se realizó un escaneo desde la superficie de la piel (profundidad de 0 μm) hasta alcanzar una profundidad de piel de 108 μm , analizando la fluorescencia de 36 imágenes, con incrementos de 3 μm . Con los valores de intensidad de fluorescencia determinados para cada imagen, fue posible construir un perfil de penetración, como el presentado en la Figura 22, donde se puede comparar cuantitativamente el grado de penetración de cada formulación, tomando como referencia el de una solución de curcuminoides (curcuminoides libres).

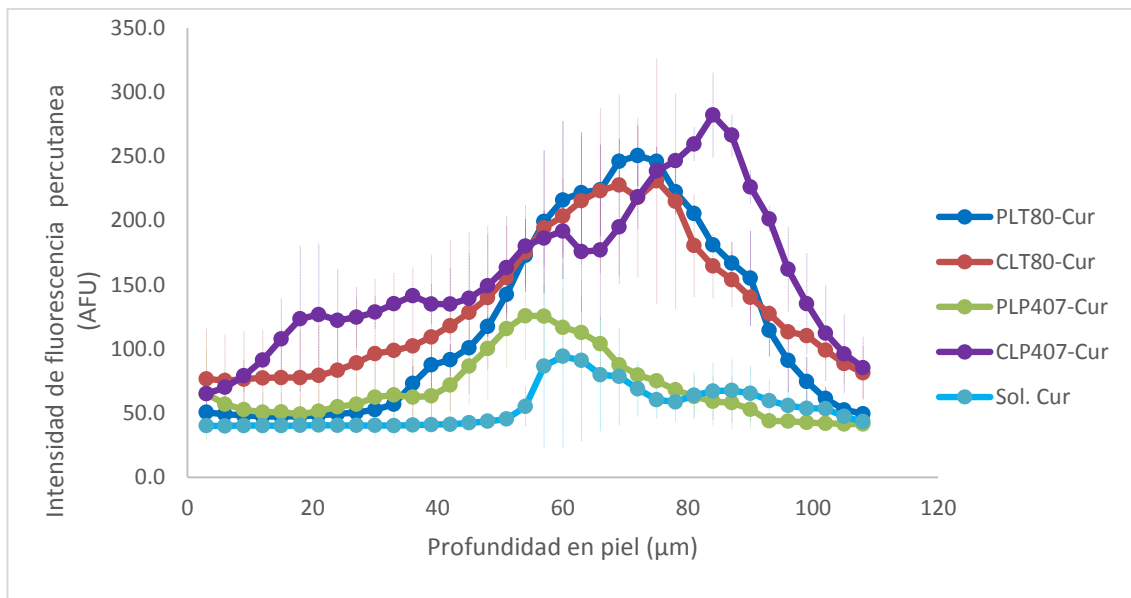


Figura 22. Perfil de penetración cutánea de curcuminoides formulados en NLC. La gráfica representa la fluorescencia de los curcuminoides detectada en cada corte óptico mediante microscopía de barrido láser confocal vs la profundidad de penetración en la piel. Se incluye como referencia la solución de curcuminoides en etanol:agua (1:1 v/v). Una alta fluorescencia (Unidades arbitrarias de fluorescencia, AFU, más altas) indica la presencia de cantidades más altas de curcuminoides. CLP407-Cur; CLT80; PLP407; PLT80 y e) Solución de curcuminoides. C (Compritol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides).

Las imágenes muestran una fuerte fluorescencia para los curcuminoides formulados en los NLC a diferentes profundidades de la piel, lo que coincide con los resultados de Mao *et al.* [92] y Abdel-Hafez *et al.* [93], quienes visualizaron la penetración y distribución de la curcumina en la piel de ratones mediante microscopía confocal, confirmando que es capaz de cruzar el estrato córneo, alcanzando la epidermis y la dermis cuando se incluye en nanopartículas poliméricas. Una observación importante es que los curcuminoides no cubrieron la piel de manera homogénea, es decir, se detectaron en diferentes regiones de la misma imagen (ciertas áreas de la piel o en los folículos pilosos), como se muestra en la Figura 20. En este sentido, diferentes autores coinciden en que las nanopartículas pueden infiltrarse en las capas más externas del estrato córneo o acumularse en los folículos pilosos, formando un reservorio desde el que pueden liberar el fármaco [93, 94]. Al determinar la fluorescencia total para cada imagen y

construir el perfil presentado en la Figura 22, se observó que la mayor deposición se logró con los sistemas CLP407-Cur, CLT80-Cur y PLT80-Cur que mostraron una acumulación máxima entre 60 y 90 μm , mientras que para el PLP407-Cur el máximo fue de alrededor de 51-63 μm y para la solución entre 57 y 63 μm . Estos mismos sistemas tenían altos valores de fluorescencia total acumulada (suma de la fluorescencia de todas las imágenes) de 17,526, 14,700 y 12,821 unidades de fluorescencia arbitraria (AFU), para los sistemas CLP407-Cur, CLT80-Cur y PLT80-Cur, respectivamente (Tabla 9), en comparación con el sistema PLP407-Cur con un total fluorescencia de 7,993 AFU y la de la solución de 5,843 AFU. Este comportamiento se atribuye a la diferente composición de los sistemas que favorece en mayor o menor medida la permeación de los curcuminoides. En el caso de sistemas con Tween 80 (PLT80-Cur y CLT80-Cur), la distribución mostrada por microscopía confocal coincide con los resultados de los estudios de permeación, donde estos dos sistemas no solo permitieron que una gran cantidad de curcuminoides pudieran penetrar y retenerse en la piel, sino que también alcanzaron el medio receptor.

Tabla 9. Intensidades de fluorescencia acumulada de los 36 cortes para cada uno de los diferentes sistemas nanoparticulados cargados de curcuminoides obtenidos por microscopía de láser confocal.

INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA ACUMULADA (UAF)

CLP407-Cur	CLT80-Cur	PLP407-Cur	PLT80-Cur	Sol.Cur
17,382.89	13,203.38	7,985.89	12,816.50	5,855.79

C (Compritol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides); Sol. (Solución); UAF (unidades arbitrarias de fluorescencia).

Para el sistema CLP407-Cur, aunque la cantidad que alcanzó la solución receptora fue menor que con los sistemas con polisorbato, esta formulación permitió retener una gran cantidad de curcuminoides a lo largo del grosor total de la piel analizada (Figura 22). Los curcuminoides en solución mostraron la menor intensidad de fluorescencia en la piel, a pesar de ser una solución hidroalcohólica (etanol: agua 1: 1 v/v), siendo bien conocidas las propiedades promotoras del etanol ^[90].

Los resultados confirman lo reportado por otros autores, en el hecho de que la penetración y retención de curcuminoides dentro de la piel se puede favorecer encapsulándolos en nanoacarreadores, tales como nanopartículas poliméricas ^[90, 93, 94], nanogeles ^[95], liposomas deformables ^[96, 97], NLC y nanoemulsiones ^[98]; y coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo, donde la formulación fármaco en NLC

favoreció su penetración dentro y a través de la piel [82, 88]. Sin embargo, es importante considerar que la capacidad de penetración del fármaco depende de las características de liberación del sistema acarreador en el que se incluye, como lo demuestran Friedrich *et al.* [87] quienes encuentran una menor cantidad de curcumina en todas las capas de la piel cuando se formula en nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) con núcleo lipídico, en comparación con una solución hidroalcohólica de curcumina. En este caso, los autores atribuyen esto a la muy baja difusión de curcumina de las nanocápsulas (en 24 h solo se había liberado alrededor del 10% de la carga). Pero incluso si la curcumina no está incluida en un nanoacarreador, su penetración en la piel se ve favorecida cuando está en forma de nanocristales. Al igual que con los nanoacarreadores, Vidlárová *et al.* [99] encontraron que debido a su tamaño (menos de 200 nm), los nanocristales básicamente penetran y se acumulan en los folículos pilosos, formando un depósito, con un gradiente de concentración alto entre el folículo piloso (con un volumen de agua / humedad muy limitado) y las células circundantes. La difusión de curcumina ocurre hasta que los nanocristales se disuelven por completo, lo que permite una liberación prolongada.

Algo importante a tomar en consideración es que la piel tiene una carga neta negativa, por lo tanto, sería de esperarse que los NLC preparados en este trabajo, al tener un potencial Z negativo, no penetraran en la piel tan fácilmente. En general, la piel es "permselectiva", es decir, aquellas especies catiónicas o nanopartículas con carga positiva difunden más fácilmente que las neutras o aniónicas [92]. Sin embargo, existen estudios en donde los resultados son contradictorios, encontrando que las nanopartículas aniónicas también pueden penetrar en la piel debido a la repulsión que se genera entre las nanopartículas aniónicas y los lípidos de la piel con carga negativa, lo que facilita su entrada a regiones más profundas de la piel [100]. Así mismo, algunos estudios sugieren la internalización de los NLC con carga negativa en los folículos pilosos [82] liberando el fármaco a partir de este sitio, como ya se mencionó anteriormente.

6.6 Estabilidad y actividad antioxidante

La curcumina puede verse afectada por múltiples factores, como el pH, la temperatura y la exposición a la luz, por lo que es importante preservar su estabilidad durante el almacenamiento. Se realizaron pruebas de estabilidad para las cuatro formulaciones estudiadas, bajo dos condiciones diferentes: protegidas de la luz, a dos temperaturas de almacenamiento (5 °C y 25 °C durante 3 meses) y expuestas a iluminación total (estudio de fotoestabilidad) de acuerdo a lo descrito en metodología (5.11 Prueba de estabilidad). Los valores de TP, PDI, PZ y el porcentaje del contenido de curcuminoides se determinaron en el tiempo cero y al final de la prueba. Así mismo, se

evaluó la actividad antioxidante, expresada como el porcentaje de inhibición de la respuesta obtenida con el reactivo ABTS⁺.

Los resultados de TP para las dos condiciones mencionadas anteriormente se presentan en las Figuras 23 y 24. Respecto a la condición protegida de la luz en la Figura 23, se observa una disminución en el tamaño después de 3 meses para los sistemas que contienen poloxámero 407 (CLP407-Cur y PLP407-Cur), particularmente a 25 °C, lo que puede atribuirse a la erosión de los sistemas o degradación de los lípidos [77]. Algo que llama la atención fue que el sistema PLT80-Cur mostró un aumento en su tamaño, especialmente a 25 °C (Figura 23). En este sentido, algunos autores como Li *et al.* [101], atribuyen este aumento a la mayor energía cinética a 25 °C que puede acelerar la colisión de las partículas y por tanto la posibilidad de agregación. Para los sistemas expuestos a iluminación completa (segunda condición), no hubo cambios significativos en el tamaño de ninguno de los sistemas (Figura 24) después de los 9 días de esta prueba.

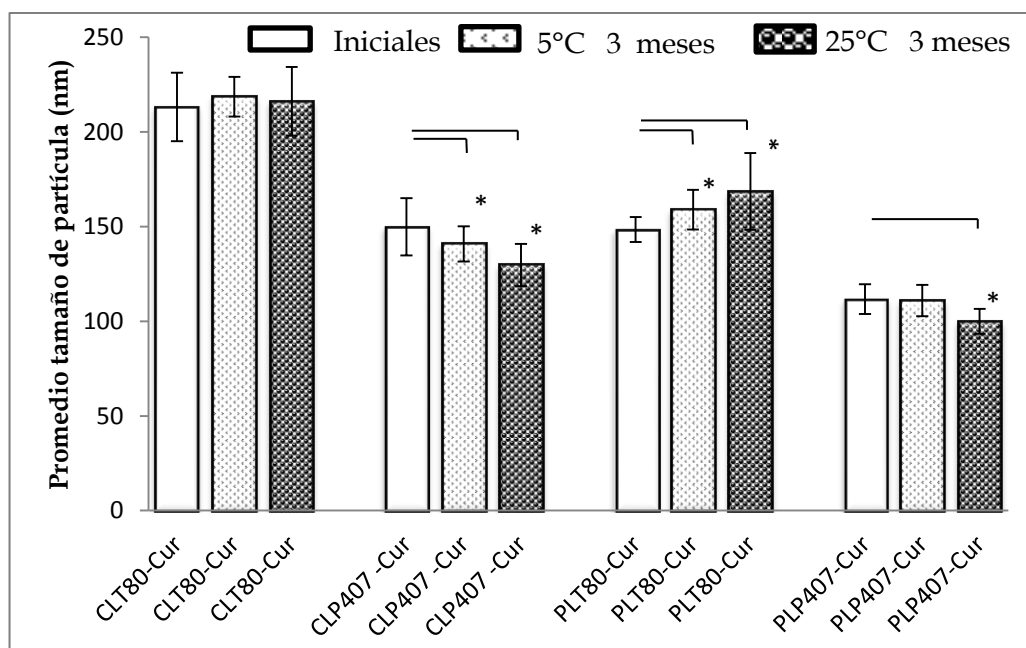


Figura 23. Resultados de la prueba de estabilidad a 5 °C y 25 °C. Para los NLC conteniendo curcuminoides. Se muestran los valores de tamaño de partícula para los sistemas recién preparados (inicial) y después de un tiempo de almacenamiento de 3 meses protegidas de la luz. C (Compritol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides). “*” $p < 0.05$ representa una diferencia significativa.

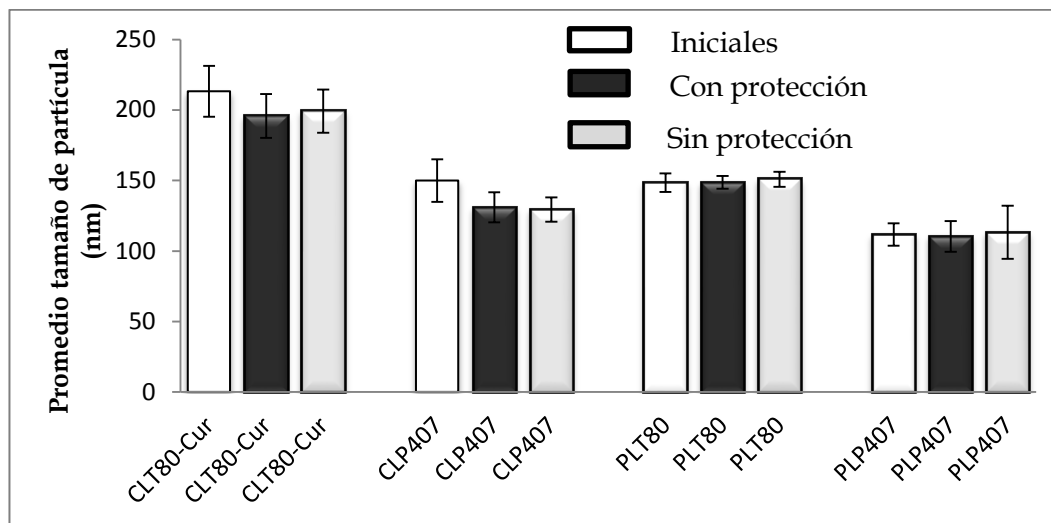


Figura 24. Resultados de la prueba de fotoestabilidad de los NLC conteniendo curcuminoides. Se muestran los valores de tamaño de partícula para los sistemas recién preparados (inicial) y después de estar expuestos a 1.2 millones de lux-hora y una energía ultravioleta cercano de 200 vatios /metro cuadrado, con protección y sin protección. C (Compritrol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides). “ * ” $p < 0.05$ representa una diferencia significativa.

Una de las principales características de las nanopartículas es la carga superficial, ya que este parámetro permite predecir la estabilidad física de los NLC. Por ello, se determinó el potencial Z, observando que existe una diferencia significativa entre el valor promedio inicial y después de tres meses para ambos estudios de estabilidad (Tabla 10), lo que puede atribuirse a un cambio en la composición de los NLC durante el almacenamiento, por ejemplo, desorción de tensoactivos de la superficie del NLC, disminución del contenido de curcuminoides con la formación de productos de degradación, erosión de los sistemas, etc. [11, 102].

Tabla 10. Resultados de potencial Z para los NLC sometidos a distintas condiciones de almacenamiento durante 3 meses (5 °C y 25 °C) y durante el estudio de fotoestabilidad. (n=3)

Formulaciones	Iniciales	Fotoestabilidad 25 °C		Condiciones almacenamiento / protegido / 3 meses	
		Protegido	Expuesto	5 °C	25 °C
CLT80 - Cur	-15.5 ± 0.6	-14.9 ± 0.7	-15.2 ± 0.4	-20.0 ± 2.4	-16.5 ± 3.4
CLP407 - Cur	-7.2 ± 0.9	-6.1 ± 0.6	-5.9 ± 0.7	-13.5 ± 2.2	-9.1 ± 2.6
PLT80 - Cur	-14.6 ± 0.9	-17.5 ± 0.9	-14.2 ± 0.5	-22.7 ± 1.5	-21.0 ± 3.2
PLP407 - Cur	-4.1 ± 0.6	-5.6 ± 0.6	-4.4 ± 0.3	-17.5 ± 1.7	-13.5 ± 2.9

En cuanto al contenido de curcuminoides, en condiciones de almacenamiento protegidos de la luz, éste se redujo significativamente en el caso de la solución y especialmente a 25 °C después de 3 meses (Figura 25); mientras que en los NLC el contenido fue superior al 84 %. Esto se atribuye a la cubierta de lípidos de los sistemas que brinda protección a los curcuminoides. Estos resultados concuerdan con los

valores de porcentaje de inhibición obtenidos (Figura 27), donde los curcuminoides en solución mostraron una disminución significativa. Diferentes autores han reportado que la inclusión de curcumina en un acarreador contribuye a mejorar su estabilidad, así como a preservar su actividad antioxidante en relación con la curcumina en su forma libre, por ejemplo, estudios donde los NLC se han cargado con extracto de cúrcuma [103]; incorporación de curcumina en emulsiones [104]; complejo de curcumina-huevo ovoalbúmina [105]; complejos de curcumina con fibrillas de proteína de suero con y sin quitosán [106]; curcumina encapsulada en perlas de hidrogel [107]; y curcumina en nanopartículas de fosfato de calcio [108]. Nikolic *et al.* [109] reportaron una mayor estabilidad y actividad antioxidante para curcumina incluida en una nanoemulsión, en relación con una solución de curcumina en etanol.

Por otro lado, Chen *et al.* [110] observaron una mayor capacidad de captación de radicales DPPH al conjugar curcumina con almidón hidroxietil hidrófilo, formando luego nanopartículas micelares, al igual que Mohammadian *et al.* [111] al encapsular curcumina en conjugados de α -lactoalbúmina y α -lactoalbúmina-dextrano, en relación con la curcumina libre en agua. Los dos autores atribuyeron el hecho a la formación de grandes agregados de curcumina, debido a su baja solubilidad en agua, provocando una disminución en la cantidad de curcumina disponible para interactuar con los radicales libres.

En el estudio de fotoestabilidad, condición sin protección contra luz, la reducción en el porcentaje de contenido de curcuminoides (Figura 26) fue dramática para todos los sistemas expuestos a la radiación. Esto no es sorprendente, ya que los curcuminoides se degradan rápidamente en presencia de luz [112, 113], principalmente bajo las condiciones de esta prueba, donde la alta intensidad de la luz incidente aceleró aún más la degradación. En el caso de los sistemas con protección a la luz, se observó una disminución significativa sólo para la solución de curcuminoides (en promedio 79%), mientras que el contenido de curcuminoides en los NLC se mantuvo por encima del 91%.

En relación a la solución de curcuminoides en el estudio de porcentaje de inhibición con protección de la luz, se observó una disminución significativa tanto a 5 °C como a 25 °C (Figura 27), contrario a lo obtenido en condiciones de exposición a la luz (fotoestabilidad) en donde la actividad antioxidante no se vió disminuida (Figura 28). Esto es particularmente importante cuando los curcuminoides se aplican en piel, y en donde a pesar de estar expuestos a la radiación solar, su actividad antioxidante no se vería disminuida.

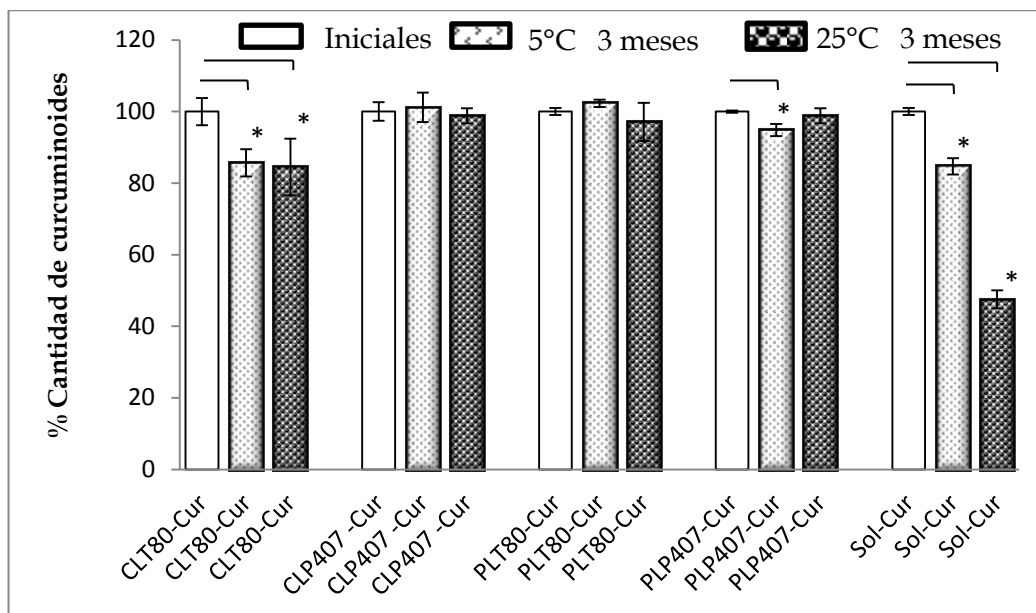


Figura 25. Resultados de la prueba de estabilidad para los NLC conteniendo curcuminoides a 5 °C y 25 °C. Se muestran los valores del porcentaje de curcuminoides para los sistemas recién preparados (inicial) y después de un tiempo de almacenamiento de 3 meses protegidos de la luz. C (Compritol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides). " * " p < 0.05 representa una diferencia significativa.

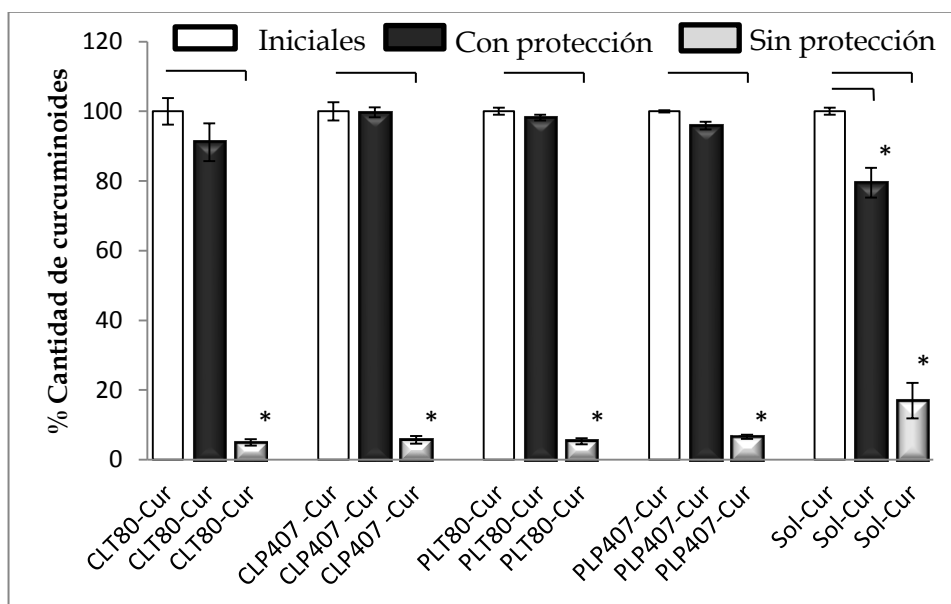


Figura 26. Resultados de la prueba de fotoestabilidad de los NLC conteniendo curcuminoides. Se muestran los valores del porcentajes de curcuminoides para los sistemas recién preparados (inicial) y después de estar expuestos a 1.2 millones de lux-hora y una energía ultravioleta cercano de 200 vatios /metro cuadrado, con protección y sin protección. C (Compritol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides). " * " p < 0.05 representa una diferencia significativa.

Una observación interesante de los estudios de fotoestabilidad fue que aun cuando el porcentaje de inhibición se vio reducido entre un 16.3% a un 21.4% (Figura 28, con exposición a la luz), el contenido de curcuminoides se redujo en un 93% (sin protección a la luz), en relación al valor inicial (Figura 26). Esto se puede explicar porque los principales productos de degradación de los curcuminoides (e.g., vainillina, ácido ferúlico, aldehído ferúlico, feruloil metano) tienen grupos OH y grupos metoxi en la posición 3 y 3', los cuales también presentan propiedades antioxidantes (la actividad antioxidante de los curcuminoides resulta del grupo hidroxilo del anillo de fenol) [114-115]. De hecho, algunos estudios sugieren una actividad superior para algunos metabolitos de los curcuminoides o productos de degradación [112, 116, 117].

Respecto a la solución de curcuminoides que se utilizó como solución de referencia (Figura 28), se observó un aumento del 9% en la inhibición para muestras sin protección, comportamiento que se relaciona con los resultados obtenidos por *Chang et al.* [115], quienes explican que la actividad antioxidante de los curcuminoides, proviene de la formación de diferentes productos de degradación, que también tienen actividad antioxidante, como el compuesto parental. Sin embargo, los autores mencionan que la intensidad de la actividad antioxidante depende de la naturaleza del medio de disolución. Esto ha sido confirmado por *Suwannateep et al.* [113], quien calculó el Factor de Protección Radical para la curcumina encapsulada en nanoesferas poliméricas y la curcumina libre en forma de loción. Concluyendo que no existían diferencias estadísticas en la actividad antioxidante de la curcumina encapsulada y la curcumina libre, lo que concuerda con esta investigación, en relación con el hecho de que la actividad antioxidante parece provenir tanto de los productos de degradación como del compuesto original. Por otro lado, autores como *Chen et al.* [110], *Hu et al.* [106] y *Mohammadian et al.* [111] han encontrado una mayor actividad antioxidante para la curcumina incluida en nanopartículas que en su forma libre (dispersa en agua), atribuyendo esto a la baja solubilidad acuosa de la curcumina. Por tanto, de acuerdo a estos autores, su inclusión en nanopartículas aumenta la cantidad de curcumina disponible para interactuar con los radicales libres.

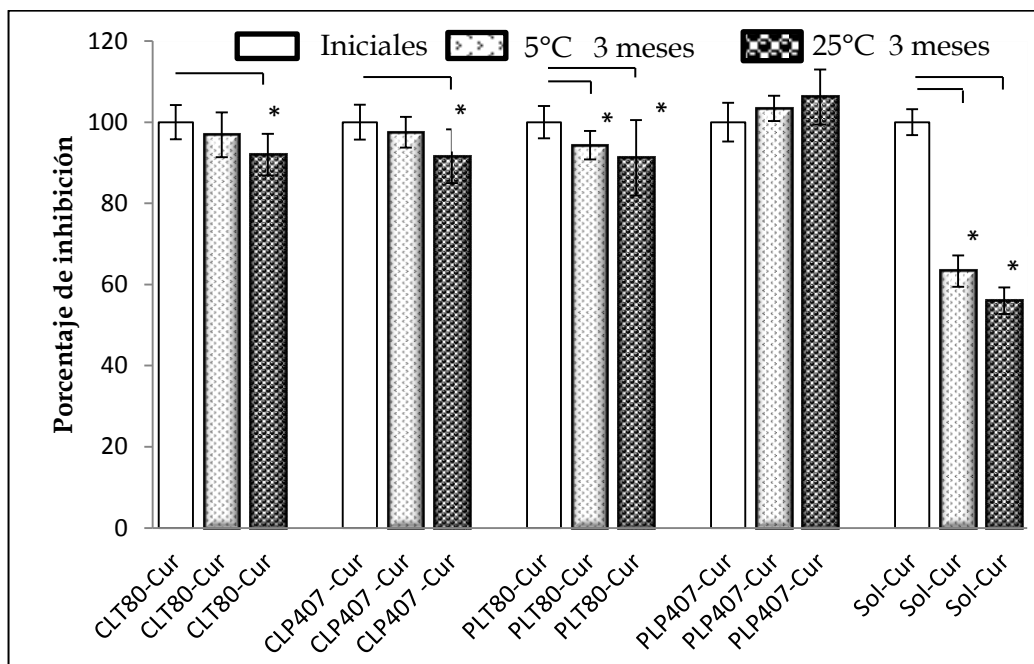


Figura 27. Resultados de la prueba de estabilidad para los NLC conteniendo curcuminoides a 5 °C y 25 °C. Se muestran los valores del porcentaje de inhibición de los curcuminoides para los sistemas recién preparados (inicial) y después de un tiempo de almacenamiento de 3 meses protegidos de la luz. C (Compritol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides). “*” p < 0.05 representa una diferencia significativa.

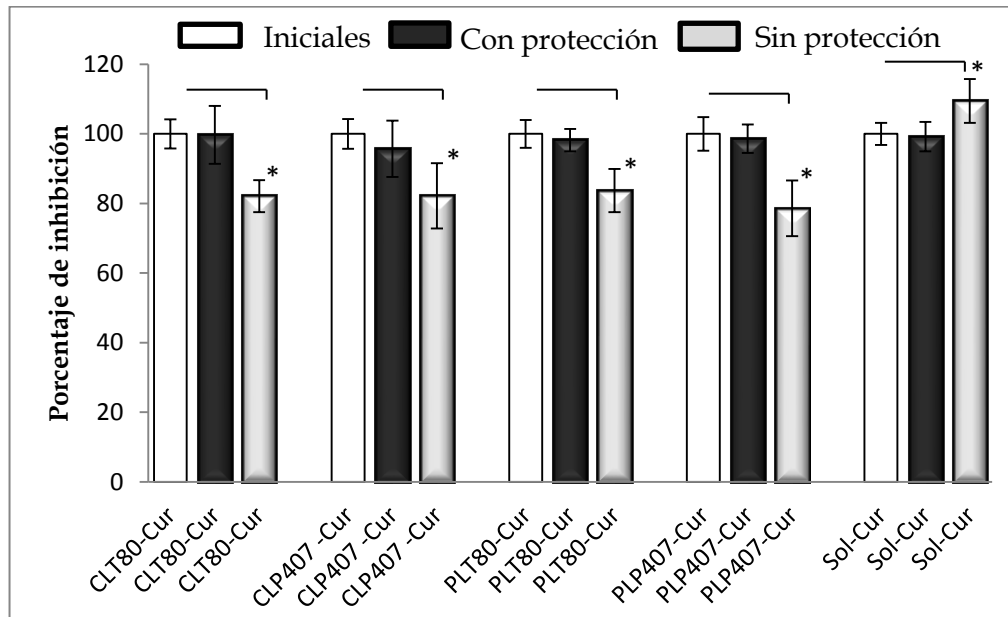


Figura 28. Resultados de la prueba de fotoestabilidad de los NLC cargados con curcuminoides. Se muestran los valores del porcentaje de inhibición de los curcuminoides para los sistemas recién preparados (inicial) y después de estar expuestos a 1.2 millones de lux-hora y una energía de ultravioleta cercano de 200 vatios /metro cuadrado, con protección y sin protección. C (Compritol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides). “*” p < 0.05 representa una diferencia significativa.

VII. CONCLUSIONES

Se prepararon y caracterizaron cuatro sistemas nanoparticulados conteniendo curcuminoides para ser administrados en la piel. Los componentes de las formulaciones influyeron tanto en el tamaño de partícula, cinética de liberación, capacidad de permeación y estabilidad de los NLC, así como también en la distancia de penetración, mostrando claramente que los curcuminoides atraviesan el estrato corneo y se localizan aproximadamente entre los 60 a 80 micrómetros de profundidad, alcanzando capas más profundas que la solución de curcuminoides.

Las pruebas de estabilidad mostraron que la incorporación de curcuminoides en NLC los protege de la degradación, especialmente a una temperatura de 5 °C durante 3 meses de almacenamiento, en contenedores de color ámbar. La exposición a luz intensa degradó los curcuminoides aún encapsulados en los NLC, aunque la degradación no está relacionada con su actividad antioxidante, pues los sistemas degradados conservan gran parte de su actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de los NLC conteniendo curcuminoides confirmó que la capacidad de inhibición de los radicales libres (ABTS⁺), está dada tanto por los curcuminoides como por sus productos de degradación, no existiendo una correlación directa entre la cantidad de curcuminoides y su actividad antioxidante.

Los NLC preparados en este trabajo, pueden ser utilizados como sistemas de liberación para la administración en piel de curcuminoides, mostrando una liberación prolongada y la capacidad para alcanzar capas profundas de la piel, lo que los convierte en acarreadores con potencial para la prevención y tratamiento de afecciones relacionadas con el estrés oxidativo.

VIII. REFERENCIAS

1. J. Baek, M.G. Lee, 2016. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Rep.* 21, 164–169. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000015>.
2. D. Edwin, 2016. Skin aging and oxidative stress: equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res. Rev.* 31, 36–54. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.001>.
3. Q. Lu, Y. Sun, I. Ares, A. Anadon, M. Martinez, M. Martinez-Larranaga, Z Yuan, X. Wang, M. A. Martinez, 2019. Deltamethrin toxicity: a review of oxidative stress and metabolism. *Environ. Res.* 170, 260–281. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.045>.
4. M. Giraud, G. Rivera, D. Moreira, A. Burmester, A. Castro, J. Carvajalino, A. Dafre, C. Niu, N. Tremblay, B. Paital, R. Rosa, J. Storey, I. Vega, W. Zhang, G. Yepiz, T. Zenteno, K. Storey, M. Hermes, 2019. Twenty years of the 'Preparation for Oxidative Stress' (POS) theory: ecophysiological advantages and molecular strategies. *Compr. Biochem. Physiol. Part A* 234, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.004>.
5. Z. Hussain, H.E. Thu, Sh-F. Ng, Sh. Khan, H. Katas, 2017b. Nanoencapsulation, an efficient and promising approach to maximize wound healing efficacy of curcumin: a review of new trends and state-of-the-art. *Colloids Surf. A* 150, 223–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.036>.
6. B.C. Jordan, ChD. Mock, R. Thilagavathi, Ch. Selvan, 2016. Molecular mechanisms of curcumin and its semisynthetic analogues in prostate cancer prevention and treatment. *Life Sci.* 152, 135–144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.036>.
7. Z. Rafiee, M. Nejatian, M. Daeihamed, S.M. Jafari, 2019. Application of curcumin loaded nanocarriers for food, drug and cosmetic purposes. *Trends Food Sci. Technol.* 88, 445–458. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.017>.
8. Z. Hussain, H.E. Thu, M.W. Amjad, F. Hussain, T.A. Ahmed, S. Khan, 2017a. Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: a review of new trends and future perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* 77, 1316–1326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.226>.
9. R. Thangapazham, A. Sharma, R. Maheshwari, 2007. Beneficial role of curcumin in skin diseases. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease* 595. pp. 343–357. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_15.
10. S. Abrahams, W. Haylett, G. Johnson, J. Carr, S. Bardien, 2019. Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative, and nitrosative stress: a review. *Neuroscience* 406, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.02.020>.
11. A. Khosa, S. Reddi, R.N. Saha, 2018. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomed. Pharmacother.* 103, 598–613. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.055>.
12. P. Chen, H. Zhang, Sh. Cheng, G. Zhai, Ch. Shen, 2016. Development of curcumin loaded nanostructured lipid carrier based thermosensitive in situ gel for dermal delivery. *Colloids Surf. A* 506, 356–362. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.06.054>.
13. J. Pardeike, A. Hommoss, R. Müller, 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.* 366 (1–2), 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>.

14. N.P. Aditya, M. Shim, I. Lee, *et al.*, 2013. Curcumin and genistein coloaded nanostructured lipid carriers: in vitro digestion and antiprostata cancer activity. *J. Agric. Food Chem.* 61 (8), 1878–1883. <https://doi.org/10.1021/jf305143k>.
15. H. Rashidzadeh, M. Salimi, S. Sadighian, *et al.*, 2019. In vivo antiplasmodial activity of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers. *Curr. Drug Deliv.* 16 (10), 923–930. <https://doi.org/10.2174/1567201816666191029121036>.
16. A.M.J. Newton, S. Kaur, 2019. Solid lipid nanoparticles for skin and drug delivery. *Nanoarchitectonics in Biomedicine*, 295–334.
17. B.M. Carlson, 2019. Skin. *The Human Body*, 65–85. [doi:10.1016/b978-0-12-804254-0.00003-x](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804254-0.00003-x).
18. Instituto Iberoamericano de Cosmetología y Spa, Constitución epidermis, dermis, hipodermis y anexos [Online] 2020. <http://www.cosmetologiayspa.com/constitucion-epidermis-dermis-hipodermis-y-anexos>.
19. Enfermera virtual. Barcelona: Col·legi Oficial d'Infermeres i Infermers de Barcelona. [Online] 2009, “Tejidos, membranas, piel y derivados de la piel” [acceso 16 de mayo de 2020]. Disponible en: www.infermeravirtual.com.
20. Skinlayers_(italiano).png: Adertderivative work: Fulvio314 [CC BY-SA 3.0] (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>).
21. Eucerin, Acerca de la piel. [Online] 2020. <https://www.eucerin.es/acerca-de-la-piel/conocimientos-basicos-sobre-la-piel/barrera-protectora-de-la-piel>.
22. S. Nafis, H.I. Maibach, 2018. Skin penetration of nanoparticles. *Emerging Nanotechnologies in Immunology*. 47–88.
23. E.B. Souto, I. Baldim, W.P. Oliveira, R. Rao, N. Yadav, F.M. Gama, S. Mahant, 2020. SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 17(3), 357–377. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1727883>.
24. A. Garces, M.H. Amaral, J.M. Sousa Lobo, A.C. Silva, 2018. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: a review, *Eur. J. Pharm. Sci.* 112, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.023>.
25. D.R. Bickers, M. Athar, 2006. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. *Journal of Investigative Dermatology*. 126, 2565–2575. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700340>.
26. F.A.S. Addor, 2017. Antioxidants in dermatology, *Antioxidants in dermatology*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 92 (3), 356–362. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175697>.
27. A. Shah, A.A. Sinha, 2013. Oxidative stress and autoimmune skin disease. *Eur J Dermatol.* 23(1), 5–13. <https://doi.org/10.1684/ejd.2012.1884>.
28. M. Avello, M. Suwalsky, 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. (494), 161–172. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>.
29. V. Sánchez-Valle, N. Méndez-Sánchez, 2013. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Med Sur.* 20(3), 161–168.
30. P. Poprac, K. Jomova, M. Simunkova, V. Kollar, C.J. Rhodes, M. Valko, 2017. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 38 (7), 592–607. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>
31. Q. Zhou, U. Mrowietz, M. Rostami-Yazdi, 2009. Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis. *Free Radical Biology and Medicine*. 47 (7), 891–905. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.033>.

32. M.N. Amin, K.F. Liza, M.S. Sarwar, J. Ahmed, M.T. Adnan, M.I. Chowdhury, M.Z. Hossain, M.S. Islam, 2015. Effect of lipid peroxidation, antioxidants, macro minerals and trace elements on eczema. *Arch Dermatol Res.* 307(7), 617-623.
<https://doi.org/10.1007/s00403-015-1570-2>.
33. N. Sivaranjani, S.V. Rao, G. Rajeev, 2013. Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR.* 7(12), 2683-2685.
<https://doi.org/10.7860/jcdr/2013/6635.3732>.
34. H. Ji, X.K. Li, 2016. Ji, H., & Li, X. K. (2016). Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2016, 2721469.
<https://doi.org/10.1155/2016/2721469>.
35. P. Ozturk, O. Arican, E. Belge Kurutas, T. Karakas, B. Kabakci, 2013. Oxidative stress in patients with scalp seborrheic dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat.* 21(2), 80-5.
36. W.P. Bowe, N. Patel, A.C. Logan, 2012. Acne vulgaris: the role of oxidative stress and the potential therapeutic value of local and systemic antioxidants. *J Drugs Dermatol.* 11(6), 742-6.
37. P. J. Kallis, A. Price, J.R. Dosal, A.J. Nichols, J. Keri, 2018. A Biologically Based Approach to Acne and Rosacea. *J Drugs Dermatol.* 17(6), 611-617.
38. D.A. Jones, 2009. Rosacea, reactive oxygen species, and azelaic Acid. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology.* 2(1), 26-30.
39. M. Wlaschek, K. Scharffetter-Kochanek, 2005. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Repair and Regeneration.* 13(5), 452-461.
<https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2005.00065.x>.
40. E. Rivarola de Gutierrez, A. Di Fabio, S. Salomón, H. Lanfranchi, 2014. Topical treatment of oral lichen planus with anthocyanins. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal.* 19(5), e459-e466. <https://doi.org/10.4317/medoral.19472>.
41. M. Naziroglu, I. Kokcam, 2000. Antioxidants and lipid peroxidation status in the blood of patients with alopecia. *Cell Biochem Funct.* 18, 169-73.
42. A. Akar, E. Arca, H. Erbil, *et al.*, 2002. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the scalp of patients with alopecia areata. *J Dermatol Sci.* 29, 85-90.
43. M. Naziroglu, I. Kokcam, H. Simsek, A.Z. Karakilci, 2003. Lipid peroxidation and antioxidants in plasma and red blood cells from patients with pemphigus vulgaris. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 14, 31-42. <https://doi.org/10.1515/jbcpp.2003.14.1.31>.
44. M.D. Mesa, M. Ramírez- Tortosa, C.M. Aguilera, A. Ramírez-Bosca, A. Gil, 2000. Pharmacological and nutritional effects of *Curcuma longa* L. extracts and curcuminoid. *Ars pharm.* 41(3), 307-321.
45. P. López, 2017. Química e industria de la Curcumina (tesis de grado) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
46. I. Chattopadhyay, K. Biswas, U. Bandyopadhyay; R.K. Banerjeejit, 2004. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Current science.* 87(1), 44-53.
47. P.N. Ravindran, B. K. Nirmal, K. Sivaraman, 2007. *Turmeric: El genus Curcuma.* 1a ed. Florida, U.S.A.: CRC.
48. K. Priyadarsini, 2014. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules.* 19(12), 20091-20112. <https://doi.org/10.3390/molecules191220091>.
49. B.B. Aggarwal, B. Sung, 2009. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci.* 30(2), 85-94.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.11.002>.
50. A. Pandey, R. Gupta, R. Srivastava, 2011. Curcumin-The Yellow Magic. *Asian J Appl Sci.* 4 (4), 343-354.

51. P.S. Wakte, B.S. Sachin, A.A. Patil, D.M. Mohato, T.H. Band, D.B. Shinde, 2011. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Separation and Purification Technology*. 79(1), 50-55.
52. F. Delgado-Vargas, O. Paredes-López, 2002. *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420031713>.
53. M. L.A.D. Lestari, Gunawan Indrayanto, Curcumin. In Harry G. Brittain, editor: *Profiles of drug substances, Excipients and Related Methodology*. Vol. 39, Burlington: Academic Press, 2014, 113- 204.
54. P. Saiz de Cos, 2014. *Cúrcuma I (Cúrcuma longa L.)*. *Reduca (Biología)*. Serie Botánica. 7 (2), 84-99.
55. B. Singh, M. Hakkarainen, K. Kamalinder, 2019 “*Nanonutraceuticals*”, 1a ed. New York, E.U. CRC Press.
56. J. González-Albadalejo, D. Sanz, R. M. Claramunt, J. L. Lavandera, I. Alkorta, J. Elguero, 2015. Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *An Real Acad Farm*. 81(4), 278-310.
57. Food & Nutrition Information Center, USDA: National Nutrient Database for Standard Reference. <https://www.nal.usda.gov/fnic>.
58. A.Y. Coronel Delgado, 2015. Efecto de las condiciones de secado por aspersión en la obtención de un colorante natural a partir de extractos líquidos de cúrcuma (tesis grado) Universidad Nacional de Colombia Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos Facultad de Ciencias Agrarias Medellín, Colombia.
59. M. Y. Khorasani, H. Langari, S.B.T. Sany, M. Rezayi, A. Sahebkar, 2019. The role of curcumin and its derivatives in sensory applications. *Materials Science and Engineering: C*. 103, 109792. <https://doi:10.1016/j.msec.2019.109792>.
60. L. Pari, D. Tewas, J. Eckel, 2008. Role of curcumin in health and disease. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 114(2), 127-149. <https://doi:10.1080/13813450802033958>.
61. M. Najafi, K. Mortezaee, M. Rahimifard, B. Farhood, H. Haghi-Aminjan, 2020. The role of curcumin/curcuminoids during gastric cancer chemotherapy: A systematic review of non-clinical study. *Life Sciences*. 257, 118051. <https://doi:10.1016/j.lfs.2020.118051>.
62. Z. Liu, P. Huang, S. Law, H. Tian, W. Leung, C. Xu, 2018. Preventive Effect of Curcumin Against Chemotherapy-Induced Side-Effects. *Frontiers in Pharmacology*. 9, 1374.
63. S.Y. Yu, M. Zhang, J. Luo, L. Zhang, Y. Shao, G. L, 2013. Curcumin ameliorates memory deficits via neuronal nitric oxide synthase in aged mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 45, 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.05.001>.
64. P. Ganesan, D.K. Choi, 2016. Current application of phytochemical-based nanocosmeceuticals for beauty and skin therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 1987-2007. <https://doi:10.2147/ijn.s104701>.
65. T. Esatbeyoglu, P. Huebbe, I.M.A. Ernst, D. Chin, A.E. Wagner, G. Rimbach, 2012. Curcumin-From Molecule to Biological Function. *Angewandte Chemie International Edition*. 51(22), 5308-5332. <https://doi.org/10.1002/anie.201107724>.
66. G. M. Holder, J.L. Plummer, 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. <https://doi.org/10.3109/00498257809069589>.
67. J.-K. Lin. MOLECULAR TARGETS OF CURCUMIN. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, 227-243. https://doi:10.1007/978-0-387-46401-5_10.

68. R.A. Sharma, S.A. Euden, S.L. Platton, D.N. Cooke, A. Shafayat, H.R. Hewitt, T.H. Marczylo, B. Morgan, D. Hemingway, S.M. Plummer, M. Pirmohamed, A.J. Gescher, W.P. Steward, 2004. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res.* 10(20), 6847-54.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0744>. PMID: 15501961.
69. A.L. Cheng, C. Hsu, J.K. Lin, M.M Hsu, Y.F. Ho, T.S. Shen, J.Y. Ko, J.T. Lin, B.R. Lin, W. Ming-Shiang, H.S. Yu, S.H. Jee, G.S. Chen, T.M. Chen, C.A. Chen, M.K. Lai, Y.S. Pu, M.H. Pan, Y.J. Wang, C.C. Tsai, C.Y. Hsieh, 2001. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 21(4B), 2895-900.
70. Y. Rojas, K. Aguado, I. González, 2016. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educación Química.* 27(4), 286-291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>.
71. K. Khezri, M. Saeedi, S. Maleki Dizaj, 2018. Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 106, 1499-1505. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.084>.
72. G. Caruso, L. Merlo, M. Caffo, 2014. Nanoparticles potential: types, mechanisms of action, actual *in vitro* and animal studies, recent patents. *Innovative Brain Tumor Therapy.* 53-50. <https://doi.org/10.1533/9781908818744.53>.
73. U. Lächelt, S. Wuttke, H. Engelke, 2020. Colloidal nanoparticles as pharmaceutical agents. *Colloids for Nanobiotechnology - Synthesis, Characterization and Potential Applications.* 89-115. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102828-5.00005-x>.
74. R. Rotem, D. Prospero, M. Colombo, 2020. Chapter 10 - Targeted delivery of nanoparticles, *Frontiers of Nanoscience.* 16, 253-264.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102828-5.00010-3>.
75. A. Gordillo-Galeano, C. Elizabeth Mora-Huertas, 2018. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 133, 285-308.
76. M. Uner, 2006. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie.* 61(5), 375-86.
77. P. Ganesan, D. Narayanasamy, 2017. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustainable Chemistry and Pharmacy.* 6, 37-56. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.002>.
78. I. Som, K. Bhatia, M. Yasir, 2012. Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. *J Pharm Bioallied Sci.* 4(1), 2-9.
<https://doi.org/10.4103/0975-7406.92724>.
79. V.K. Rapall, V. Kaul, S. Gorantla, T. Waghule, S.K. Dubey, M.M. Pandey, G. Singhvi, 2020. UV Spectrophotometric method for characterization of curcumin loaded nanostructured lipid nanocarriers in simulated conditions: method development, *in vitro* and *ex-vivo* applications in topical delivery. *Spectrochim. Acta Part A* 224, 117392. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117392>.
80. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26 (9-10), 1231-1237.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
81. G. López, A. Ganem, 2015. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): occlusive effect and penetration enhancement ability. *J. Cosmet. Dermatol. Sci. Appl.* 5, 62-72. <http://dx.doi.org/10.4236/jcdsa.2015.52008>.

82. V.R. Salvi, P. Pawar, 2019. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: a novel drug targeting carrier. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.017>.
83. S. Doktorovova, A.B. Kovacevic, M.L. Garcia, E.B. Souto, 2016. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: current evidence from in vitro and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 108, 235–252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.08.001>.
84. J. Huang, Q. Wang, T. Li, N. Xia, Q. Xia, 2017. Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies. *Journal of Food Engineering.* 215, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.002>
85. R. Thatipamula, C. Palem, R. Gannu, S. Mudragada, M. Yamsani, 2011. Formulation and *in vitro* characterization of domperidone loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *DARU* 19 (1), 23–32.
86. M. Kharat, G. Zhang, D.J. McClements, 2018. Stability of curcumin in oil-in-water emulsions: impact of emulsifier type and concentration on chemical degradation. *Food Res. Int.* 111, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.021>.
87. R.B. Friedrich, B. Kann, K. Coradini, H.L. Offerhaus, R.C.R. Beck, M. Windbergs, 2015. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 78, 204–213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.07.018>.
88. A. Beloqui, M.A. Solinis, A. Rodriguez-Gascon, A.J. Almeida, V. Preat, 2016. Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine* 12, 143–161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>.
89. H.A. Silva Favacho, R. Oliveira do Couto, M. Peres Ferreira Duarte, M.P. Garofo Peixoto, R. Fonseca Vianna López, V. Pedrazzi, C. Masetto de Gaitani, O. de Freitas, 2020. Synergy between surfactants and mucoadhesive polymers enhances the transbuccal permeation of local anesthetics from freeze-dried tablets. *Mater. Sci. Eng. C* 108, 110373. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110373>.
90. A. Williams, B. Barry, 2012. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.032>.
91. C. Vater, V. Hlawaty, P. Werdenits, M.A. Cichon, V. Klang, A. Elbe-Burger, M. Wirth, C. Valenta, 2020. Effects of lecithin-based nanoemulsions on skin: short-time cytotoxicity MTT and BrdU studies, skin penetration of surfactants and additives and the delivery of curcumin. *Int. J. Pharm.* 580, 119209. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119209>.
92. K.-L. Mao, Z.-L. Fan, J.-D. Yuan, P.-P. Chen, J.-J. Yang, J. Xu, D.-L. ZhuGe, B.-H. Jin, Q.-Y. Zhu, B.-X. Shen, Y. Sohawon, Y.-Z. Zhao, H.-L. Xu, 2017. Skinpenetrating polymeric nanoparticles incorporated in silk fibroin hydrogel for topical delivery of curcumin to improve its therapeutic effect on psoriasis mouse model. *Colloids Surf. B* 160, 704–714. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.029>.
93. S.M. Abdel-Hafez, R.M. Hathout, O.A. Sammour, 2018b. Tracking the transdermal penetration pathways of optimized curcumin-loaded chitosan nanoparticles via confocal laser scanning microscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 753–764. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.170>.
94. L. Sun, Z. Liu, L. Wang, D. Cun, H.H.Y. Tong, R. Yan, X. Chen, R. Wang, Y. Zheng, 2017. Enhanced topical penetration, system exposure and anti-psoriasis activity of two particle-sized, curcumin-loaded PLGA nanoparticles in hydrogel. *J. Controll. Release* 254, 44–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.385>.

95. P. Priya, R. M. Raj, V. Vasanthakumar, V. Raj, 2017. Curcumin-loaded layer-by-layer folic acid and casein coated carboxymethyl cellulose/casein nanogels for treatment of skin cancer. *Arab. J. Chem* in press.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.07.010>.
96. S. Ternullo, E. Gagnat, K. Julin, M. Johannessen, P. Basnet, Z. Vanic, N. Skalko-Basnet, 2019. Liposomes augment biological benefits of curcumin for multitargeted skin therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 144, 154–164.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.09.016>.
97. S.M. Abdel-Hafez, R.M. Hathout, O.A. Sammour, 2018a. Curcumin-loaded ultradeformable nanovesicles as a potential delivery system for breast cancer therapy. *Colloids Surf. B* 167, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.051>.
98. M. Wolf, V. Klang, T. Stojcic, C. Fuchs, M. Wolzt, C. Valenta, 2018. NLC versus nanoemulsions: effect on physiological skin parameters during regular in vivo application and impact on drug penetration. *Int. J. Pharm.* 549, 343–351.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.007>.
99. L. Vidlarova, G.B. Romero, J. Hanus, F. Stepanek, R.H. Muller, 2016. Nanocrystals for dermal penetration enhancement – effect of concentration and underlying mechanisms using curcumin as model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 104, 216–225.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.05.004>.
100. P. Carter, B. Narasimhan, Q. Wang, 2019. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *Int. J. Pharm.* 555, 49–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.032>.
101. X. Li, Sh.-f Nie, J. Kong, N. Li, Ch.-y Ju, W.-s Pan, 2008. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. *Int. J. Pharm.* 363, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.017>.
102. W. Mehnert, K. Mader, 2001. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 165–196.
103. N. Karimi, B. Ghanbarzadeh, H. Hamishehkar, B. Mehramuz, H.S. Kafil, 2018. Antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of turmeric extract loaded Nanostructured lipid carrier (NLC). *Colloid Interface Sci. Commun.* 2218–2224.
104. J. Leiva-Vega, R. Villalobos-Carvajal, G. Ferrari, F. Donsi, R.N. Zuniga, C. Shene, 2020. Influence of interfacial structure on physical stability and antioxidant activity of curcumin multilayer emulsions. *Food Bioprod. Process.* 121, 65–75.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.01.010>.
105. Y. Liu, D. Ying, Y. Cai, X. Le, 2017. Improved antioxidant activity and physicochemical properties of curcumin by adding ovalbumin and its structural characterization. *Food Hydrocoll.* 72, 304–311.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.007>.
106. Y. Hu, C. He, C. Jiang, Y. Liao, H. Xiong, Q. Zhao, 2020. Complexation with whey protein fibrils and chitosan: a potential vehicle for curcumin with improved aqueous dispersion stability and enhanced antioxidant activity. *Food Hydrocoll.* 104, 105729.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105729>.
107. H. Wang, X. Gong, X. Guo, C. Liu, Y.-Y. Fan, J. Zhang, B. Niu, W. Li, 2019. Characterization, release, and antioxidant activity of curcumin-loaded sodium alginate/ZnO hydrogel beads. *Int. J. Biol. Macromol.* 121, 1118–1125.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.121>.
108. X. Guo, W. Li, H. Wang, Y.-Y. Fan, H. Wang, X. Gao, B. Niu, X. Gong, 2018. Preparation, characterization, release and antioxidant activity of curcumin loaded amorphous calcium phosphate nanoparticles. *J. Non Cryst. Solids* 500, 317–325.
<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.08.015>.

109. I. Nikolic, E. Mitsou, A. Damjanovic, V. Papadimitriou, J. Antic-Stankovic, B. Stanojevic, A. Xenakis, S. Savic, 2020. Curcumin-loaded low-energy nanoemulsions: linking EPR spectroscopy-analysed microstructure and antioxidant potential with in vitro evaluated biological activity. *J. Mol. Liq.* 301, 112479.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112479>.
110. Sh. Chen, J. Wu, Q. Tang, Ch. Xu, Y. Huang, D. Huang, F. Luo, Y. Wu, F. Yan, Z. Weng, Sh. Wang, 2020. Nano-micelles based on hydroxyethyl starch-curcumin conjugates for improved stability, antioxidant and anticancer activity of curcumin. *Carbohydr. Polym.* 228, 115398. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115398>.
111. M. Mohammadian, M. Salami, Sh. Momen, F. Alavi, Z. Emam-Djomeh, 2019. Fabrication of curcumin-loaded whey protein microgels: structural properties, antioxidant activity, and in vitro release behavior. *LWT - Food Sci. Technol.* 103, 94-100.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.076>.
112. M. Mehanny, R.M. Hathout, A.S. Geneidi, S. Mansour, 2016. Exploring the use of nanocarrier systems to deliver the magical molecule; Curcumin and its derivatives. *J. Controll. Release* 225, 1-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.018>.
113. N. Suwannateep, S. Wanichwecharungruang, S.F. Haag, S. Devahastin, N. Groth, J.W. Fluhr, J. Lademann, M.C. Meinke, 2012. Encapsulated curcumin results in prolonged curcumin activity in vitro and radical scavenging activity ex vivo on skin after UVB-irradiation. *Eur. J. Pharmac. Biopharm.* 82, 485-490.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.08.010>.
114. A. Tai, T. Sawano, F. Yazama, H. Ito, 2011. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim. Biophys. A Acta (BBA)* 1810 (2), 170-177.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.11.004>.
115. C. Chang, T. Meikle, Y. Su, X. Wang, C. Dekiwadia, C. Drummond, C. Conn, Y. Yang, 2019. Encapsulation in egg white protein nanoparticles protects anti-oxidant activity of curcumin. *Food Chem.* 280, 65-72.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.124>.
116. L. Shen, H.-F. Ji, 2012. The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? *Trends Mol. Med.* 18, 138-144.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.01.004>.
117. J. Jankun, M. Wyganowska-Świątkowska, K. Dettlaff, A. Jelińska, A. Surdacka, D. Wątrobska-Świetlikowska, E. Skrzypczak-Jankun, 2016. Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation. *Int. J. Mol. Med.* 37, 1151-1158.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2524>.

IX. ANEXOS

Anexo I. Caracterización de las formulaciones

Tabla 11. Resultados de tamaño de partícula, PDI y potencial Z (n=3) para cada formulación.

Sistema	CLT80-Cur			CLP407-Cur			PLT80-Cur			PLP407-Cur		
	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)	Tamaño (nm)	PDI	PZ (mV)
1	201.10	0.203	-15.4	191.0	0.255	-7.0	143.40	0.191	-14.7	119.9	0.247	-3.1
	203.10	0.210	-16.2	141.3	0.225	-6.3	155.00	0.193	-14.9	103.8	0.258	-3.6
	202.20	0.212	-17.0	148.7	0.240	-6.5	132.80	0.229	-14.2	117.6	0.250	-3.7
	214.00	0.210	-15.0	147.5	0.236	-6.1	148.10	0.178	-14.2	96.0	0.249	-5.1
	203.80	0.226	-15.0	169.1	0.245	-6.5	146.60	0.206	-15.3	106.0	0.248	-4.9
	209.90	0.222	-16.3	154.1	0.237	-7.4	151.10	0.195	-14.8	101.0	0.247	-4.6
	205.70	0.207	-15.4	169.2	0.224	-6.9	139.50	0.194	-14.4	96.3	0.253	-3.8
	213.80	0.235	-15.3	161.4	0.242	-7.2	147.70	0.210	-14.5	111.7	0.241	-4.0
2	212.60	0.215	-15.7	149.3	0.218	-6.8	150.10	0.199	-14.4	114.8	0.245	-4.4
	223.40	0.182	-14.8	136.3	0.189	-8.2	141.60	0.193	-15.2	105.8	0.203	-4.3
	225.70	0.182	-15.7	128.6	0.208	-8.2	152.40	0.194	-16.8	112.6	0.224	-3.9
	233.00	0.206	-15.6	133.0	0.186	-9.3	142.00	0.221	-16.8	113.9	0.226	-4.4
	218.10	0.173	-14.7	121.2	0.162	-6.9	161.70	0.219	-15.1	132.4	0.268	-3.4
	217.50	0.178	-16.5	129.1	0.157	-6.8	152.60	0.212	-15.2	113.3	0.275	-3.7
	218.10	0.168	-15.6	131.1	0.181	-6.9	156.60	0.205	-15.1	118.1	0.255	-4.1
	225.10	0.186	-15.8	144.5	0.259	-8.1	140.20	0.236	-13.6	114.7	0.230	-4.0
3	223.80	0.188	-14.9	147.6	0.262	-8.8	147.70	0.237	-14.4	106.8	0.241	-4.0
	219.50	0.161	-16.1	146.8	0.268	-7.1	160.20	0.219	-15.0	111.9	0.236	-3.7
	213.00	0.205	-15.0	167.7	0.280	-6.0	152.10	0.176	-14.1	117.3	0.241	-3.8
	209.90	0.191	-15.1	157.6	0.275	-5.8	149.50	0.172	-14.8	109.4	0.243	-4.6
	213.70	0.203	-15.3	161.5	0.269	-7.4	149.60	0.174	-15.5	118.4	0.256	-5.1
	217.20	0.201	-15.0	145.7	0.252	-6.6	150.80	0.175	-13.6	113.9	0.259	-6.1
	212.60	0.201	-14.1	154.0	0.266	-6.9	153.70	0.188	-13.5	106.7	0.258	-3.6
	203.70	0.220	-15.9	149.6	0.267	-8.1	146.20	0.177	-13.7	114.4	0.260	-3.8
218.50	0.216	-15.6	159.8	0.255	-6.8	142.00	0.196	-13.5	109.4	0.234	-3.7	
208.80	0.199	-16.0	149.3	0.263	-7.2	142.10	0.183	-14.5	106.1	0.212	-4.0	
208.00	0.189	-15.2	152.5	0.261	-7.9	152.80	0.179	-13.6	122.5	0.242	-3.5	
Media	213.9	0.20	-15.5	149.9	0.24	-7.2	148.4	0.20	-14.6	111.7	0.24	-4.1
S.D.	8.1	0.02	0.6	15.1	0.04	0.9	6.6	0.02	0.9	7.9	0.02	0.6

S.D.: Desviación estándar

PZ: Potencial Z

Tabla 12. Resultados de eficiencia de encapsulamiento, capacidad de carga y eficiencia del proceso (n=3) para cada formulación

Formulación	EE (%)	Media (%)	S.D.	Carga (µg/mg)	Media	S.D.	EP (%)	Media (%)	S.D.
CLT80-Cur	79.07	79.70	1.0	2.61	2.63	0.03	95.2	92.9	2.1
	79.19			2.61			91.1		
	80.84			2.67			92.3		
CLP407-Cur	83.07	86.67	3.1	3.05	3.18	0.11	92.5	91.7	3.3
	88.25			3.24			94.6		
	88.70			3.25			88.1		
PLT80-Cur	88.68	90.36	1.5	2.91	2.97	0.05	93.8	90.4	3.2
	91.17			2.99			90.1		
	91.23			3.00			87.4		
PLP407-Cur	97.11	96.89	0.3	3.27	3.26	0.01	92.3	93.9	4.5
	96.52			3.25			90.4		
	97.05			3.27			98.9		

S.D.: Desviación estándar

Size (d.nm):	% Int.	PK SD (d.nm):	Est MW (kDa)	Start (mL)	End (mL)
Peak 1: 149.3	100.0	79.11	8.12e4	0.00	0.00

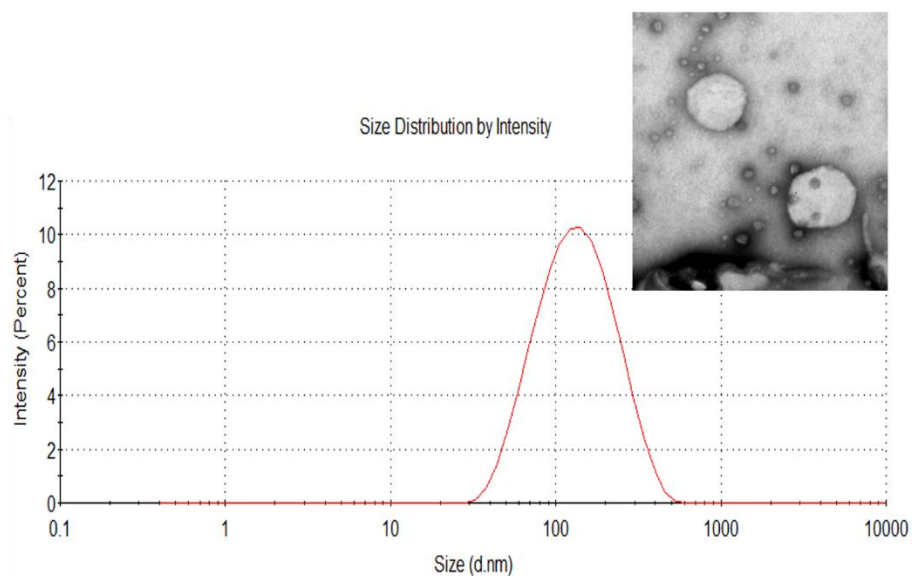


Figura 29. Distribución del tamaño de partícula y micrografía obtenida por TEM para el sistema CLP407-Cur. C (Compritol® 888 ATO); L (Labrasol®); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides).

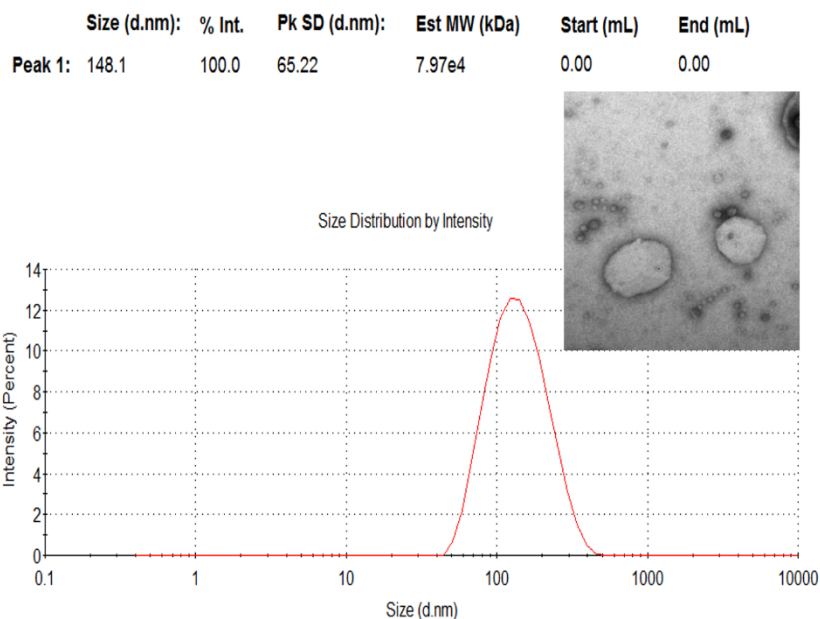


Figura 30. Distribución del tamaño de partícula y micrografía obtenida por TEM para el sistema PLT80-Cur. P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween 80); Cur (curcuminoides).

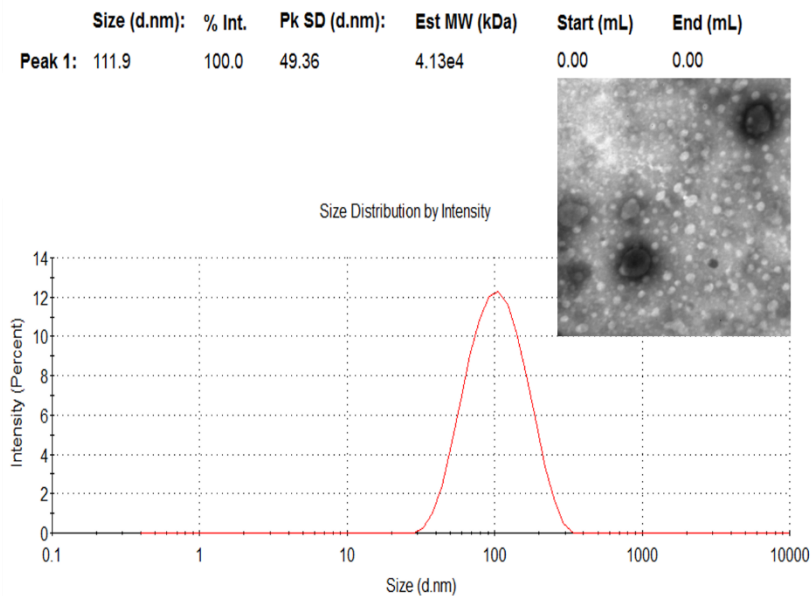


Figura 31. Distribución del tamaño de partícula y micrografía obtenida por TEM para el sistema PLP407-Cur. P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides).

Anexo II. Perfiles de Liberación y ajuste a modelos

Tabla 13. Perfil de liberación de nanopartículas del sistema CLT80-Cur

Sistema CLT80-Cur											
Tiempo	Absorbancia			Curcuminoides liberados (μg)			% Curcuminoides			Media	S.D.
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1	0.0000	0.0000	0.0000	0.1459	0.1459	0.1459	0.2939	0.2939	0.2939	0.2939	0.0
2	0.0097	0.0101	0.0151	2.0293	2.1066	3.0718	4.0873	4.2428	6.1869	4.8390	1.2
3	0.0226	0.0234	0.0332	4.6803	4.8409	6.8100	9.4266	9.7501	13.7161	10.9643	2.4
4	0.0365	0.0355	0.0477	7.7236	7.5490	10.1328	15.5560	15.2045	20.4085	17.0563	2.9
5	0.0443	0.0442	0.0554	9.8039	9.7876	12.3668	19.7459	19.7133	24.9079	21.4557	3.0
6	0.0522	0.0506	0.0630	12.0239	11.7166	14.7004	24.2174	23.5984	29.6080	25.8079	3.3
7	0.0574	0.0641	0.0695	13.8448	15.1151	16.9390	27.8848	30.4432	34.1168	30.8149	3.1
8	0.0623	0.0672	0.0712	15.6880	16.7143	18.3514	31.5972	33.6642	36.9614	34.0743	2.7
9	0.0662	0.0721	0.0736	17.4139	18.7089	19.9251	35.0733	37.6815	40.1311	37.6287	2.5

S.D.: Desviación estándar

C (Compritrol® 888 ATO); L (Labrasol®); T80 (Tween 80); Cur (curcuminoides).

Tabla 14. Perfil de liberación de nanopartículas del sistema CLP407-Cur

Sistema CLP407-Cur											
Tiempo	Absorbancia			Curcuminoides liberados (μg)			% Curcuminoides			Media	S.D.
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1	0.0331	0.0262	0.0117	7.0147	5.5961	2.7768	14.6444	11.6830	5.7971	10.7082	4.5
2	0.0679	0.0812	0.0676	14.2548	16.6293	13.7598	29.7596	34.7168	28.7262	31.0675	3.2
3	0.0914	0.1217	0.1034	19.8510	25.7127	21.7259	41.4425	53.6800	45.3567	46.8264	6.2
4	0.1098	0.1505	0.1215	24.8255	33.1629	26.8278	51.8277	69.2337	56.0079	59.0231	9.1
5	0.1219	0.1648	0.1331	28.8680	38.2587	30.9544	60.2671	79.8720	64.6230	68.2541	10.3
6	0.1264	0.1686	0.1437	31.6301	41.5483	35.0672	66.0336	86.7396	73.2091	75.3275	10.5
7	0.1299	0.1703	0.1452	34.2687	44.4911	37.5869	71.5422	92.8833	78.4695	80.9650	10.9
8	0.1294	0.1672	0.1450	36.1892	46.5336	39.8015	75.5515	97.1474	83.0930	85.2640	11.0
9	0.1291	0.1609	0.1426	38.1405	47.9100	41.5884	79.6253	100.0209	86.8234	88.8232	10.3

S.D.: Desviación estándar

C (Compritrol® 888 ATO); L (Labrasol®); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides).

Tabla 15. Perfil de liberación de nanopartículas del sistema PLT80-Cur

Sistema PLT80-Cur											
Tiempo	Absorbancia			Curcuminoides liberados (μg)			% Curcuminoides			Media	S.D.
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1	0.0141	0.0078	0.0021	2.8680	1.6656	0.5560	5.6904	3.3048	1.1031	3.3661	2.3
2	0.0170	0.0182	0.0136	3.6564	3.8046	2.8193	7.2547	7.5489	5.5939	6.7991	1.1
3	0.0301	0.0323	0.0288	6.4587	6.8185	5.9745	12.8149	13.5288	11.8542	12.7326	0.8
4	0.0439	0.0480	0.0440	9.5985	10.3591	9.3645	19.0446	20.5537	18.5803	19.3929	1.0
5	0.0598	0.0647	0.0577	13.3568	14.3351	12.6996	26.5015	28.4427	25.1976	26.7140	1.6
6	0.0710	0.0764	0.0666	16.4533	17.6039	15.3197	32.6454	34.9283	30.3962	32.6566	2.3
7	0.0742	0.0802	0.0712	18.1784	19.5282	17.2471	36.0682	38.7464	34.2204	36.3450	2.3
8	0.0760	0.0820	0.0750	19.6826	21.1251	19.0911	39.0528	41.9149	37.8792	39.6156	2.1
9	0.0792	0.0818	0.0770	21.4849	22.3637	20.6463	42.6289	44.3724	40.9649	42.6554	1.7

S.D.: Desviación estándar

P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween 80); Cur (curcuminoides).

Tabla 16. Perfil de liberación de nanopartículas del sistema PLP407-Cur

Sistema PLP407-Cur											
Tiempo	Absorbancia			Curcuminoides liberados (μg)			% Curcuminoides			Media	S.D.
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1	0.0335	0.0264	0.0245	6.7413	5.4371	4.8448	13.7578	11.0961	9.8873	11.5804	2.0
2	0.0814	0.0707	0.0561	16.5166	14.4077	11.3344	33.7074	29.4035	23.1314	28.7474	5.3
3	0.1093	0.1015	0.0861	23.1707	21.4564	18.0031	47.2871	43.7885	36.7410	42.6055	5.4
4	0.1257	0.1198	0.1227	28.0355	26.5676	27.3015	57.2153	54.2195	55.7174	55.7174	1.5
5	0.1338	0.1282	0.1310	31.5514	30.0502	30.8008	64.3905	61.3269	62.8587	62.8587	1.5
6	0.1363	0.1340	0.1376	34.1112	33.1606	29.3073	69.6147	67.6747	59.8109	65.7001	5.2
7	0.1365	0.1344	0.1240	36.2656	35.3181	28.8178	74.0115	72.0779	58.8118	68.3004	8.3
8	0.1316	0.1321	0.1209	37.4386	36.9606	30.1452	76.4053	75.4298	61.5208	71.1186	8.3
9	0.1257	0.1338	0.1158	38.3429	39.3398	31.0386	78.2507	80.2852	63.3441	73.9600	9.2

S.D.: Desviación estándar

P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides).

Tabla 17. Tabla: Perfil de liberación de solución de Curcuminoides

Sistema solución de Curcuminoides											
Tiempo	Absorbancia			Curcuminoides (μg)			% Curcuminoides			Media	S.D.
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1	0.0250	0.0297	0.0346	5.0556	6.0000	6.9104	10.1825	12.0846	13.9183	12.0618	1.9
2	0.0701	0.0711	0.0735	14.1591	14.4618	14.9653	28.5178	29.1274	30.1415	29.2622	0.8
3	0.0891	0.0995	0.1105	18.9205	21.0533	23.2541	38.1077	42.4034	46.8360	42.4490	4.4
4	0.1057	0.1153	0.1265	23.5120	25.6510	28.0602	47.3554	51.6636	56.5161	51.8450	4.6
5	0.1060	0.1189	0.1318	25.2131	28.1375	31.0479	50.7817	56.6716	62.5335	56.6623	5.9
6	0.1100	0.1212	0.1320	27.6332	30.4286	33.1328	55.6560	61.2861	66.7328	61.2250	5.5
7	0.1154	0.1218	0.1278	30.3853	32.4270	34.3714	61.1990	65.3112	69.2274	65.2459	4.0
8	0.1140	0.1219	0.1285	31.9081	34.3382	36.4911	64.2661	69.1606	73.4967	68.9745	4.6
9	0.1230	0.1231	0.1236	35.4170	36.4633	37.5405	71.3333	73.4407	75.6104	73.4615	2.1

S.D.: Desviación estándar

Tabla 18. Ajuste a modelos Orden cero, Primer orden, Higuchi y Peppas - Korsmeyer

CLT80-Cur	Orden cero			Primer orden			Higuchi			Peppas-Korsmeyer		
Rsqr	0.9724	0.9683	0.9723	0.8439	0.8302	0.8668	0.7417	0.7227	0.7807	0.9831	0.9889	0.9727
AIC	52	53	52	68	69	66	72	73	71	50	46	54
MSC	3.4	3.4	3.4	1.6	1.6	1.8	1.1	1.1	1.3	3.6	4.1	3.2
CLP407-Cur	Orden cero			Primer orden			Higuchi			Peppas-Korsmeyer		
Rsqr	0.8364	0.8371	0.8846	0.9664	0.9388	0.9295	0.8516	0.7421	0.6964	0.9961	0.9873	0.9585
AIC	64	66	63	50	57	59	23	27	27	10	17	21
MSC	1.6	1.6	1.9	3.2	2.6	2.4	1.4	0.9	0.7	4.6	3.4	2.2
PLT80-Cur	Orden cero			Primer orden			Higuchi			Peppas-Korsmeyer		
Rsqr	0.9808	0.9753	0.9735	0.8655	0.8576	0.8504	0.7953	0.7841	0.7605	0.9808	0.9756	0.9775
AIC	48	51	52	65	67	68	69	71	72	50	53	53
MSC	3.7	3.5	3.4	1.8	1.7	1.7	1.4	1.3	1.2	3.5	3.3	3.3
PLP407-cur	Orden cero			Primer orden			Higuchi			Peppas-Korsmeyer		
Rsqr	0.6987	0.8250	0.5878	0.9647	0.9595	0.8803	0.8201	0.7809	0.6968	0.9805	0.9841	0.9976
AIC	69.9	65.5	74.7	50.6	52.3	63.6	25.0	25.5	29.1	18.1	17.0	11.8
MSC	1.0	1.5	0.7	3.1	3.0	1.9	1.2	1.0	0.7	2.9	3.1	5.0

Anexo III. Perfiles de Permeación

Tabla 19. Perfil de permeación de nanopartículas del sistema CLT80-Cur

CLT80-Cur No	Absorbancias						Curcuminoides (µg)						Media	S.D.
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
1	0.036	0.077	0.047	0.017	0.082	0.076	0.456	1.054	0.616	0.187	1.136	1.046	0.749	0.4
2	0.050	0.003	0.004	0.012	0.038	0.000	1.118	1.040	0.619	0.304	1.627	0.980	0.948	0.5
3	0.012	0.009	0.024	0.027	0.001	0.009	1.232	1.105	0.909	0.630	1.582	1.046	1.084	0.3
4	0.021	-0.011	0.002	0.096	0.012	0.034	1.474	0.892	0.877	1.965	1.691	1.474	1.396	0.4
5	-0.001	0.003	0.019	-0.015	-0.006	0.003	1.396	0.879	1.095	1.680	1.542	1.454	1.341	0.3
6	0.003	0.035	0.031	0.018	-0.001	-0.019	1.380	1.330	1.484	1.877	1.467	1.117	1.443	0.3
7	0.048	0.048	0.060	0.029	-0.005	0.005	2.010	1.971	2.288	2.241	1.330	1.123	1.827	0.5
8	0.056	0.007	0.012	0.010	0.005	-0.002	2.758	2.015	2.405	2.328	1.345	1.033	1.981	0.7

S.D.: Desviación estándar

C (Compritol® 888 ATO); L (Labrasol®); T80 (Tween 80); Cur (curcuminoides).

Tabla 20. Perfil de permeación de nanopartículas del sistema CLP407-Cur

CLP407-Cur No	Absorbancias						Curcuminoides (µg)						Media	S.D.
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
1	0.016	0.024	0.011	0.022	0.007	0.023	0.166	0.289	0.105	0.264	0.046	0.266	0.189	0.1
2	0.012	0.035	0.015	0.013	0.005	0.005	0.276	0.732	0.254	0.394	0.054	0.280	0.332	0.2
3	0.013	0.002	0.011	0.002	0.022	0.008	0.408	0.704	0.356	0.367	0.318	0.340	0.416	0.1
4	0.003	-0.002	-0.003	0.011	0.037	0.013	0.385	0.620	0.254	0.463	0.790	0.473	0.498	0.2
5	0.020	0.037	0.010	0.021	0.007	0.038	0.611	1.089	0.343	0.710	0.835	0.963	0.759	0.3
6	0.021	0.014	0.032	0.004	0.005	-0.001	0.858	1.227	0.752	0.702	0.853	0.892	0.881	0.2
7	0.039	0.013	0.013	0.010	0.009	0.048	1.359	1.361	0.882	0.779	0.925	1.529	1.139	0.3
8	0.008	0.011	-0.003	0.002	0.027	0.016	1.419	1.457	0.779	0.744	1.261	1.704	1.227	0.4

S.D.: Desviación estándar

C (Compritol® 888 ATO); L (Labrasol®); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides).

Tabla 21. Perfil de permeación de nanopartículas del sistema PLT80-Cur

CLT80-Cur No	Absorbancias						Curcuminoides (µg)						Media	S.D.
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
1	0.042	0.057	0.039	0.028	0.019	0.021	0.542	0.760	0.498	0.347	0.216	0.238	0.434	0.207
2	0.019	0.016	0.011	0.019	0.017	0.017	0.755	0.928	0.598	0.565	0.398	0.421	0.611	0.203
3	0.019	0.024	0.034	0.025	0.023	0.026	0.970	1.221	1.036	0.861	0.670	0.738	0.916	0.203
4	0.006	0.011	0.014	0.014	0.017	0.015	0.991	1.316	1.172	0.998	0.850	0.887	1.036	0.177
5	0.026	0.022	0.022	0.012	0.006	0.035	1.312	1.570	1.425	1.114	0.877	1.333	1.272	0.244
6	0.017	0.011	0.009	0.008	0.012	0.015	1.499	1.663	1.500	1.163	0.995	1.489	1.385	0.251
7	0.024	0.029	0.020	0.023	0.020	0.031	1.786	2.025	1.736	1.431	1.227	1.871	1.679	0.296
8	0.016	0.027	0.027	0.023	0.027	0.028	1.961	2.359	2.060	1.699	1.558	2.221	1.976	0.305

S.D.: Desviación estándar

P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween 80); Cur (curcuminoides).

Tabla 22. Perfil de permeación de nanopartículas del sistema PLP407-Cur

PLP407-Cur No	Absorbancias						Curcuminoides (µg)						Media	S.D.
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
1	0.029	0.049	0.019	-0.010	0.019	0.007	0.366	0.649	0.208	-0.211	0.212	0.041	0.211	0.291
2	0.021	0.026	0.031	0.036	0.033	-0.026	0.607	0.960	0.591	0.254	0.635	-0.399	0.441	0.469
3	0.031	0.007	0.022	0.044	0.003	0.016	1.002	1.001	0.842	0.831	0.617	-0.235	0.676	0.468
4	0.004	0.005	0.028	0.001	0.002	0.050	1.004	1.009	1.190	0.787	0.590	0.436	0.836	0.285
5	0.032	0.002	-0.003	0.005	0.012	0.004	1.400	0.983	1.085	0.792	0.704	0.428	0.899	0.336
6	0.007	-0.018	-0.010	-0.007	-0.014	0.001	1.442	0.661	0.879	0.633	0.440	0.385	0.740	0.386
7	0.004	0.059	0.009	0.022	0.003	0.041	1.441	1.452	0.948	0.890	0.428	0.918	1.013	0.386
8	0.004	0.009	0.028	0.002	0.024	0.029	1.436	1.518	1.287	0.855	0.718	1.271	1.181	0.322

S.D.: Desviación estándar

P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); P407 (Poloxámero 407); Cur (curcuminoides).

Tabla 23. Perfil de permeación de solución de Curcuminoides

PLP407-Cur		Absorbancias						Curcuminoides (μg)						Media	S.D.
No	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6			
1	0.000	0.000	0.029	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0
2	0.012	0.089	0.024	0.093	0.039	0.020	0.118	1.227	0.292	1.285	0.501	0.227	0.608	0.5	
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.057	1.166	0.231	1.224	0.440	0.166	0.547	0.5	
4	0.026	0.009	0.029	0.028	0.038	0.029	0.381	1.239	0.585	1.563	0.934	0.526	0.871	0.5	
5	0.028	0.015	0.021	0.006	0.002	0.000	0.736	1.396	0.822	1.589	0.902	0.465	0.985	0.4	
6	0.019	0.000	0.002	0.000	0.000	0.030	0.960	1.335	0.790	1.528	0.841	0.835	1.048	0.3	
7	0.000	0.025	0.000	0.043	0.000	0.021	0.899	1.640	0.733	2.089	0.780	1.076	1.203	0.5	
8	0.026	0.002	0.043	0.005	0.004	0.025	1.221	1.601	1.303	2.094	0.776	1.380	1.396	0.4	

S.D.: Desviación estándar

Anexo IV. Intensidad de fluorescencia acumulada

Tabla 24. Intensidad de fluorescencia acumulada para todos los sistemas

Profundidad en piel	Intensidad de fluorescencia acumulada				
	CLP407-Cur	CLT80-Cur	PLP407-Cur	PLT80-Cur	Sol.Cur
3	415.79	227.22	220.10	153.92	121.08
6	413.47	253.13	188.12	149.11	120.67
9	379.64	245.91	170.46	144.12	121.06
12	364.69	349.80	163.68	142.31	121.50
15	361.81	328.93	164.89	142.37	121.57
18	371.67	359.48	157.70	143.86	121.18
21	388.80	285.92	168.55	146.02	121.72
24	415.56	275.62	182.84	149.43	121.19
27	441.85	279.94	191.24	154.68	121.78
30	442.53	302.56	217.44	164.93	121.71
33	459.01	398.33	243.51	189.05	123.20
36	491.67	412.85	254.27	254.05	124.40
39	524.83	405.79	266.77	311.13	128.40
42	539.14	380.70	331.24	309.32	131.86
45	571.73	357.88	376.33	332.92	136.27
48	590.42	350.18	395.93	377.47	146.01
51	609.13	379.53	414.72	458.01	184.40
54	593.34	406.14	377.44	546.19	291.73
57	606.29	421.84	311.86	592.67	332.48
60	636.53	480.66	273.33	602.32	321.93
63	683.13	539.84	257.31	599.63	283.68
66	737.60	646.00	247.35	629.65	264.53
69	774.40	694.73	236.40	719.14	221.49
72	788.42	674.15	228.51	717.95	187.43
75	787.40	662.30	221.87	711.87	177.82
78	705.41	583.82	206.39	632.66	163.71
81	594.23	452.37	197.99	583.53	158.25
84	531.29	316.63	188.96	503.63	159.76
87	436.68	292.36	187.62	476.92	153.99
90	358.33	260.80	168.95	458.07	151.20
93	295.95	214.94	133.47	329.02	151.22
96	231.79	214.94	133.47	230.44	136.48
99	231.79	211.26	129.41	230.44	136.48
102	214.21	194.26	127.17	186.46	125.81
105	202.49	177.84	125.41	156.75	123.99
108	191.87	164.73	125.19	186.46	125.81
Suma	17,382.89	13,203.38	7,985.89	12,816.50	5,855.79

Anexo V. Estabilidad: Resultados de TP, PDI, potencial Z, % cantidad de curcuminoides y % inhibición

Tabla 25. Estabilidad: tamaño de partícula, muestras protegidas de la iluminación (5 °C y 25 °C, durante 3 meses) n=3

Sistema	CLT80-Cur			CLP407 -Cur			PLT80-Cur			PLP407-Cur		
	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C
1	201.10	222.30	248.30	191.00	141.20	160.10	143.40	158.50	155.20	119.90	107.30	95.83
	203.10	225.70	207.90	141.30	161.30	133.50	155.00	147.30	155.70	103.80	105.10	92.39
	202.20	194.70	267.30	148.70	137.10	133.60	132.80	166.60	162.10	117.60	107.90	91.70
	214.00	217.90	201.70	147.50	140.20	126.00	148.10	149.70	146.70	96.01	107.00	92.84
	203.80	227.10	194.10	169.10	141.50	135.10	146.60	156.80	146.30	106.00	103.20	87.33
	209.90	220.40	242.30	154.10	158.70	137.90	151.10	166.10	161.30	101.00	110.70	95.68
	205.70	202.40	230.50	169.20	133.70	151.60	139.50	162.80	147.90	96.27	107.50	98.18
	213.80	243.70	256.10	161.40	150.30	143.00	147.70	169.20	160.00	111.70	108.00	96.75
212.60	236.50	192.30	149.30	163.50	137.80	150.10	158.60	157.30	114.80	105.00	86.49	
2	223.40	228.20	220.20	136.30	138.70	130.10	141.60	165.80	153.40	105.80	112.40	104.60
	225.70	218.70	213.30	128.60	136.80	120.60	152.40	147.50	150.60	112.60	97.88	103.30
	233.00	225.90	213.00	133.00	129.30	117.30	142.00	165.20	155.80	113.90	110.90	96.43
	218.10	227.30	212.90	121.20	133.80	110.45	161.70	172.10	143.40	132.40	99.61	100.20
	217.50	219.10	210.20	129.10	147.10	114.20	152.60	160.70	157.50	113.30	102.10	104.60
	218.10	221.10	217.70	131.10	136.40	132.80	156.60	162.80	169.90	118.10	109.40	100.00
	225.10	217.30	215.60	144.50	135.00	116.20	140.20	189.70	157.40	114.70	106.10	102.70
	223.80	207.30	209.80	147.60	133.80	128.00	147.70	170.80	151.50	106.80	106.50	103.40
219.50	213.20	213.10	146.80	131.60	119.90	160.20	166.10	167.10	111.90	110.60	104.80	
3	213.00	218.30	207.10	167.70	128.60	137.50	152.10	155.20	190.10	117.30	118.10	92.91
	209.90	212.20	214.00	157.60	136.00	126.70	149.50	149.70	210.30	109.40	117.20	106.60
	213.70	216.10	206.70	161.50	144.30	132.60	149.60	152.00	196.10	118.40	121.80	107.00
	217.20	220.30	213.10	145.70	137.20	128.50	150.80	159.00	182.70	113.90	115.60	102.40
	212.60	217.50	193.20	154.00	135.70	125.70	153.70	151.10	193.30	106.70	113.40	99.63
	203.70	215.80	208.00	149.60	144.00	131.70	146.20	150.90	209.40	114.40	114.50	107.60
	218.50	218.50	215.10	159.80	153.70	126.30	142.00	150.60	190.00	109.40	114.20	114.30
	208.80	214.80	206.40	149.30	136.10	116.30	142.10	141.90	187.40	106.10	138.30	103.90
208.00	197.10	205.60	152.50	137.70	127.30	152.80	143.80	191.60	122.50	124.20	105.40	
Media	213.9	218.5	216.1	149.9	140.9	129.7	148.4	158.9	168.5	111.7	110.9	99.9
S.D.	8.1	10.5	18.2	15.1	9.3	11.1	6.6	10.5	20.3	7.9	8.3	6.6

S.D.: Desviación estándar

ANEXOS

Tabla 26. Estabilidad: tamaño de partícula, muestras expuestas a la iluminación total (Fotoestabilidad) n=3

Sistema	CLT80-Cur			CLP407 -Cur			PLT80-Cur			PLP407-Cur		
	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección
1	201.10	177.70	184.30	191.00	133.10	148.50	143.40	147.10	150.20	119.90	100.10	94.62
	203.10	183.10	189.10	141.30	144.00	136.20	155.00	141.10	153.50	103.80	94.97	113.10
	202.20	177.50	196.50	148.70	113.80	120.60	132.80	147.50	154.50	117.60	104.60	115.80
	214.00	179.60	166.50	147.50	148.50	142.30	148.10	149.60	151.20	96.01	108.20	90.99
	203.80	162.00	184.70	169.10	152.30	146.00	146.60	149.00	154.60	106.00	114.50	104.50
	209.90	176.00	167.40	154.10	141.40	136.50	151.10	152.50	149.70	101.00	100.40	103.30
	205.70	169.40	187.90	169.20	145.90	134.10	139.50	142.30	158.40	96.27	99.74	100.80
	213.80	181.30	181.60	161.40	148.70	123.50	147.70	155.30	146.90	111.70	95.20	95.60
2	212.60	173.30	177.90	149.30	134.10	132.90	150.10	147.10	154.10	114.80	102.20	98.24
	223.40	205.80	220.20	136.30	117.50	122.70	141.60	155.00	143.90	105.80	128.80	100.30
	225.70	211.50	213.30	128.60	131.90	125.20	152.40	153.00	152.30	112.60	121.90	107.60
	233.00	200.20	213.00	133.00	129.50	118.10	142.00	148.20	159.90	113.90	106.60	114.60
	218.10	213.50	212.90	121.20	121.30	121.80	161.70	156.50	157.70	132.40	102.70	110.30
	217.50	211.70	210.20	129.10	124.40	135.60	152.60	151.60	147.10	113.30	113.30	107.00
	218.10	211.80	217.70	131.10	124.40	124.70	156.60	148.00	148.60	118.10	125.40	110.30
	225.10	208.80	215.60	144.50	129.40	118.40	140.20	155.50	161.00	114.70	113.70	111.10
3	223.80	209.50	209.80	147.60	125.00	111.40	147.70	152.90	146.70	106.80	107.40	112.80
	219.50	205.80	213.10	146.80	125.80	126.90	160.20	150.30	147.80	111.90	98.67	106.30
	213.00	204.20	202.20	167.70	113.90	122.90	152.10	141.70	137.10	117.30	95.65	96.13
	209.90	200.70	200.20	157.60	122.60	132.40	149.50	142.90	151.20	109.40	102.50	103.70
	213.70	201.20	205.10	161.50	130.60	134.80	149.60	154.00	149.50	118.40	118.60	136.00
	217.20	210.80	213.00	145.70	138.70	131.80	150.80	142.00	155.10	113.90	121.20	143.20
	212.60	194.50	198.40	154.00	128.40	132.60	153.70	146.90	145.80	106.70	120.70	95.36
	203.70	204.90	206.70	149.60	128.90	126.00	146.20	142.70	150.90	114.40	132.60	131.90
Media	213.9	195.7	199.2	149.9	131.0	129.4	148.4	148.7	150.9	111.7	110.4	113.3
S.D.	8.1	15.5	15.3	15.1	10.7	8.6	6.6	4.6	5.3	7.9	10.9	18.8

S.D.: Desviación estándar

ANEXOS

Tabla 27. Estabilidad: potencial Z, muestras protegidas de la iluminación (5 °C y 25 °C durante 3 meses) n=3

Sistema	CLT80-Cur			CLP407 -Cur			PLT80-Cur			PLP407-Cur		
	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C
1	-15.4	-18.4	-14.0	-7.0	-15.0	-8.2	-14.7	-22.5	-24.8	-3.1	-16.7	-12.9
	-16.2	-17.1	-13.9	-6.3	-15.4	-9.7	-14.9	-23.6	-25.4	-3.6	-17.0	-11.4
	-17.0	-16.9	-14.0	-6.5	-14.1	-9.6	-14.2	-21.0	-25.5	-3.7	-17.2	-12.4
	-15.0	-16.4	-23.0	-6.1	-17.2	-9.6	-14.2	-24.2	-26.2	-5.1	-16.8	-11.8
	-15.0	-18.4	-22.0	-6.5	-14.8	-9.1	-15.3	-21.4	-24.3	-4.9	-17.5	-10.5
	-16.3	-16.6	-18.0	-7.4	-15.4	-9.6	-14.8	-22.7	-25.1	-4.6	-18.5	-10.2
	-15.4	-20.8	-14.2	-6.9	-14.3	-9.5	-14.4	-23.2	-25.9	-3.8	-16.8	-10.1
	-15.3	-16.1	-13.0	-7.2	-16.9	-11.1	-14.5	-23.9	-25.4	-4.0	-19.2	-10.9
2	-15.7	-16.2	-14.0	-6.8	-14.6	-8.6	-14.4	-23.6	-24.8	-4.4	-19.4	-11.6
	-14.8	-19.3	-13.1	-8.2	-15.1	-10.2	-15.2	-19.3	-18.6	-4.3	-16.1	-11.6
	-15.7	-19.9	-13.0	-8.2	-12.9	-8.8	-16.8	-21.7	-20.7	-3.9	-16.8	-10.2
	-15.6	-19.5	-13.7	-9.3	-13.2	-9.7	-16.8	-23.6	-19.0	-4.4	-18.7	-10.9
	-14.7	-21.1	-13.7	-6.9	-14.4	-12.0	-15.1	-22.0	-19.0	-3.4	-15.9	-16.2
	-16.5	-19.6	-13.2	-6.8	-13.6	-15.7	-15.2	-22.2	-17.9	-3.7	-17.4	-20.9
	-15.6	-19.4	-14.3	-6.9	-15.2	-11.8	-15.1	-23.4	-20.2	-4.1	-16.2	-13.8
	-15.8	-19.2	-13.3	-8.1	-14.7	-14.8	-13.6	-21.5	-19.9	-4.0	-16.9	-15.9
3	-14.9	-20.7	-12.6	-8.8	-14.3	-8.4	-14.4	-22.8	-19.2	-4.0	-16.4	-19.0
	-16.1	-19.8	-13.5	-7.1	-15.5	-9.3	-15.0	-24.2	-19.5	-3.7	-16.7	-15.1
	-15.0	-22.5	-19.3	-6.0	-10.4	-6.9	-14.1	-21.2	-18.0	-3.8	-19.1	-13.7
	-15.1	-22.1	-19.7	-5.8	-10.9	-5.5	-14.8	-20.5	-17.4	-4.6	-20.9	-15.4
	-15.3	-22.2	-19.2	-7.4	-11.1	-5.1	-15.5	-23.5	-18.3	-5.1	-18.8	-14.8
	-15.0	-22.5	-19.7	-6.6	-11.8	-5.9	-13.6	-23.1	-18.0	-6.1	-18.9	-12.4
	-14.1	-23.7	-19.0	-6.9	-10.7	-5.2	-13.5	-24.2	-18.6	-3.6	-20.7	-13.2
	-15.9	-22.4	-19.9	-8.1	-12.1	-6.0	-13.7	-25.9	-19.9	-3.8	-19.7	-12.1
Media	-15.6	-22.4	-20.7	-6.8	-9.9	-8.6	-13.5	-25.1	-18.4	-3.7	-14.2	-11.9
	-16.0	-23.0	-20.1	-7.2	-9.4	-8.6	-14.5	-21.8	-18.2	-4.0	-14.2	-17.4
	-15.2	-22.6	-20.3	-7.9	-10.5	-9.0	-13.6	-20.1	-18.5	-3.5	-16.9	-17.0
Media	-15.5	-20.0	-16.5	-7.2	-13.5	-9.1	-14.6	-22.7	-21.0	-4.1	-17.5	-13.5
S.D.	0.6	2.4	3.4	0.9	2.2	2.6	0.9	1.5	3.2	0.6	1.7	2.9

S.D.: Desviación estándar

ANEXOS

Tabla 28. Estabilidad: potencial Z, muestras expuestas a la iluminación Total (Fotoestabilidad) n=3

Sistema	CLT80-Cur			CLP407 -Cur			PLT80-Cur			PLP407-Cur		
	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección
1	-15.4	-14.7	-15.5	-7.0	-6.3	-7.4	-14.7	-16.7	-13.6	-3.1	-5.5	-3.7
	-16.2	-15.6	-14.9	-6.3	-5.7	-6.2	-14.9	-15.7	-13.1	-3.6	-6.7	-4.5
	-17.0	-15.7	-15.3	-6.5	-6.4	-6.0	-14.2	-16.0	-14.1	-3.7	-6.2	-4.2
	-15.0	-15.0	-14.8	-6.1	-6.0	-6.6	-14.2	-17.3	-13.5	-5.1	-6.5	-4.4
	-15.0	-15.8	-15.2	-6.5	-6.3	-4.2	-15.3	-17.1	-14.1	-4.9	-5.9	-4.0
	-16.3	-14.9	-15.6	-7.4	-6.7	-6.2	-14.8	-16.3	-14.2	-4.6	-6.2	-4.3
	-15.4	-15.3	-15.0	-6.9	-6.2	-5.9	-14.4	-17.9	-13.4	-3.8	-5.4	-4.2
2	-15.3	-15.4	-15.4	-7.2	-6.9	-5.9	-14.5	-17.2	-13.9	-4.0	-4.9	-4.1
	-15.7	-15.6	-16.3	-6.8	-5.7	-5.6	-14.4	-17.8	-13.9	-4.4	-5.9	-3.7
	-14.8	-14.5	-15.3	-8.2	-6.2	-5.4	-15.2	-17.2	-13.9	-4.3	-6.6	-4.7
	-15.7	-14.8	-14.9	-8.2	-6.1	-6.4	-16.8	-16.8	-15.1	-3.9	-6.5	-4.3
	-15.6	-15.3	-15.3	-9.3	-6.2	-6.0	-16.8	-17.6	-14.4	-4.4	-6.2	-4.5
	-14.7	-14.8	-15.1	-6.9	-5.7	-5.9	-15.1	-17.3	-13.6	-3.4	-5.8	-4.4
	-16.5	-15.1	-15.4	-6.8	-5.6	-6.9	-15.2	-17.7	-13.9	-3.7	-5.9	-5.1
3	-15.6	-15.1	-15.6	-6.9	-5.7	-5.9	-15.1	-18.1	-14.9	-4.1	-5.2	-5.3
	-15.8	-15.2	-15.6	-8.1	-6.4	-6.1	-13.6	-18.9	-14.0	-4.0	-5.4	-4.7
	-14.9	-15.0	-14.8	-8.8	-6.0	-5.9	-14.4	-19.2	-14.0	-4.0	-5.6	-4.4
	-16.1	-14.8	-15.6	-7.1	-6.4	-5.2	-15.0	-19.8	-14.5	-3.7	-5.3	-4.3
	-15.0	-14.3	-15.6	-6.0	-7.9	-6.6	-14.1	-17.1	-14.6	-3.8	-5.7	-4.8
	-15.1	-16.3	-15.3	-5.8	-6.6	-4.9	-14.8	-17.8	-14.8	-4.6	-4.7	-4.4
	-15.3	-13.8	-14.9	-7.4	-6.0	-4.6	-15.5	-17.4	-14.2	-5.1	-5.8	-4.3
Media	-15.0	-14.1	-14.4	-6.6	-5.6	-5.8	-13.6	-17.7	-14.2	-6.1	-5.2	-4.4
	-14.1	-14.7	-14.9	-6.9	-6.5	-6.3	-13.5	-17.0	-14.9	-3.6	-5.1	-4.6
	-15.9	-14.9	-15.0	-8.1	-4.8	-6.9	-13.7	-17.0	-14.7	-3.8	-5.2	-4.4
	-15.6	-12.5	-14.6	-6.8	-5.7	-5.9	-13.5	-18.0	-14.7	-3.7	-4.8	-4.6
	-16.0	-14.7	-14.6	-7.2	-6.1	-6.0	-14.5	-17.7	-14.2	-4.0	-5.0	-4.6
	-15.2	-15.1	-15.5	-7.9	-6.3	-5.8	-13.6	-18.1	-14.4	-3.5	-5.3	-4.2
	Media	-15.5	-14.9	-15.2	-7.2	-6.1	-5.9	-14.6	-17.5	-14.2	-4.1	-5.6
S.D.	0.6	0.7	0.4	0.9	0.6	0.7	0.9	0.9	0.5	0.6	0.6	0.3

S.D.: Desviación estándar

Tabla 29. Estabilidad: porcentaje de la cantidad de curcuminoides, muestras protegidas de la iluminación (5 °C y 25 °C durante 3 meses) n=3

Sistema	CLT80-Cur			CLP407 -Cur			PLT80-Cur			PLP407-Cur		
	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C
	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)
1	1.92	90.12	85.55	1.81	103.35	99.49	1.85	103.11	100.80	1.98	93.01	101.16
2	1.59	83.11	91.86	1.85	103.63	100.58	1.84	101.22	91.14	2.02	96.07	97.61
3	1.64	83.96	76.01	1.85	96.49	96.42	1.85	102.55	99.56	2.00	95.58	97.72
Media	1.72	85.7	84.5	1.84	101.2	98.8	1.85	102.3	97.2	2.00	94.9	98.8
S.D.	0.18	3.8	8.0	0.02	4.0	2.2	0.01	1.0	5.3	0.02	1.6	2.0
Sistema	Solución de curcuminoides											
	Inicial	5 °C	25 °C									
	(µg)	(%)	(%)									
1	1.97	82.03	46.70									
2	2.01	85.95	45.47									
3	1.94	86.14	50.27									
Media	1.97	84.7	47.5									
S.D.	0.04	2.3	2.5									

S.D.: Desviación estándar

Tabla 30. Estabilidad: porcentaje de la cantidad de curcuminoides, muestras expuestas a la iluminación Total (Fotoestabilidad) n=3

Sistema	CLT80-Cur			CLP407 -Cur			PLT80-Cur			PLP407-Cur		
	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección
	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)
1	1.92	97.15	4.14	1.81	100.60	6.90	1.85	98.87	5.61	1.98	95.61	6.33
2	1.59	89.34	5.02	1.85	100.30	5.66	1.84	98.53	4.38	2.02	94.96	7.32
3	1.64	86.87	5.79	1.85	98.15	4.61	1.85	97.38	5.97	2.00	97.21	6.14
Media	1.72	91.1	5.0	1.84	99.7	5.7	1.85	98.3	5.3	2.00	95.9	6.6
S.D.	0.18	5.4	0.8	0.02	1.3	1.1	0.01	0.8	0.8	0.02	1.2	0.6
Sistema	Solución de curcuminoides											
	Inicial	Con protección	Sin protección									
	(µg)	(%)	(%)									
1	1.97	74.71	12.00									
2	2.01	80.65	16.66									
3	1.94	83.06	22.25									
Media	1.97	79.5	17.0									
S.D.	0.04	4.3	5.1									

S.D.: Desviación estándar

ANEXOS

Tabla 31. Estabilidad: porcentaje de inhibición, muestras protegidas de la iluminación (5°C y 25°C durante 3 meses) n=3

Sistema	CLT80-Cur			CLP407 -Cur			PLT80-Cur			PLP407-Cur		
	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	5 °C	25 °C
	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)
1	58.97	85.4	86.1	58.47	96.1	90.8	55.10	90.7	96.8	55.7	101.6	99.0
	57.51	98.2	85.6	59.30	94.7	82.1	57.64	89.1	98.2	53.1	98.3	92.0
	59.36	93.5	85.2	60.04	96.3	86.6	60.35	89.0	95.6	58.8	95.6	88.5
2	60.32	102.9	93.3	62.79	101.5	87.3	60.43	96.0	102.4	58.8	102.1	107.0
	60.16	97.7	93.7	62.08	96.6	90.4	61.99	93.3	98.2	60.6	106.4	109.9
	64.88	99.3	93.6	55.47	100.1	88.0	62.85	97.2	92.1	60.8	107.8	108.4
3	64.89	103.6	95.6	62.18	94.2	99.0	60.47	97.2	85.8	60.2	102.5	118.6
	62.66	98.4	95.9	61.63	93.5	101.3	61.87	97.4	76.9	61.4	107.0	106.8
	62.97	93.6	98.7	63.60	104.7	98.7	60.42	96.9	77.0	56.7	108.8	107.4
Media	61.3	97.0	92.0	60.6	97.5	91.6	60.1	94.1	91.5	58.4	103.3	104.2
S.D.	2.6	5.5	5.0	2.6	3.8	6.6	2.4	3.6	9.4	2.8	4.5	9.4

S.D.: Desviación estándar

Tabla 32. Estabilidad: porcentaje de inhibición, muestras expuestas a la iluminación Total (Fotoestabilidad) n=3

Sistema	CLT80-Cur			CLP407 -Cur			PLT80-Cur			PLP407-Cur		
	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección	Inicial	Con protección	Sin protección
	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)
1	58.97	87.1	75.2	58.5	87.6	88.0	55.1	94.3	73.5	55.7	96.1	74.7
	57.51	88.3	77.5	59.3	90.0	80.8	57.6	101.6	76.1	53.1	94.2	61.2
	59.36	93.8	76.6	60.0	86.7	74.9	60.3	94.9	78.7	58.8	94.9	76.1
2	60.32	106.2	85.5	62.8	92.1	71.8	60.4	97.2	83.0	58.8	95.7	80.9
	60.16	97.7	83.3	62.1	92.7	73.4	62.0	97.2	86.7	60.6	97.5	81.0
	64.88	105.0	88.1	55.5	94.3	74.2	62.9	94.9	88.9	60.8	98.4	83.9
3	64.89	103.6	84.5	62.2	104.1	91.2	60.5	98.9	90.0	60.2	100.5	74.7
	62.66	106.8	83.0	61.6	106.2	87.1	61.9	101.0	89.1	61.4	104.9	87.5
	62.97	108.9	85.0	63.6	107.2	98.4	60.4	103.8	87.8	56.7	104.9	86.7
Media	61.3	99.7	82.1	60.6	95.7	82.2	60.1	98.2	83.8	58.4	98.6	78.5
S.D.	2.6	8.3	4.5	2.6	8.0	9.4	2.4	3.4	6.2	2.8	4.1	8.1

S.D.: Desviación estándar

Tabla 33. Estabilidad: porcentaje de inhibición, solución de curcuminoides protegidos de la iluminación (5 °C y 25 °C durante 3 meses) y expuestos a la iluminación Total (Fotoestabilidad) n=3

Sistema	Inicial	5 °C	25 °C	Inicial	Con protección	Sin protección
	(µg)	(%)	(%)	(µg)	(%)	(%)
1	61.0	60.2	58.0	61.0	96.0	99.9
	58.5	57.5	51.3	58.5	90.6	105.1
	59.7	59.2	59.1	59.7	94.8	108.1
2	58.3	61.5	57.9	58.3	102.0	105.2
	59.5	63.9	52.0	59.5	102.5	109.3
	62.4	67.5	57.9	62.4	102.2	113.3
3	57.8	66.8	52.0	57.8	101.6	122.0
	63.5	64.9	58.9	63.5	99.6	113.0
	59.3	68.1	56.8	59.3	103.5	109.2
Media	60.0	63.3	56.0	60.0	99.2	109.5
S.D.	1.9	3.9	3.3	1.9	4.4	6.3

S.D.: Desviación estándar

Anexo VI. Curvas de calibración

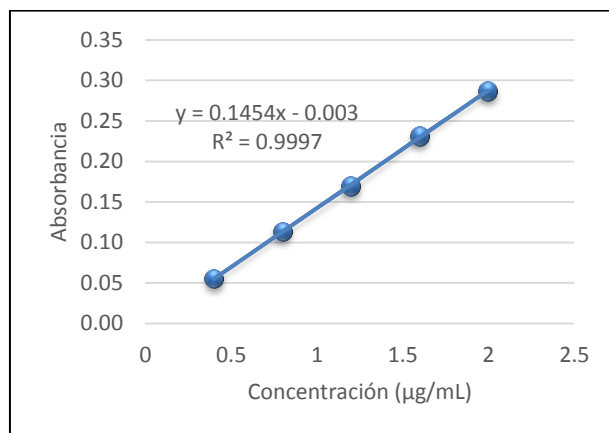


Figura 32. Curva analítica de calibración de curcuminoides, usando como medio de disolución etanol. La lectura se registró a 424.5 nm. Intervalo de concentración de 0.4 µg/mL a 2.0 µg/mL, por triplicado a partir de una solución stock.

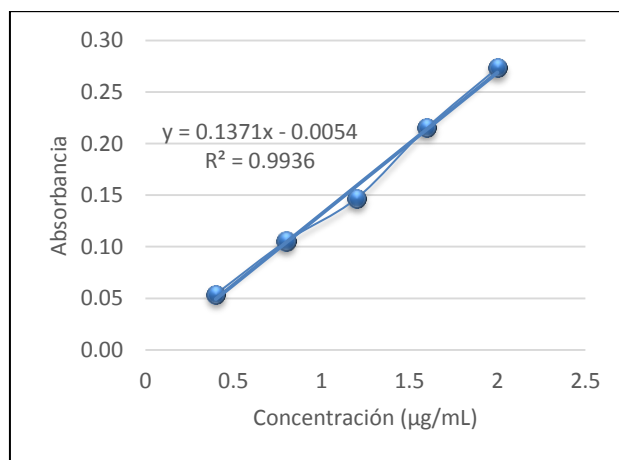


Figura 33. Curva analítica de calibración de curcuminoides, usando como medio disolución Etanol:Agua (1:1 v/v). La lectura se registró a 428 nm. Intervalo de cuantificación de 0.4 µg/mL a 2.0 µg/mL, por triplicado a partir de una solución stock.

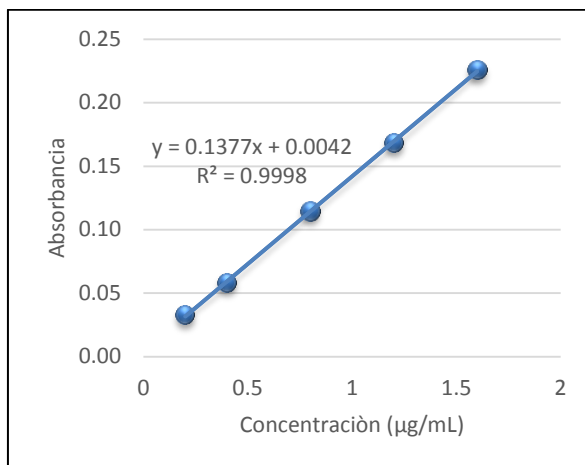


Figura 34. Curva analítica de calibración de curcuminoides, usando como medio disolución Etanol:Agua (1:1: v/v) en contacto con piel de oreja de cerdo durante 24 horas, transcurrido el tiempo se filtró (0.45 µm). La lectura se registró a 430 nm. Intervalo de cuantificación de 0.2 µg/mL a 1.6 µg/mL, por triplicado a partir de una solución stock.

Tabla 34. Parámetros de las curvas de calibración de curcuminoides

Parámetros	Especificación	Solución Etanol	Solución Etanol - Agua	Solución Etanol - Agua - Piel
Linealidad	$r^2 \geq 0.9800$	0.9997	0.9936	0.9998
Exactitud	RT= 97- 103 %; CV ≤ 3 %	99%; CV= 2.2	98%; CV=1.2	101%; CV= 0.7
Repetibilidad	CV ≤ 3 %	CV ₁ = 1.88 CV ₂ = 1.30 CV ₃ = 1.33	CV ₁ = 2.61 CV ₂ = 1.66 CV ₃ = 0.89	CV ₁ = 3.05 CV ₂ = 2.43 CV ₃ = 0.35
Limite Cuantificación		0.04 µg / mL	0.01µg / mL	0.05 µg / mL
Limite Detección		0.01 µg / mL	0.004 µg / mL	0.02 µg / mL

El límite de cuantificación (LC) y el límite de detección (LD) se determinaron por medio de las siguientes formulas:

$$LC = \frac{(Desv. est.) * 10}{\xi} ; \quad LD = \frac{(Desv. est.) * 3.3}{\xi}$$

Anexo VII. Publicación

European Journal of Pharmaceutical Sciences 155 (2020) 105533



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Nanostructured lipid carriers loaded with curcuminoids: Physicochemical characterization, *in vitro* release, *ex vivo* skin penetration, stability and antioxidant activity



M.A. Espinosa-Olivares^a, N.L. Delgado-Buenrostro^b, Y.I. Chirino^b, M.A. Trejo-Márquez^c,
S. Pascual-Bustamante^c, A. Ganem-Rondero^{a,*}

^a División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1o de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54740, Estado de México, Mexico

^b Laboratorio 10, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala, Tlalnequatlán, C.P. 54090, Estado de México, Mexico

^c Laboratorio de Postcosecha de Productos Vegetales, Centro de Asimilación Tecnológica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Jiménez Cantú s/n, San Juan Atlámica, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54729, Estado de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Curcuminoids
Antioxidant activity
Nanostructured lipid carriers
Skin penetration
Stability

ABSTRACT

Four formulations of nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with curcuminoids were prepared, testing two types of solid lipids (Compritol® 888 ATO and Precirol® ATO 5) and two kinds of stabilizers (poloxamer 407 and polysorbate 80). Particle size values between 111 and 214 nm and polydispersity indices < 0.3 were registered, with low Z potential values due to the nonionic character of the stabilizers. The results showed that the type of surfactant had an impact on the *in vitro* release rate and on the *ex vivo* skin permeation capability of curcuminoids. Polysorbate 80 delayed the release, but favors the transport of a higher amount of curcuminoids to the receptor solution during the *ex vivo* permeation studies than the systems with poloxamer 407. Confocal microscopy confirmed that all systems favored the penetration of curcuminoids to deeper layers of the skin and in a greater amount than curcuminoids in solution. Exposure of the systems to intense radiation caused the degradation of curcuminoids, without loss of antioxidant activity, confirming that the degradation products also function as antioxidants. The NLC prepared can be valuable carriers to enhance the penetration of curcuminoids into the skin, to treat different disorders and skin diseases.

1. Introduction

A large number of diseases are attributed to oxidative stress (Baek and Lee, 2016). However, the generation of free radicals occurs not only by exposure to various environmental factors but also as a result of the body's own metabolic processes (Edwin, 2016; Lu et al., 2019; Giraud et al., 2019). In recent years, food, nutritional supplements and medications with antioxidant activity have gained great relevance, among them curcuminoids, because of their recognized antioxidant and anti-inflammatory activities (Hussain et al., 2017b; Jordan et al., 2016). These compounds act primarily by trapping free radicals (reactive oxygen and nitrogen species), improving the performance of enzymes with free radicals scavenging activity (e.g., glutathione peroxidase), and inhibiting the effect of enzymes capable of generating free radicals (e.g., xanthine oxidase/hydrogenase) (Rafiee et al., 2019).

In the case of skin, numerous efforts have been made to prevent or treat various conditions (e.g., skin tumors, skin aging, and different cutaneous diseases) that result from the presence of free radicals (Baek and Lee, 2016; Hussain et al., 2017a; Thangapazham et al., 2007; Abrahams et al., 2019). Topical delivery is the method of choice to treat skin diseases because of the possibility of circumventing the first-pass metabolism, maintaining a concentration of drug at the site of action for long periods and reducing the systemic side effects (as compared to oral and parenteral administration) (Khosa et al., 2018). However, the direct application of curcuminoids to the skin is restricted by various factors such as their low water solubility, instability (e.g., photo-degradation and chemical instability), and the natural barrier that represents the stratum corneum. Therefore, to improve their penetration into the skin, both physical and chemical absorption enhancers have been used, as well as the formulation in nanocarriers (Hussain et al., 2017b; Rafiee et al., 2019; Chen et al., 2016). Among them, solid lipid

* Corresponding author.

E-mail address: ganemq@hotmail.com (A. Ganem-Rondero).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105533>

Received 10 April 2020; Received in revised form 31 July 2020; Accepted 25 August 2020

Available online 29 August 2020

0928-0987/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) have been developed as alternative release systems to emulsions, liposomes and polymeric nanoparticles, attracting the attention of various research groups because of the biocompatibility, ease of preparation, cost-benefit, and the possibility of being produced on a large scale. NLC have shown better characteristics than SLN due to their less organized structure, composed of a mixture of solid and liquid lipids, which allows enhancing drug loading and prevents drug leaching out during storage (Khosa et al., 2018). Furthermore, NLC have received particular attention due to the possibility of achieving prolonged release and because they can act as absorption enhancers (Pardeike et al., 2009). Several authors have formulated curcuminoids in NLC, finding promising results in relation to free drug. For example, Chen et al. (2016), formulated and characterized NLC and NLC-gel loaded with curcumin, demonstrating a significant anti-inflammatory effect in mice auricle edema; Aditya et al. (2013) formulated curcumin and/or genistein in NLC, improving the stability in simulated gastric and intestinal media and increasing the growth inhibition of prostate cancer cells and Rashidzadeh et al. (2019) reported promising results with curcumin-loaded NLC for the treatment of malaria. With this in mind, this work focuses on the preparation and characterization of NLC loaded with curcuminoids, with the aim of promoting their penetration and ensuring their antioxidant action when administered to the skin, thereby helping to counteract the problems that result from the presence of free radicals.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Curcuminoids were purchased from Sigma-Aldrich as curcumin from *Curcuma longa* (Turmeric) with a purity of 81% (St. Louis, MO, USA). Solid lipids: Compritol® 888 ATO (Glyceryl dibehenate), Precirol® ATO 5 (Glyceryl distearate), Labrafil® M 2130 CS (Lauroyl polyoxyl-6 glycerides), Gelot™ 64 (Mono and Diglycerides and Polyoxyl stearate), Apifil® (Peg-8 beeswax), Gelucire® 44/14 (Lauroyl Polyoxyl-32 glycerides) and Suppocire® AP (Saturated polyglycolysed glycerides) from Gattefossé (France) were kindly donated by Lyontec (Mexico). Soya lecithin was provided by Reactivos Química Meyer (Mexico), and stearic acid by Merck (USA). Liquid lipids: Labrafac™ Lipophile WL 1349 (Medium chain triglycerides), Labrasol® (Caprylocaproyl Polyoxyl-8 glycerides), Lauroglycol™ FCC (Propylene glycol monolaurate, type I) and Capryol™ 90 (Propylene glycol monocaprylate, type II) from Gattefossé (France) were provided by Lyontec (Mexico). Isopropyl myristate and caprylic/capric triglycerides were purchased in Droguería Cosmopolita (Mexico), and glycerin was provided by La Corona Soap Factory (Mexico). Surfactants: Pluronic® F-68 (Poloxamer 188) and Pluronic® F-127 (Poloxamer 407) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Tween® 80 (Polysorbate 80) was Corona Soap Factory (Mexico). Surfactants: Pluronic® F-68 (Poloxamer 188) and Pluronic® F-127 (Poloxamer 407) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Tween® 80 (Polysorbate 80) was purchased from Hycel de México. For confocal microscopy the following materials were used: Bovine serum albumin pH 7.0 ≥ 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Triton® X-100 (USB™, USA), anhydrous glycerol (J.T. Baker, Mexico), Hoechst 33,342 (Thermo Scientific, Germany), In vitrogen® molecular Probes® Rhodamine Phalloidin TRITC (Thermo Fisher Scientific, USA) and sodium chloride (Fermont, Mexico). Water was obtained from a Milli-Q® system (Millipore® Corp., MA; USA). For antioxidant activity the following materials were used: ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) ammonium salt, was purchased from Roche diagnostic (Germany); potassium persulfate, acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and sodium phosphate monobasic ≥ 99.0% from J.T. Baker (Mexico). All the reagents were of analytical grade and were used without further purification.

2.2. Preparation of nanostructured lipid carriers (NLC) containing curcuminoids

To select the lipids used in the preparation of the NLC, the solubility of the curcuminoids was tested in each of the solid lipids and liquid lipids mentioned in the list of materials, at 75 °C, under constant stirring. This test was qualitative, observing the presence or absence of the undissolved drug. With the lipids in which the curcuminoids were soluble, binary mixtures of solid lipid:liquid lipid in proportion 85:15 were prepared (this proportion was chosen according to previous experiences) (López and Ganem, 2015), determining the solubility of curcuminoids. The results of the solubility tests are shown in the supplementary material of this article.

After this screening, a serie of NLC systems were prepared according to a 2³ factorial design, by the high shear homogenization method. Briefly, the process consisted in preparing an oil phase (the mixture of solid lipid:liquid lipid 85:15 and curcuminoids), and an aqueous phase (surfactant in water 1% w/v). Each phase was heated at 75 °C in a water bath, under magnetic stirring for 15 min. The colloidal dispersion was produced by pouring the aqueous solution into the oil phase, stirring at 15,000 rpm for 5 min at 75 °C using an Ultra Turrax® T18 Basic (IKA®, Germany), pre-heating the tool to 75 °C. Finally, the NLC solidified by cooling the colloidal dispersion in a water bath at 2 °C for 15 min.

The following factors were considered for the experimental design: type of solid lipid (Compritol® 888ATO and Precirol® ATO 5), type of surfactant (Pluronic® F-127 and Tween® 80), and surfactant concentration (1 and 3% w/v). Labrasol® was selected as the liquid lipid for all systems. The particle size (PS) and the polydispersity index (PI) of these systems were determined using a Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments (Worcestershire, West Midlands, United Kingdom). The systems with the lowest PS and PI, as well as those remaining stable for at least one week (without significant changes in PS and PI), were selected for subsequent studies.

2.3. Characterization of NLC containing curcuminoids

The percentage of curcuminoids trapped into the lipid matrix (entrapment efficiency, EE) was determined as follows: a volume of 10 mL of the NLC dispersion was placed in a conical tube and was centrifuged at 12,000 rpm (Centrifuge Z326K, HERMLE, Germany) for 2 h at 10 °C. The supernatant (containing the NLC) and the sediment (free curcuminoids), were extracted separately and dissolved in ethyl alcohol. In both cases, the systems were vortexed (IKA®, Germany) for 10 min at 16,000 rpm to facilitate dissolution of curcuminoids and were filtered through a 0.45 µm membrane (Merck Millipore, Ltd). The content of curcuminoids was analyzed by UV spectrophotometry at 424.5 nm (Spectrophotometer U-5100, Hitachi, Japan).

The process efficiency (PE) was performed using placebos, following the method for EE until the point of centrifugation and separation of supernatant and sediment. Both fractions were lyophilized (Lyophilizer,

The process efficiency (PE) was performed using placebos, following the method for EE until the point of centrifugation and separation of supernatant and sediment. Both fractions were lyophilized (Lyophilizer, Labconco freeZone 2.5, United States) and weighed separately.

All determinations were carried out in triplicate at 25 °C. The percentage of entrapment efficiency (%EE), process efficiency (%PE) and loading capacity (LC) were calculated using Eqs. (1), (2) and (3), respectively:

$$\%EE = \left(\frac{W_{drug\ NLC}}{W_{total\ drug}} \right) 100 \quad (1)$$

$$\%PE = \left(\frac{W_{NLC\ placebo}}{W_{total\ solids}} \right) 100 \quad (2)$$

$$LC = \frac{W_{drug\ NLC}}{(W_{total\ solids})(xPE)} \quad (3)$$

where $W_{drug\ NLC}$ is the amount of curcuminoids loaded in the NLC; $W_{total\ drug}$ is the amount of curcuminoids originally added to prepare de NLC; $W_{NLC\ placebo}$ is the amount of lipids transformed into NLC; $W_{total\ solids}$ is the amount of total lipid plus surfactant added to prepare the NLC; χ_{PE} is the fraction of process efficiency. To ensure that 100% of curcuminoids were recovered, the same quantification method was performed using loaded placebos.

The particle size (PS), polydispersity index (PI) and zeta potential (Z) of the nanoparticle systems were determined using a Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments (Worcestershire, West Midlands, United Kingdom) at 25 °C with a detection angle of 90 °C. The analysis was carried out by diluting 145 μ L of the sample with 1.2 mL of distilled water. All samples were analyzed in triplicate, calculating the average value \pm SD.

NLC were examined using a transmission electron microscope (JEM-1010, JEOL, USA). A drop of the NLC dispersion was applied over a copper grid, and was coated with Formvar for 2 min to form a thin film. To improve the contrast, the film was stained with a drop of phosphotungstic acid (1% w/v) removing the excess with a filter paper, allowing the grid to dry at room temperature for analysis.

2.4. In vitro release of curcuminoids from NLC

The *in vitro* release rate of curcuminoids from NLC was followed for 24 h by the dialysis method, evaluating the four systems shown in Table 1: CLT80-Cur, CLP407-Cur, PLT80-Cur, PLP407-Cur, and a curcuminoid solution in ethanol: water (1:1 v/v) as a reference. The determination was carried out using a dialysis membrane 10 cm long with a MW cutoff of 6–8 kDa (dialysis tube Spectrum Laboratories, Inc., Switzerland). In all cases, either for NLC or for the solution, an amount equivalent to 50 μ g of curcuminoids was placed in the dialysis bags. The dialysis bags were immersed in closed containers with the release medium consisting of 25 mL of ethanol-water (1:1), which was maintained at 37 °C in a water bath, under constant stirring, using a multi-stirrer IKA-WERKE (model RO-15, Germany). At defined time intervals, 2 mL of the receptor medium were withdrawn, replacing them immediately with an equal volume of fresh medium at 37 °C. The samples taken were filtered through 0.45 μ m membranes (Merck Millipore, Ltd, USA). The concentration of drug was determined by spectrophotometry, using a spectrophotometer HITACHI (model U-5100, Japan) at 428 nm. The experiment was carried out in triplicate. The *in vitro* release data were fitted to different mathematical models such as zero order, first order, Higuchi, and Korsmeyer-Peppas. For this, DDSolver software was used, which provides a series of statistical criteria to evaluate the goodness of the fit to the models such as correlation coefficient (R^2), Akaike criterion (AIC), and the model selection criterion (MSC).

2.5. Ex vivo permeation of curcuminoids through pigskin

Porcine ear skin and Franz diffusion cells were used for this study.

The pig's ear skin was removed from the cartilage without removing the hair and was stored at -20 °C until its use.

The thickness of the skin was made uniform to approximately 750 μ m, using a dermatome (Zimmer 901, USA). Once the skin was rinsed with physiological saline solution, it was clamped between the donor and the receptor compartment of the Franz cells, with the stratum corneum towards the donor compartment (diffusion area 0.78 cm²). The receiving medium was 2 mL of ethanol-water (1:1) maintained at 37 °C in a water bath, and under constant stirring during the whole experiment using a multi-stirrer IKA-WERKE (model RO-15, Germany). After reaching the bath temperature, 0.5 mL of curcuminoids formulated in the NLC dispersion at a concentration of 100 μ g/ml were placed into the donor compartment. The same volume of a solution of curcuminoids in ethanol:water (1:1 v/v) containing 100 μ g/mL was used as a reference. At regular time intervals (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 24 h) samples of the receptor medium (2 mL) were taken, replacing immediately the volume with fresh medium, previously heated at 37 °C. The samples were centrifuged at 12,000 rpm for 30 min (Centrifuge EBA 12 Hettich Zentrifugen, Germany) and the amount of curcuminoids in the receptor solution was determined by spectrophotometry, using a spectrophotometer HITACHI (model U-5100, Japan) at 430 nm. The experiment was carried out in sextuplicate. The flux and the permeability coefficient were calculated for all formulations and for the curcuminoid solution.

2.6. Penetration depth and distribution profile of curcuminoids in ex vivo skin by confocal laser scanning microscopy

The distribution pattern of curcuminoids in the skin was determined by confocal laser scanning microscopy. Once the permeation studies were completed, the excess of formulation was removed from the surface of the skin, rinsing the skin three times with 0.9% saline solution. Then, the skin samples were frozen and stored until analysis by confocal laser microscopy.

The analysis was carried out by the technique of specific fluorescence labeling. For this, the permeated area (0.78 cm²) was permeabilized with a 1% Triton X-100 solution in 0.9% saline solution for 20 min, at 37 °C in an MRC incubator (orbital shaker incubator, Germany) at 50 rpm with oscillatory movement. Then, it was blocked with a 1% albumin solution in 0.9% saline for 90 min, under the same incubation conditions. In order to establish the top and the bottom of the skin, the samples were incubated with a mixture of a solution of 10 μ g/ml of rhodamine-conjugated phalloidin and a solution 1:1000 of Hoechst in PBS. Finally, the samples were placed on a slide, adding one drop of glycerol - 0.9% saline solution (1:1 v/v) as a moisturizer, covering with a coverslip. Once the skin was sandwiched between the glass slide and the cover slip, images were obtained with an inverted laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP8, Germany), equipped with an argon laser, without any additional skin processing, fixation, or mechanical sectioning. The excitation and emission wavelengths used were 488 nm and 550 nm, respectively. Examination of the skin was

Table 1

Composition of nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with curcuminoids (Cur). The four formulations shown are those that were selected from the optimization tests. All systems contain Labrasol® (L).

Formulation	Drug (mg)	Solid lipids		Liquid lipid	Surfactant		Water (mL)
		Compritol® 888 ATO (g)	Precirol® ATO 5 (g)		Labrasol® (g)	Tween 80 (g)	
CLT80-Cur	5.0	0.850	–	0.150	0.5	–	50
CLP407-Cur	5.0	0.850	–	0.150	–	0.5	50
PLT80-Cur	5.0	–	0.850	0.150	0.5	–	50
PLP407-Cur	5.0	–	0.850	0.150	–	0.5	50

Tween 80 = Polysorbate 80, Pluronic F-127 = Poloxamer 407.

CLT80 = Compritol/Labrasol/Tween 80; CLP407 = Compritol/Labrasol/Poloxamer 407.

PLT80 = Precirol/Labrasol/Tween 80; PLP407 = Precirol/Labrasol/Poloxamer 407.

carried out using a numerical aperture of 20X/0.4, analyzing the images with the Leica Las X software. Each formulation was analyzed in triplicate with its respective placebo, and as a control, the curcuminoid solution.

2.7. Analytical methods for the quantification of curcuminoids

The amount of curcuminoids was determined by a UV spectrophotometric method using a Hitachi spectrophotometer (model U-5100, Japan). In all cases, calibration curves were prepared evaluating specificity, linearity, repeatability, and accuracy (Rapalli et al., 2020). The conditions in each case were the following:

- Determination of the amount loaded in the NLC.** Solvent: ethanol; concentration range: 0.4 µg/mL - 2.0 µg/mL. The reading was recorded at 424.5 nm.
- Quantification in the in vitro release studies.** Solvent: Ethanol:water (1:1); concentration range: 0.4 µg/mL - 2.0 µg/mL. The reading was recorded at 428 nm.
- Quantification in the ex vivo permeation studies.** Solvent: Ethanol:water (1:1), in contact with pig's ear skin for 24 h, filtering subsequently through a 0.45 µm membrane. Concentration range: 0.2 µg/mL - 1.6 µg/mL. The reading was recorded at 430 nm.

The curcumin spectra in each of the media are included in the Supplementary material.

2.8. Stability test

Three different batches were prepared for this evaluation, analyzing each one in triplicate. The formulations were stored protected from light in amber glass containers (5 ml volume, 1.5 cm in diameter) at 5 °C and 25 °C, for a period of 3 months. The physicochemical stability was evaluated one day after its manufacture and three months later, measuring PS, PI, Z potential, curcuminoid content and antioxidant activity. The percentage of curcuminoids was calculated according to Eq. (4):

$$\% \text{ curcuminoids} = \left(\frac{C_f}{C_o} \right) 100 \quad (4)$$

where C_f = Amount at time t and C_o = Initial amount.

Additionally, a photostability study was carried out where the NLC formulations containing curcuminoids were stored in glass containers (5 ml volume, 1.5 cm in diameter) at 25 °C. Two conditions were tested: with light protection (dark control) and without protection, exposing the samples to a global illumination of no less than 1.2 million lux-hour and an integrated near ultraviolet energy of not less than 200 W hour/m² during nine days. The determinations of PS, PI, Z potential, curcuminoid content and antioxidant activity were evaluated one day after the preparation of the systems and after being exposed to radiation. The measurements were made in triplicate for each system.

2.9. Antioxidant activity

This test was performed using the ABTS⁺ colored test, a method proposed by Re et al. (1999) with some modifications. Briefly, 7 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) were reacted with 5 ml of an aqueous solution of potassium persulfate 2.45 mM, for 16 h, at room temperature, protected from light. After this time, approximately 1 mL of the colorful assay was diluted with 100 ml of a pH 7.4 buffer solution. The absorbance of ABTS⁺ diluted in the buffer solution was determined at 734 nm (the reading of this solution was approximately 0.70 ± 0.02, using an empty cell for zero adjustment). The curcuminoids were extracted from the lipid formulations using a methanol:water solution (1:1 v/v), centrifuging at 12,000 rpm for

30 min at room temperature. A volume of 100 µL of this solution was taken and added to 1.9 mL of a diluted ABTS⁺ solution, stirring manually for 7 min. The absorbance was measured at 734 nm. The solution without any sample was used as the control. The antioxidant effect was expressed in terms of the reduction of the ABTS⁺ absorbance referred to as the percentage of inhibition according to Eq. (5).

$$\% \text{ inhibition} = \left[1 - \left(\frac{A_f}{A_o} \right) \right] 100 \quad (5)$$

where A_f is the absorbance in the presence of the sample and A_o is the absorbance of the control reaction. The % inhibition of curcuminoids included in the NLC was compared with that obtained for a solution of curcuminoids in methanol under the same conditions.

2.10. Statistical analysis

The results were expressed as the mean ± standard deviation. Data were analysed using one-way ANOVA and the Tukey post-hoc test or the Student's t -test to evaluate differences between groups of data. The level of significance was fixed at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of NLC loaded with curcuminoids

The preparation of NLC loaded with curcuminoids was based on a method previously reported (Rapalli et al., 2020). This method was optimized, studying the influence of the following factors: type of solid lipid (regarding the liquid lipids tested, only Labrasol gave good solubility results), type of surfactant, and concentration of surfactant. The proper selection of these parameters had an important impact on particle size and polydispersity index (Salvi and Pawar, 2019).

Those lipids that gave better results in terms of high curcuminoid solubility and good NLC characteristics, such as PS and PI, were Compritol® 888 ATO and Precirol® ATO 5 as solid lipids and Labrasol® as a liquid lipid. This was done, taking into account that a greater solubility of the drug in the lipid mixture results in a higher entrapment efficiency and a lower leakage of the drug from the lipid matrix (Salvi and Pawar, 2019). Regarding the type of surfactant, poloxamer 407 (Pluronic® F127) and polysorbate 80 (Tween® 80), both at 1% (w/v) allowed to obtain NLC with a unimodal particle size distribution. These two surfactants were selected, because in addition to obtaining NLC with adequate characteristics in terms of PS and PI, there is enough evidence of their safety (Doktorovová et al., 2016). These surfactants were also tested at 3% (w/v), but the distributions were multimodal, so the following studies were conducted using a surfactant concentration of 1%. Then, tests were performed with the four formulations shown in Table 1. In summary, the following materials were used to prepare NLC loaded with curcuminoids: 85% solid lipids [Compritol® 888 ATO (C) or Precirol® ATO 5 (P)]; 15% liquid lipid [Labrasol® (L)]; polysorbate 80 (T80), and poloxamer 407 (P407) as surfactants at a concentration of 1% (w/v).

3.2. Characterization of NLC loaded with curcuminoids

Table 2 shows the results of the characterization of the four formulations. The parameters measured were: Particle size (PS), polydispersity index (PI), Z Potential (Z), entrapment efficiency (EE), process efficiency (PE), and loading capacity (LC). Likewise, morphology was visualized by transmission electron microscopy.

The average particle size of the four formulations loaded with curcuminoids was between 111 and 214 nm (Table 2). According to various reports (Khosha et al., 2018; Chen et al., 2016; Salvi and Pawar, 2019; Doktorovová et al., 2016), this particle size is suitable for topical application, as it allows contact with the skin surface and favors

Table 2

Characteristics of the prepared NLC. Particle size (PS); Polydispersity Index (PI); Z Potential (Z); Entrapment Efficiency (EE); Loading capacity (LC) and Process Efficiency (PE). All systems contain Labrasol® (L). Results are displayed as mean \pm SD ($n = 3$).

Formulations	Parameters					
	PS (nm)	PI	Z (mV)	EE (%)	LC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	PE (%)
CLT80-Cur	213.9 \pm 8.1	0.20 \pm 0.02	-15.5 \pm 0.6	79.70 \pm 1.0	2.63 \pm 0.03	92.9 \pm 2.1
CLP407-Cur	149.9 \pm 15.1	0.24 \pm 0.04	-7.2 \pm 0.9	86.67 \pm 3.1	3.18 \pm 0.11	91.7 \pm 3.3
PLT80-Cur	148.4 \pm 6.6	0.20 \pm 0.02	-14.6 \pm 0.9	90.36 \pm 1.5	2.97 \pm 0.05	90.4 \pm 3.2
PLP407-Cur	111.7 \pm 7.9	0.24 \pm 0.02	-4.1 \pm 0.6	96.89 \pm 0.3	3.26 \pm 0.01	93.9 \pm 4.5

Cur = curcuminoids; Tween 80 = Polysorbate 80; Pluronic F-127 = Poloxamer 407.

CLT80 = Compritol/Labrasol/Tween 80; CLP407 = Compritol/Labrasol/Poloxamer 407.

PLT80 = Precirol/Labrasol/Tween 80; PLP407 = Precirol/Labrasol/Poloxamer 407.

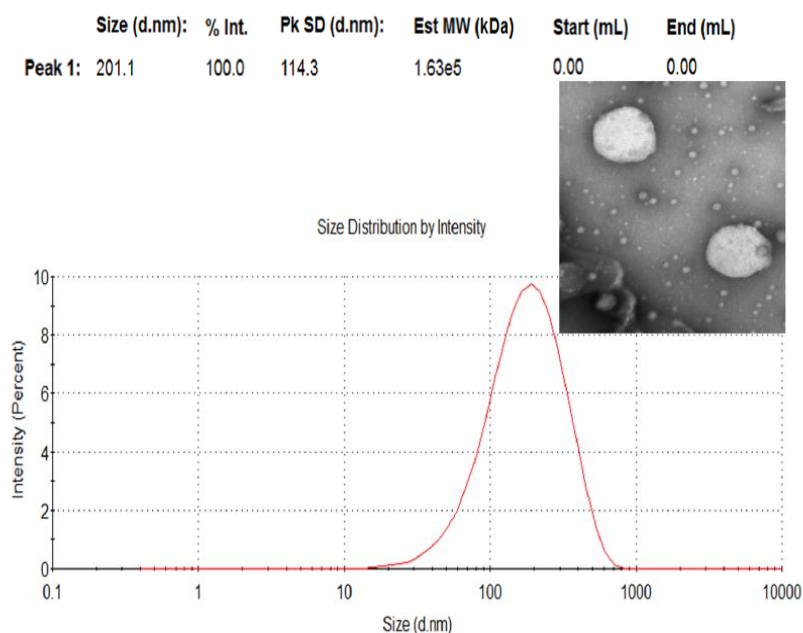


Fig. 1. Particle size distribution, as well as a representative image obtained by TEM, of one of the curcuminoid-loaded NLC systems (CLT80-Cur). C (Compritol® 888 ATO); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); Cur (curcuminoids).

its adhesiveness, prolonging contact. On the other hand, the penetration of NLC through the hair follicles should also be considered, constituting another route of entry. From these two routes, it is possible for a deposit to form, from which the active substance can be gradually released to reach deep layers of the skin (Garces et al., 2018). The polydispersity index for all systems was less than 0.3, which is indicative of uniformity in the particle size of the NLC suspension (Khosa et al., 2018). As a representative example, Fig. 1 shows the particle size distribution for the CLT80-Cur system, where a unimodal distribution is observed. Similar distributions were obtained for the rest of the systems.

The Z potential analysis contributes to understand the stability of the suspended particles through electrostatic repulsion between them. Although in theory the dispersions require at least a Z potential of ± 30 mV for electrostatic stabilization (Khosa et al., 2018; Thatipamula et al., 2011), as shown in Table 2, the systems presented much smaller Z potentials. The two formulations based on Tween 80 (CLT80-Cur and PLT80-Cur) had higher values (-15.5 and -14.6 mV, respectively) than those containing poloxamer (-7.2 mV for CLP407-Cur, and -4.1 mV for PLP407-Cur), which can be attributed to the presence of some anionic impurities (e.g., free fatty acids) in Tween as a

commercial product (Kharat et al., 2018). In general, the Z potential values found are in agreement with those reported by other authors (Friedrich et al., 2015), since both are non-ionic surfactants, whose stabilizing effect is attributed mainly to the steric effect they impose when located at the particle/water interface, which prevents their agglomeration (Khosa et al., 2018; Friedrich et al., 2015; Som et al., 2012). To assess the amount of curcuminoids retained in the lipid matrix, entrapment efficiency (EE), process efficiency (PE), and loading capacity (LC) were determined. In general, a high EE was obtained for all systems (between 79.7 and 96.89%). This can be attributed to several factors: (i) The hydrophobic characteristics of curcuminoids that favor affinity with the components of the NLC, (ii) the selection of liquid and solid lipids, which was carried out through solubility studies, choosing those where the curcuminoids were most soluble, and (iii) the disorganized structure of the NLC, which allows a high incorporation of curcuminoids into the nanoparticle system. As Table 2 shows, the highest EE was obtained with Precirol-based systems (PLT80-Cur and PLP407-Cur). Regarding the LC, this was higher for systems containing poloxamer 407 as stabilizer (3.18 and 3.26 $\mu\text{g}/\text{mg}$) than for systems with Tween 80 (2.63 and 2.97 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Finally, a PE greater than 90% was found in all cases. A micrograph obtained by TEM, representative

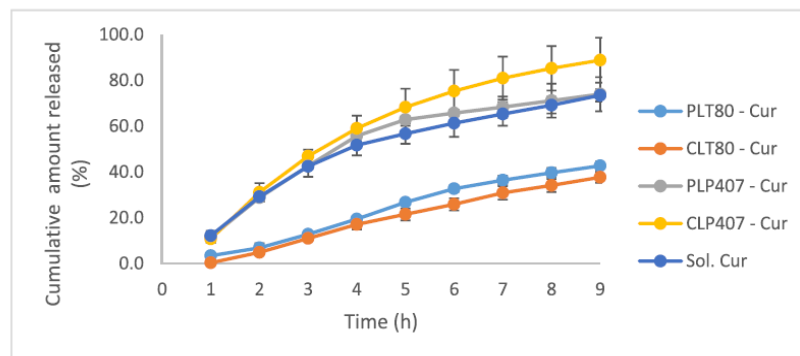


Fig. 2. The *in vitro* release profile of different formulations loaded with curcuminoids, using the dialysis method and as receptor medium an ethanol-water solution (1:1) at 37 °C. C (Compritrol® 888 ATO); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxamer 407); CUR (curcuminoids); Sol. (Solution). The points correspond to the average of the results and the error bars represent the standard deviation ($n = 3$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

of one of the four formulations (CLT80-Cur) appears in Fig. 1. In general, the observed sizes were consistent with those determined by dynamic light scattering.

3.3. *In vitro* release profile of curcuminoids from NLC

As presented in Fig. 2, the highest amount released and the highest release rate corresponded to the formulations with poloxamer 407 (on average 73% for PLP407 and 89% for CLP407 at 9 h). The curcuminoid solution presented a profile very similar to that of the PLP407 system. The release rate for systems with Tween 80 was slower and according to the profiles shown, a prolonged release could be assumed (about 38% released from CLT80 and 43% from PLT80 at 9 h).

In order to understand the predominant mechanism of release, the choice of a suitable mathematical model, to which the data obtained fit, allows to predict what happens in the release process. For this, the DDSolver program provides a series of statistical criteria to assess the goodness of the fit such as the correlation coefficient (R^2), the Akaike criterion (AIC), and the model selection criterion (MSC). Table 3 shows the kinetic parameters obtained from the release profiles of each formulation.

To better understand the release profile of each system, it was decided to separate the analysis into two groups. The first one consisting of the systems containing polysorbate 80 (PLT80-Cur and CLT80-Cur), finding that they had high correlation coefficients of 0.97, $AIC \approx 50$ and $MSC \approx 3.5$ for zero order models and for Peppas-Korsmeyer. In fact, there is a correlation between the two models, that is, in the case of the Peppas and Korsmeyer model, an exponent “ n ” very close to 1 was found, which would correspond to a “transport case II”, referenced as a zero order release. Therefore, these two formulations had a constant release rate in relation to time, independent of the solute concentration. In the case of the second group, formed by the systems containing poloxamer 407 (CLP407-Cur and PLP407-Cur), the release

profiles conformed to a first-order kinetics, with a correlation coefficient above 0.93, $AIC \approx 55$ and $MSC \approx 2.7$, demonstrating that they are concentration dependent. This agrees with what has been reported by other authors (Khosa et al., 2018) who found a rapid initial release (even with burst effect) due to the presence of drug on the surface of the NLC, followed by a prolonged release of the drug that is inside the particles. The release may be controlled by the diffusion of the drug and/or the erosion of the lipid matrix, depending on the composition of the lipids. The type of stabilizer is also important, as it can influence the action of enzymes on the particles. In the case of steric stabilizers such as those used in this work, a slower degradation would be expected due to the steric effect that could work as a kind of shield (Khosa et al., 2018).

3.4. *Ex vivo* permeation of curcuminoids through pigskin

In general, it has been reported that NLC can function as permeation enhancers. This is attributed to several factors (Chen et al., 2016; Re et al., 1999; Belouqui et al., 2016; Carter et al., 2019): (i) NLC are able to establish a close interaction with the skin surface forming a hydrophobic film. This causes an occlusive effect that prevents the loss of transepidermal water and increases skin hydration, generating a more loose packing on both corneocytes (with inter-corneocyte gaps opening) and lipids (increasing their fluidity). (ii) The surfactants used as stabilizers of the NLC are also able to interact with the components of the skin (i.e., lipids and proteins) causing the disruption of the skin structure. (iii) NLC are capable of forming a reservoir by entering the interstices of the skin (e.g., wrinkles) or hair follicles, releasing the drug from that site. This promotes the penetration of drugs by forming a high concentration gradient in the skin.

According to the results obtained in this work, the systems with which a greater amount of curcuminoids reached the receptor medium were those containing polysorbate 80 (Fig. 3). The reason for the result

Table 3

Correlation coefficient (R^2), Akaike Criteria (AIC) and model selection criteria (MSC) for different mathematical models and “ n ” release exponent for the Peppas-Korsmeyer model.

Formulations	Models				n
	Zero Order R^2 (AIC) (MSC)	First order	Higuchi	Peppas - Korsmeyer	
CLT80 - Cur	0.9710 ⁽⁵²⁾ (3.4)	0.8470 ⁽⁶⁸⁾ (1.7)	0.7484 ⁽⁷²⁾ (1.2)	0.9816 ⁽⁵⁰⁾ (3.6)	1.14
PLT80 - Cur	0.9765 ⁽⁵⁰⁾ (3.5)	0.8578 ⁽⁶⁷⁾ (1.7)	0.7799 ⁽⁷¹⁾ (1.3)	0.9780 ⁽⁵²⁾ (3.6)	1.04
CLP407 - Cur	0.8527 ⁽⁶⁵⁾ (1.7)	0.9449 ⁽⁵⁵⁾ (2.7)	0.7634 ⁽²⁶⁾ (1.0)	0.9807 ⁽¹⁶⁾ (3.4)	1.04
PLP407 - Cur	0.7038 ⁽⁷⁰⁾ (1.1)	0.9348 ⁽⁵⁶⁾ (2.7)	0.7659 ⁽²⁷⁾ (1.0)	0.9874 ⁽¹⁶⁾ (3.7)	1.06

Cur = Curcuminoids; Tween 80 = Polysorbate 80; Pluronic F-127 = Poloxamer 407.

CLT80 = Compritol/Labrasol/Tween 80; CLP407 = Compritol/Labrasol/Poloxamer 407.

PLT80 = Precirol/Labrasol/Tween 80; PLP407 = Precirol/Labrasol/Poloxamer 407.

AIC: The model with a low value is considered appropriate; MSC: The model with a high value is considered appropriate (values between 2 and 3 mean a good fit).

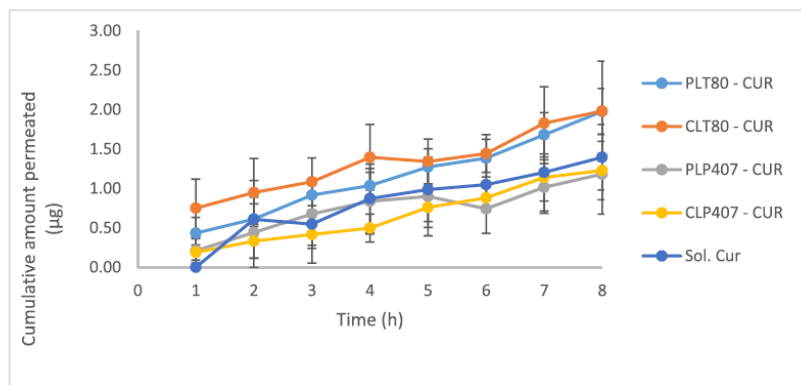


Fig. 3. Ex vivo permeation of different formulations loaded with curcuminoids through full pig's ear skin and as a receptor medium an ethanol-water solution (1:1) at 37 °C, over 8 h. C (Compritol ATO 888®); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxamer 407); CUR (curcuminoids); Sol. (Solution). The points correspond to the average of the results and the error bars represent the standard deviation ($n = 6$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 4

Flux values and permeability coefficients obtained from the permeation data of the different formulations. Results are displayed as mean \pm SD ($n = 6$).

Formulation	Flux ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) (1×10^{-3})	Permeability coefficient (cm h^{-1}) (1×10^{-3})	Total amount permeated (μg)	ER ¹
CLT80-Cur	1.95 ± 0.62	4.8 ± 1.5	1.98	1.60
CLP407-Cur	1.20 ± 0.41	2.6 ± 0.8	1.23	0.87
PLT80-Cur	1.65 ± 0.31	3.5 ± 0.6	1.98	1.16
PLP407-Cur	0.92 ± 0.47	1.9 ± 0.9	1.18	0.63
Sol. Cur	1.33 ± 0.35	3.0 ± 0.8	1.40	—

Cur = curcuminoids; Tween 80 = Polysorbate 80; Pluronic F-127 = Poloxamer 407.

CLT80 = Compritol/Labrasol/Tween 80; CLP407 = Compritol/Labrasol/Pluronic F127.

PLT80 = Precirol/Labrasol/Tween 80; PLP407 = Precirol/Labrasol/Pluronic F127; Sol. (Solution).

¹ ER (Enhancement ratio) = Permeability coefficient of formulation/Permeability coefficient of solution.

is attributed to the fact that polysorbate 80 (polyoxyethylene monooleate (20) sorbitan) has a chain of 18 carbons with a *cis* unsaturation in position 9–10, which is able to intercalate between the lipid chains of the stratum corneum, causing a "fluidization" of the lipid matrix, which implies an increase in lipid disorder. This means that it would be acting as a permeation enhancer, favoring the transport of curcuminoids through the skin. Because its structure is very similar to that of oleic acid, it would be expected that its mechanism as enhancer will be very similar (Silva Favacho et al., 2020). The flux value, permeability coefficient, and the total amount in the receptor medium, were higher for systems with polysorbate 80 (Table 4). In fact, the enhancement ratio (ER = permeability coefficient of the formulation/permeability coefficient of solution), presented in Table 4, shows values of 1.60 for the CLT80-Cur and 1.16 for the PLT80-Cur. On the contrary, the poloxamer systems had ER values lower than 1, which implies that there was a delay in permeation with this surfactant, especially for the formulation with Precirol (PLP407-Cur) with an ER = 0.63. Regarding the solution, the fact of containing water:ethanol (1:1 v/v) did not promote more permeation than polysorbate systems, despite the well-known enhancing properties of ethanol.

3.5. Penetration depth and distribution profile of curcuminoids in ex vivo skin by confocal laser scanning microscopy

It is well-known that oxidative stress influences numerous cutaneous diseases, therefore, it is expected that the administration of exogenous antioxidants may help to fight these diseases. As reactive

oxygen species are produced by keratinocytes and by practically all types of skin cells in response to different signals (Baek and Lee, 2016), penetration of antioxidants through the stratum corneum and their retention in the inner layers of the skin, is desirable for these agents to reach the target. Therefore, in this work, the penetration capacity and distribution pattern of curcuminoids in the skin, were determined through images of the skin previously treated with the four NLC formulations containing curcuminoids, using confocal laser scanning microscopy, taking advantage of the fact that curcuminoids are fluorescent. Then, once the permeation studies were completed, the skin was examined by confocal microscopy, at various depths up and step size, for axial scanning, as explained in Section 2.6.

Although other techniques have been used to study the penetration of curcumin into the skin, such as tape-stripping (Vater et al., 2020), followed by the separation of the viable epidermis from the dermis by a thermal method (Friedrich et al., 2015), confocal laser scanning microscopy provided valuable information, making possible to compare the influence of the formulations on the degree of penetration of curcuminoids, through images like those shown in Fig. 4: The maximum fluorescence projection, representing the sum of the fluorescence of the 36 slides obtained (Fig. 4a); orthogonal projection (Fig. 4b), which allows to locate areas of penetration of the drug; and finally, the 3D reconstruction of the image showing the distribution of the drug in the total thickness of scanned skin (Fig. 4c). A scan was made from the surface of the skin (0 μm depth) until reaching a skin depth of 108 μm , analyzing the fluorescence of 36 slides, with 3 μm increments. With the fluorescence intensity values determined for each slide, it was possible to build a penetration profile, like the one presented in Fig. 5, where the degree of penetration of each formulation can be compared quantitatively, taking as a reference that of a solution of curcuminoids (free curcuminoids).

A strong fluorescence distribution of curcuminoids from the NLC was observed at different depths of the skin, which coincides with the results of other authors such as Mao et al. (2017) and Abdel-Hafez et al. (2018b), who visualized the penetration and distribution of curcumin in mice skin by confocal microscopy, confirming that it is capable of crossing the stratum corneum, reaching the epidermis and dermis when it is included in polymeric nanoparticles. An important observation is that curcuminoids did not homogeneously cover the skin, i.e., clusters were detected in different regions of the same slide (certain areas of the skin or in hair follicles), as shown in Fig. 4b. In this sense, different authors agree that nanoparticles can infiltrate the outermost layers of the stratum corneum or accumulate in the hair follicles, forming a reservoir from which they can release the drug (Abdel-Hafez et al., 2018b; Sun et al., 2017). When determining the total fluorescence for each slide in order to construct the profile presented in Fig. 5, it was observed that the greatest deposition was achieved with the CLP407,

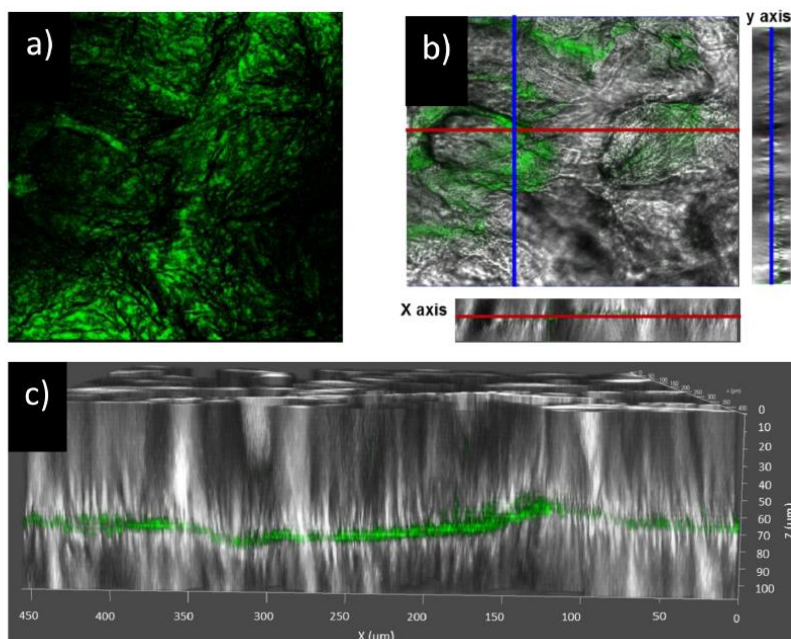


Fig. 4. Representative images of the fluorescence emitted by one of the nanoparticulate systems loaded with curcuminoids (CLT80-Cur) obtained by confocal laser scanning microscopy. a) Image of the maximum fluorescence projection of 36 slides, b) Orthogonal image of a single cut that shows the location and distribution of curcuminoids, c) 3D image where the penetration distance of curcuminoids is visualized. C (Compritol ATO 888®); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxamer 407); CUR (curcuminoids); Sol. (Solution). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

CLT80 and PLT80 systems, that showed a maximum accumulation between 60 and 90 μm , while for the PLP407 the maximum was around 51–63 μm and for the solution between 57 and 63 μm . These same systems had high total accumulated fluorescence values (sum of the fluorescence from all slides) of 17,526, 14,700 and 12,821 arbitrary fluorescence units (AFU) for the CLP407, CLT80 and PLT80 systems, respectively, in relation to the PLP407 system with a total fluorescence of 7993 AFU and that of the solution of 5843 AFU. This behavior is attributed to the different composition of the systems that has an influence on the extent of penetration of curcuminoids. In the case of

systems with polysorbate 80 (PLT80-Cur and CLT80-Cur) the distribution shown by the confocal microscope coincides with the results of the permeation studies, where these two systems not only allowed a high amount of curcuminoids to penetrate and be retained in the skin, but also to reach the receiving medium. In the case of the CLP407-Cur system, although the amount that reached the receiving solution was less than with the polysorbate systems, this formulation allowed a high amount of curcuminoids to be retained along the total thickness of the analyzed skin. Curcuminoids in solution showed the lowest fluorescence intensity in the skin, in spite of being a hydroalcoholic solution

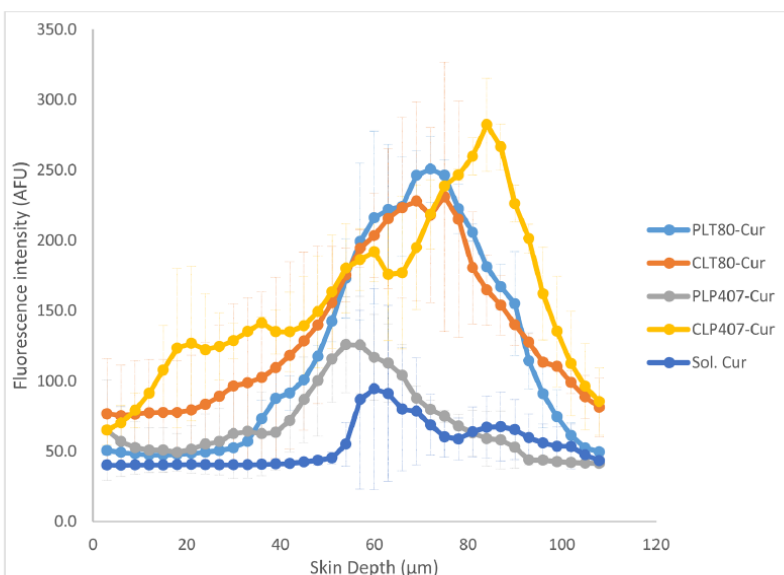


Fig. 5. Skin penetration profile of curcuminoids formulated in NLC. The fluorescence of curcuminoids detected in each slide by confocal laser scanning microscopy is plotted vs the skin depth. The solution of curcuminoids in ethanol: water (1:1 v/v) is included as a reference. Higher arbitrary fluorescence units (AFU) indicate the presence of higher amounts of curcuminoids.

(ethanol:water 1:1 v/v), the promoting properties of ethanol being well known (Williams and Barry, 2012). This confirms what was reported by other authors, that penetration and retention of curcuminoids within the skin can be favored by encapsulating them in nanocarriers, such as polymeric nanoparticles (Mao et al., 2017; Abdel-Hafez et al., 2018b; Sun et al., 2017), nanogels (Priya et al., 2017), deformable liposomes (Ternullo et al., 2019; Abdel-Hafez et al., 2018a), NLC, and nanoemulsions (Wolf et al., 2018) and agrees with the results obtained in this work, where the formulation of the drug in NLC favored its penetration into the skin (Salvi and Pawar, 2019; Beloqui et al., 2016). However, it is important to consider that the penetration capacity of the drug depends on the release characteristics of the carrier system in which it is included, as demonstrated by Friedrich et al. (2015) who find a lower amount of curcumin in all skin layers when formulated in lipid-core poly (*ε*-caprolactone) nanocapsules, compared to a hydroalcoholic solution of curcumin. In this case, the authors attribute this to the very low diffusion of curcumin from the nanocapsules (in 24 h only about 10% of the charge had been released). But even if curcumin is not included in a nanocarrier, its penetration into skin is favored when it is in the form of nanocrystals. As with nanocarriers, Vidlárová et al. (2016) found that due to their size (less than 200 nm), nanocrystals basically penetrate and accumulate in hair follicles, forming a depot, with a high concentration gradient between the hair follicle (with a volume of water/moisture very limited) and the surrounding cells. Curcumin diffusion occurs until the nanocrystals are completely dissolved, allowing for prolonged release.

Something important to keep in mind is that the skin has a net negative charge and therefore, it would be expected that the NLC prepared in this work, having a negative Z potential, would not penetrate the skin so easily. In general, the skin is "permselective", that is, those cationic species or nanoparticles with positive charge diffuse more easily than neutral or anionic ones (Mao et al., 2017). However, there are studies where the results are contradictory, finding that the anionic nanoparticles are also able to penetrate into the skin due to the repulsion that is generated between anionic nanoparticles and the lipids of the skin with negative charge, which facilitates their entrance to deep regions of the skin (Carter et al., 2019). Likewise, some studies suggest the internalization of negatively charged NLC in the hair follicles (Salvi and Pawar, 2019) releasing the drug from this site, as previously mentioned.

3.6. Stability and antioxidant activity

Curcumin can be affected by multiple factors, including pH, temperature and light exposure, so it is important to preserve its stability both during storage and in the biological medium. Therefore, in this paper, stability tests were performed for the four formulations studied, under two different conditions: protected from light, at two storage temperatures (5 °C and 25 °C) and exposed to full illumination (photostability study) as explained in methodology (2.8 Stability test). PS, PI, Z potential and curcuminoid content were determined at time zero and at the end of the test. Likewise, the antioxidant activity, expressed as the percentage of inhibition of the response obtained with the ABTS⁺ reagent, was evaluated. The statistical analysis was performed through an ANOVA with a level of significance of 95%, considering significant differences with a value of $p < 0.05$.

The results of PS at the two conditions previously exposed are presented in Fig. 6a and b. A decrease in the size was observed after 3 months for systems containing poloxamer 407 (CLP407-Cur and PLP407-Cur), particularly at 25 °C which can be attributed to the erosion of the systems or degradation of the lipids (Ganesan and Narayanasamy, 2017). Something that attracted our attention was that the PLT80-Cur system showed an increase in its size, especially at 25 °C (Fig. 6a). In this sense, some authors such as Li et al. (2008), attribute this increase to the higher kinetic energy at 25 °C that can accelerate the collision of the particles and therefore the possibility of aggregation.

For systems exposed to full illumination, there was no significant change in the size of any of the systems (Fig. 6b) after the 9 days of this test.

Regarding the content of curcuminoids, this was significantly reduced in the case of the solution and especially at 25 °C after three months (Fig. 6c), while for NLC it was always higher than 84%. It can be assumed that the lipid cover of the systems provides protection to the drug and these results coincide with those obtained in the percentage of inhibition (Fig. 6e) where curcuminoids in solution showed a significant decrease. This has been extensively reported by other authors who have found that the inclusion of curcumin in a carrier, contributes to improving its stability, as well as preserving its antioxidant activity in relation to curcumin in its free form, e.g., Turmeric extract-loaded NLC (Karimi et al., 2018); incorporation of curcumin in emulsions (Leiva-Vega et al., 2020); curcumin-egg ovalbumin complex (Liu et al., 2017); curcumin complexes with whey protein fibrils with and without chitosan (Hu et al., 2020); curcumin encapsulated in hydrogel beads (Wang et al., 2019); and curcumin in calcium phosphate nanoparticles (Guo et al., 2018). Greater stability and antioxidant activity were reported by Nikolic et al. (2020) for curcumin included in a nanoemulsion, in relation to a solution of curcumin in ethanol. Improved DPPH radical scavenging activity was observed by conjugating curcumin with hydrophilic hydroxyethyl starch, forming then micellar nanoparticles (Chen et al., 2020), or by encapsulating curcumin in α -lactalbumin and α -lactalbumin-dextran conjugates (Mohammadian et al., 2019), in relation to free curcumin in water (with less radical DPPH scavenging activity). The two authors attributed the fact to the formation of large curcumin aggregates, due to its low water solubility, causing a decrease in the amount of curcumin available for interacting with free radicals.

In the photostability study, the reduction in curcuminoid content (Fig. 6d) was dramatic for all systems exposed to radiation (no light protection). This is not surprising, as curcuminoids degrade rapidly in the presence of light (Mehanny et al., 2016; Suwannateep et al., 2012), mainly under the conditions of this test, where the high intensity of the incident light further accelerated the degradation. In the case of systems with light protection, a significant decrease was observed only for the curcuminoid solution (on average 79%), while the content of curcuminoids in the NLC remained above 91%. This is particularly important when curcuminoids are applied to the skin, where they can be exposed to solar radiation. As already mentioned, the percentage of inhibition decreased significantly for the solution at both 5 °C and 25 °C (Fig. 6e), although curiously, when conducting the photostability study, all systems showed a decrease in inhibition when exposed to radiation (no light protection), which did not occur in the case of the solution (Fig. 6f). On the other hand, with light protection, the % inhibition remained unchanged for all systems, including the solution.

An interesting observation of the photostability studies was that the percentage of inhibition was only decreased from 16.3 to 21.4%, while the content of curcuminoids was reduced by 93% (with no light protection), in relation to the initial value. This can be explained because the main degradation products of curcuminoids (e.g., vanillin, ferulic acid, ferulic aldehyde, feruloyl methane), have OH groups and methoxy groups at position 3 and 3' with antioxidant properties (the antioxidant activity of curcuminoids result from the hydroxyl group of the phenol ring) (Tai et al., 2011; Chang et al., 2019). In fact, some studies suggest superior activity for some curcuminoid metabolites or degradation products (Mehanny et al., 2016; Shen and Ji, 2012; Jankun et al., 2016). The curcuminoid solution showed a 9% increase in inhibition for unprotected samples, behavior that is related to the results obtained by Chang et al. (2019), who explain that the antioxidant activity of curcuminoids, also comes from the formation of different degradation products, which also have antioxidant activity, like the parent compound. However, the authors mention that the intensity of the antioxidant activity depends on the nature of the dissolution medium. This has been confirmed by Suwannateep et al. (2012), who calculated the

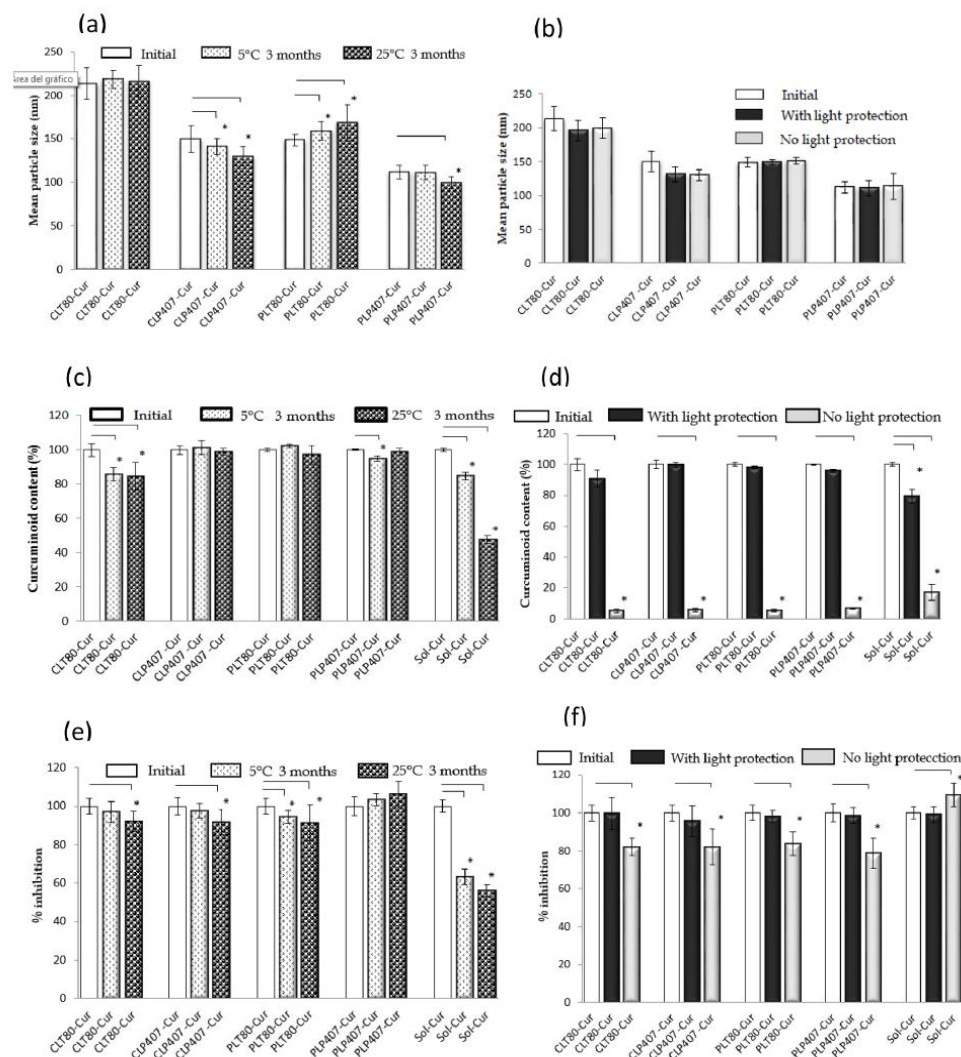


Fig. 6. The results of particle size, curcuminoid content, and % inhibition are shown for the stability tests, under the following conditions: at 5 °C and 25 °C for 3 months, protected from light (a, c and e); at 25 °C with light protection and without protection (exposed to a global illumination, as described in Section 2.8) for 9 days (b, d and f). C (Comprimat ATO 888®); P (Precirol® ATO 5); L (Labrasol®); T80 (Tween® 80); P407 (Poloxamer 407); CUR (curcuminoids); Sol. (Solution). Significant differences were found between the systems, as indicated in the graphs (* $p < 0.05$).

Radical Protection Factor for curcumin encapsulated in polymeric nanospheres and free curcumin in the form of lotion, and concluded that there were no statistical differences in the antioxidant activity of encapsulated curcumin and free curcumin, which is in agreement with what was found in this article, in relation to the fact that the antioxidant activity seems to come from both the degradation products and the parent compound. Authors like Chen et al. (2020) have found a greater antioxidant activity for curcumin included in nanoparticles than in its free form (dispersed in water), and in the same way as other authors (e.g., Hu et al., 2020; Mohammadian et al., 2019) this was attributed to the low aqueous solubility of curcumin. Then, its inclusion in nanoparticles increases the amount of curcumin available for interacting with free radicals. In our case, free curcumin was completely dissolved in ethanol and therefore available.

Regarding the results of Z potential, which allow to predict the physical stability of NLC, a significant difference was found between the initial average value and after three months for both stability studies (data shown as Supplementary material), which can be attributed to a change in NLC composition during storage, e.g., desorption of surfactants from the surface of the NLC, decrease in curcuminoid content with the formation of degradation products, erosion of systems, etc. (Khosha et al., 2018; Mehnert and Mäder, 2001).

In summary, the photostability study allows us to deduce that both curcuminoids and their degradation products possess antioxidant activity, since as it was shown there is no direct relationship between the reduction in curcuminoid content and its antioxidant activity (Fig. 6), and as already mentioned, the antioxidant activity will depend on the type and abundance of the degradation products, as well as on the

dissolution medium in which they are found. However, according to the results of percentage of inhibition (Fig. 6e), in storage, especially at 5 °C, the NLC retained the antioxidant activity of curcuminoids (which was drastically reduced in the case of the solution). Therefore, preservation of NLC under these conditions, maintains the antioxidant activity.

Finally, since both curcumin and its degradation products have similar biological and antioxidant activities (Shen and Ji, 2012; Jankun et al., 2016), therefore, whether the low stability of curcumin is a disadvantage or an advantage is not yet clear.

4. Conclusions

The NLC prepared possess particle sizes and polydispersity indices suitable for topical administration. All NLC prepared allowed a greater amount of curcuminoids to penetrate the skin, in relation to the solution and all, with the exception of the PLP407-Cur system, reached deeper layers of the skin than the solution. Stability tests showed that the incorporation of curcuminoids in NLC protects them from degradation, especially at a storage temperature of 5 °C, in amber containers, as shown by the results of curcuminoid content and% inhibition. Exposure to intense light degraded the curcuminoids still encapsulated in the NLC, although degradation was not related to its antioxidant activity, which in spite of this was preserved. This is in accordance with the reports of other authors in relation to the fact that degradation products are active antioxidants.

The above studies provided evidence that NLC are able to achieve a prolonged release and can be valuable carriers to enhance the penetration of curcuminoids into the skin.

Credit author statement

This was the contribution of each author during the development of this work:

Marco Antonio Espinosa Olivares - Development of the bulk of the experimental part: Preparation and characterization of the NLC formulations. Release studies and permeation studies. Stability and antioxidant tests.

Norma Laura Delgado-Buenrostro - Support for visualization of samples by confocal microscopy.

Yolanda Irasema Chirino - Support for the preparation and staining of skin samples to be visualized by confocal microscopy

Ma. Andrea Trejo-Márquez - Support for the stability tests.

Selene Pascual-Bustamante - Support for the antioxidant tests.

Adriana Ganem-Rondero - Proposal, administration of the project and planning of activities. Analysis of results and revision of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

The authors appreciate the financial support provided by PIAP/ FESC (Ref. PIAP2021) and PAPIIT/UNAM (Ref. IN226119).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ejps.2020.105533.

References

Abdel-Hafez, S.M., Hathout, R.M., Sasmour, O.A., 2018a. Curcumin-loaded ultra-deformable nanovesicles as a potential delivery system for breast cancer therapy.

- Colloids Surf. B 167, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.051>.
- Abdel-Hafez, S.M., Hathout, R.M., Sasmour, O.A., 2018b. Tracking the transdermal penetration pathways of optimized curcumin-loaded chitosan nanoparticles with confocal laser scanning microscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 753–764. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.10.170>.
- Abrahams, S., Haylett, W., Johnson, G., Carr, J., Bardien, S., 2019. Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative, and nitrosative stress: a review. *Neuroscience* 406, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.02.020>.
- Aditya, N.P., Shim, M., Lee, I., et al., 2013. Curcumin and genistein co-loaded nanostructured lipid carriers: *in vitro* digestion and antiproliferative activity. *J. Agric. Food Chem.* 61 (8), 1878–1883. <https://doi.org/10.1021/jf305143k>.
- Baek, J., Lee, M.-G., 2016. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Rep.* 21, 164–169. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000015>.
- Beloqui, A., Solinís, M.A., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A.J., Prát, V., 2016. Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine* 12, 143–161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>.
- Carter, P., Narasimhan, B., Wang, Q., 2019. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *Int. J. Pharm.* 555, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.032>.
- Chang, C., Meikle, T., Su, Y., Wang, X., Dekiwadia, C., Drummond, C., Conn, C., Yang, Y., 2019. Encapsulation in egg white protein nanoparticles protects anti-oxidant activity of curcumin. *Food Chem.* 280, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.124>.
- Chen, P., Zhang, H., Cheng, Sh, Zhai, G., Shen, Ch, 2016. Development of curcumin loaded nanostructured lipid carrier based thermosensitive in situ gel for dermal delivery. *Colloids Surf. A* 506, 356–362. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.06.054>.
- Chen, Sh, Wu, J., Tang, Q., Xu, Ch, Huang, Y., Huang, D., Luo, F., Wu, Y., Yan, F., Weng, Z., Wang, Sh, 2020. Nano-micelles based on hydroxyethyl starch-curcumin conjugates for improved stability, antioxidant and anticancer activity of curcumin. *Carbohydr. Polym.* 228, 115398. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115398>.
- Doktorovová, S., Kovacevic, A.B., Garcia, M.L., Souto, E.B., 2016. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: current evidence from *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 108, 235–252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.08.001>.
- Edwin, D., 2016. Skin aging and oxidative stress: equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res. Rev.* 31, 36–54. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.001>.
- Friedrich, R.B., Kann, B., Coradini, K., Offerhaus, H.L., Beck, R.C.R., Windbergs, M., 2015. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 78, 204–213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.07.018>.
- Ganesan, P., Narayanasamy, D., 2017. Lipid nanoparticles: different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustain. Chem. Pharm.* 6, 37–56.
- Garces, A., Amaral, M., Sousa, J., Silva, A., 2018. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: a review. *Eur. J. Pharm. Sci.* 112, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.023>.
- Giraud, M., Rivera, G., Moreira, D., Burmester, A., Castro, A., Carvajalino, J., Dafre, A., Niu, C., Tremblay, N., Paital, B., Rosa, R., Storey, J., Vega, I., Zhang, W., Yepiz, G., Zenteno, T., Storey, K., Hermes, M., 2019. Twenty years of the 'Preparation for Oxidative Stress' (POS) theory: ecophysiological advantages and molecular strategies. *Compar. Biochem. Physiol. Part A* 234, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.004>.
- Guo, X., Li, W., Wang, H., Fan, Y.-Y., Wang, H., Gao, X., Niu, B., Gong, X., 2018. Preparation, characterization, release and antioxidant activity of curcumin loaded amorphous calcium phosphate nanoparticles. *J. Non Cryst. Solids* 500, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.08.015>.
- Hu, Y., Ch, He, Ch, Jiang, Liao, Y., Xiong, H., Zhao, Q., 2020. Complexation with whey protein fibrils and chitosan: a potential vehicle for curcumin with improved aqueous dispersion stability and enhanced antioxidant activity. *Food Hydrocoll.* 104, 105729. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105729>.
- Hussain, Z., Thu, H.E., Amjad, M.W., Hussain, F., Ahmed, T.A., Khan, S., 2017a. Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: a review of new trends and future perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* 77, 1316–1326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.226>.
- Hussain, Z., Thu, H.E., Ng, Sh-F, Khan, Sh, Katas, H., 2017b. Nanoencapsulation, an efficient and promising approach to maximize wound healing efficacy of curcumin: a review of new trends and state-of-the-art. *Colloids Surf. A* 150, 223–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.036>.
- Jankun, J., Wyganowska-Świątkowska, M., Dettlaff, K., Jelińska, A., Surdacka, A., Wątróbska-Świątkowska, D., Skrzypczak-Jankun, E., 2016. Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation. *Int. J. Mol. Med.* 37, 1151–1158. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2524>.
- Jordan, B.C., Mock, ChD, Thilagavathi, R., Selvan, Ch, 2016. Molecular mechanisms of curcumin and its semisynthetic analogues in prostate cancer prevention and treatment. *Life Sci.* 152, 135–144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.036>.
- Karimi, N., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Mehrmaz, B., Kafil, H.S., 2018. Antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of turmeric extract-loaded Nanostructured lipid carrier (NLC). *Colloid Interface Sci. Commun.* 2218–2224.
- Kharat, M., Zhang, G., McClements, D.J., 2018. Stability of curcumin in oil-in-water emulsions: impact of emulsifier type and concentration on chemical degradation. *Food Res. Int.* 111, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.021>.

- Khosa, A., Reddi, S., Saha, R.N., 2018. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomed. Pharmacother.* 103, 598–613. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.055>.
- Leiva-Vega, J., Villalobos-Carvajal, R., Ferrari, G., Donisi, F., Zúñiga, R.N., Shene, C., 2020. Influence of interfacial structure on physical stability and antioxidant activity of curcumin multilayer emulsions. *Food Bioprod. Process.* 121, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.01.010>.
- Li, X., Nie, Sh.-f., Kong, J., Li, N., Ju, Ch.-y., Pan, W.-s., 2008. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. *Int. J. Pharm.* 363, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.017>.
- Liu, Y., Ying, D., Cai, Y., Le, X., 2017. Improved antioxidant activity and physicochemical properties of curcumin by adding ovalbumin and its structural characterization. *Food Hydrocolloid.* 72, 304–311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.007>.
- López, G., Ganem, A., 2015. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): occlusive effect and penetration enhancement ability. *J. Cosmet. Dermatol. Sci. Appl.* 5, 62–72. <http://dx.doi.org/10.4236/jcdsa.2015.52008>.
- Lu, Q., Sun, Y., Ares, I., Anadón, A., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M., Yuan, Z., Wang, X., María-Aránzazu, Martínez, 2019. Deltamethrin toxicity: a review of oxidative stress and metabolism. *Environ. Res.* 170, 260–281. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.045>.
- Mao, K.-L., Fan, Z.-L., Yuan, J.-D., Chen, P.-P., Yang, J.-J., Xu, J., ZhuGe, D.-L., Jin, B.-H., Zhu, Q.-Y., Shen, B.-X., Sohawon, Y., Zhao, Y.-Z., Xu, H.-L., 2017. Skin-penetrating polymeric nanoparticles incorporated in silk fibroin hydrogel for topical delivery of curcumin to improve its therapeutic effect on psoriasis mouse model. *Colloids Surf. B* 160, 704–714. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.029>.
- Mehanny, M., Hathout, R.M., Geneidi, A.S., Mansour, S., 2016. Exploring the use of nanocarrier systems to deliver the magical molecule; Curcumin and its derivatives. *J. Control. Release* 225, 1–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.018>.
- Mehnert, W., Mäder, K., 2001. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 165–196.
- Mohammadian, M., Salami, M., Momen, Sh, Alavi, F., Emam-Djomeh, Z., 2019. Fabrication of curcumin-loaded whey protein microgels: structural properties, antioxidant activity, and *in vitro* release behavior. *LWT - Food Sci. Technol.* 103, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.076>.
- Nikolic, I., Mitsou, E., Damjanovic, A., Papadimitriou, V., Antic-Stankovic, J., Stanojevic, B., Xenakis, A., Savic, S., 2020. Curcumin-loaded low-energy nanoemulsions: linking EPR spectroscopy-analysed microstructure and antioxidant potential with *in vitro* evaluated biological activity. *J. Mol. Liq.* 301, 112479. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112479>.
- Pardeike, J., Hommos, A., Miller, R., 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.* 366 (1–2), 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>.
- Priya, P., Raj, R.M., Vasanthakumar, V., Raj, V., 2017. Curcumin-loaded layer-by-layer Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26 (9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Salvi, V.R., Pawar, P., 2019. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: a novel drug targeting carrier. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.017>.
- Shen, L., Ji, H.-F., 2012. The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? *Trends Mol. Med.* 18, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.01.004>.
- Silva Favacho, H.A., Oliveira do Couto, R., Peres Ferreira Duarte, M., Garofo Peixoto, M.P., Fonseca Vianna Lopez, R., Pedrazzi, V., Masetto de Gaitani, C., de Freitas, O., 2020. Synergy between surfactants and mucoadhesive polymers enhances the transbuccal permeation of local anesthetics from freeze-dried tablets. *Mater. Sci. Eng. C* 108, 110373. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110373>.
- Som, I., Bhatia, K., Yasir, M., 2012. Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4 (1), 2–9. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.92724>.
- Sun, L., Liu, Z., Wang, L., Cun, D., Tong, H.H.Y., Yan, R., Chen, X., Wang, R., Zheng, Y., 2017. Enhanced topical penetration, system exposure and anti-psoriasis activity of two particle-sized, curcumin-loaded PLGA nanoparticles in hydrogel. *J. Control. Release* 254, 44–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.385>.
- Suwannateep, N., Wanichwecharungruang, S., Haag, S.F., Devahastin, S., Groth, N., Fluhr, J.W., Lademann, J., Meinke, M.C., 2012. Encapsulated curcumin results in prolonged curcumin activity *in vitro* and radical scavenging activity *ex vivo* on skin after UVB-irradiation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82, 485–490. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.08.010>.
- Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., Ito, H., 2011. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim. Biophys. A Acta (BBA)* 1810 (2), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.11.004>.
- Ternullo, S., Gagnat, E., Julin, K., Johannessen, M., Basnet, P., Vanic, Z., Skalko-Basnet, N., 2019. Liposomes augment biological benefits of curcumin for multitargeted skin therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 144, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.09.016>.
- Thangapazham, R., Sharma, A., Maheshwari, R., 2007. Beneficial role of curcumin in skin diseases. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease* 595, pp. 343–357. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_15.
- Thatipamula, R., Palem, C., Gannu, R., Mudragada, S., Yamsani, M., 2011. Formulation and *in vitro* characterization of domperidone loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *DARU* 19 (1), 23–32.
- Vater, C., Hlawaty, V., Werdenits, P., Cichon, M.A., Klang, V., Elbe-Bürger, A., Wirth, M., Valenta, C., 2020. Effects of lecithin-based nanoemulsions on skin: short-time cytotoxicity MTT and BrdU studies, skin penetration of surfactants and additives and the delivery of curcumin. *Int. J. Pharm.* 580, 119209. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119209>.