



Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

**Aportación al comportamiento de
curcumina en la bicapa de
liposomas mediante un estudio
calorimétrico: influencia sobre
parámetros de estabilidad**

María Carlota García Molina



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Aportación al comportamiento de curcumina en la bicapa de liposomas mediante un estudio calorimétrico: influencia sobre parámetros de estabilidad.

ALUMNA: María Carlota García Molina

TUTORA: Doña María Luisa González Rodríguez

TIPO DE PROYECTO: Experimental

PRESENTACIÓN: Facultad de Farmacia

FECHA: 15/06/2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. **María Luisa González Rodríguez** y al Dr. **Antonio María Rabasco Álvarez** por brindarme la oportunidad de poder formar parte de su grupo de investigación, poder conocer este mundo con ellos y por transmitirme parte de su sabiduría.

Al Dr. **Juan Manuel Ginés** por su dedicación a la hora de enseñarme el manejo de la microscopía en platina caliente con tanta paciencia. Al igual, agradecer a todos los compañeros y profesores que me han acompañado en estos meses de laboratorio.

Y como no, agradecer a **Ana Fernández Romero** que ha sido un gran apoyo en estos meses ya que sin ella esto hubiera sido mucho más difícil. Muchas gracias Ana, por confiar en mí y darme fuerzas en todo momento.

Y por último a mi familia, por su apoyo incondicional y por enseñarme a ser perseverante, sin vosotros tampoco hubiera sido posible.

Y en general a todos los que me habéis ayudado. Muchas gracias

RESUMEN

La curcumina es un polifenol que se obtiene de la raíz de *Curcuma longa* y al cual se le atribuyen numerosas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas, entre otras. Por esto, se trata de un potencial fármaco que puede ser empleado para el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes o que cursen con inflamación, como es el caso de la osteoartritis.

Sin embargo, esta molécula tiene unas características que la hacen ser muy inestable y muy poco biodisponible, por lo que buscar una manera de administración que aumentara la estabilidad, así como la biodisponibilidad, es algo primordial, y un posible buen método para que esto ocurra, es la formación de liposomas.

Con el objetivo de hacer un estudio exhaustivo de la curcumina y de sus propiedades, se realizó una búsqueda bibliográfica de todos los aspectos que afectan a la estabilidad de la curcumina, como pH, temperatura, luz y tiempo de almacenamiento. Además, también se llevó a cabo una búsqueda sobre su acción como antiinflamatoria y antioxidante.

Una vez evaluadas estas características, se procedió a la formación de los liposomas, incluyendo en su composición diferentes agentes de carga, como fueron el DDAB y la EA, observándose un cambio de color muy notorio en el *film* de los liposomas.

En base a este hecho, se pensó que el único componente que distinguía a los liposomas, es decir, el agente de carga, podía estar interfiriendo de algún modo en la curcumina. Ello llevó a estudiar los liposomas de forma más profunda, para lo cual se realizaron estudios de calorimetría, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía en platina caliente (HSM), ambas complementarias. Además, se pensó que si el agente de carga modificaba el color del liposoma, también podría estar modificando la estabilidad del mismo en el tiempo. Por este motivo, se realizó un estudio de la estabilidad durante un mes. En este estudio, se midieron diversos parámetros que determinan la estabilidad de los liposomas, como el tamaño, el índice de polidispersión (PDI), el potencial zeta, la eficacia de encapsulación y la capacidad antioxidante.

Con todo esto, se concluyó que el agente de carga juega un papel fundamental en las características del liposoma, y que tras este análisis exhaustivo, el DDAB es el que en este caso estabiliza y mantiene durante más tiempo las beneficiosas propiedades de la curcumina.

Palabras clave: curcumina, liposomas, capacidad antioxidante, DSC, HSM, estabilidad.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Curcumina	5
1.1.1. La curcumina como antioxidante	5
1.1.2. Estabilidad de curcumina	6
1.2. Liposomas.....	11
1.3. Curcumina en liposomas	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Materiales	14
3.2. Equipos	14
3.3. Elaboración de los liposomas	15
3.4. Calorimetría diferencial de barrido	16
3.5. Microscopía en platina caliente (HSM)	17
3.6. Estudio de estabilidad de los liposomas de curcumina	17
3.6.1. Tamaño y carga vesicular	18
3.6.2. Eficacia de encapsulación de curcumina mediante HPLC	18
3.6.2. Capacidad antioxidante de la curcumina	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. Análisis calorimétrico	21
4.1.1. Muestras de curcumina.....	22
4.1.2. Muestras con curcumina y EA.....	24
4.1.3. Muestras con curcumina y DDAB.....	27
4.2. Estudio de estabilidad de los compuestos	29
5. CONCLUSIONES	37
6. BIBLIOGRAFIA	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Curcumina

La curcumina, o 1,7-bis-(4-hidroxi 3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona ($C_{21}H_{20}O_6$), es un colorante amarillo natural que se obtiene del rizoma de la planta de la cúrcuma (*Curcuma longa*). A este polifenol se le atribuyen multitud de efectos beneficiosos, por sus propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes. Sin embargo, suele presentar una absorción muy baja cuando es administrada vía oral, debido a su baja solubilidad en agua (Kidd, 2009).

Su estructura molecular es simétrica, sin centros estereogénicos, que consiste en dos anillos fenólicos unidos por una dicetona insaturada, como se aprecia en la figura 1. Además, la molécula se encuentra en equilibrio ceto-enólico de forma que, dependiendo del medio en el que se encuentre, predomina la forma ceto si está en medio neutro o ácido, y la forma enólica si se encuentra en medio básico (Gonçalves et al., 2017).

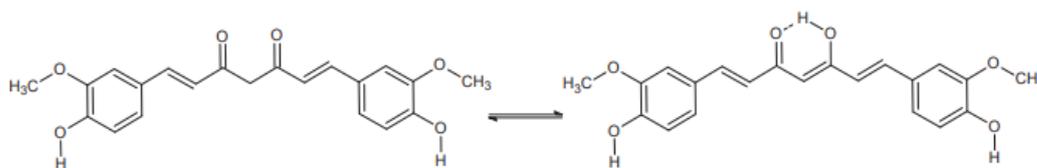


Figura 1. Equilibrio ceto-enólico de la curcumina (Elguero, 2015).

La curcumina es muy utilizada actualmente debido a sus propiedades antiinflamatorias como consecuencia de la regulación a la baja del factor nuclear-kB (NF-kB), es decir, se forman menos receptores, por lo que así disminuye la inflamación. Además de ser un potente antiinflamatorio, se considera también un potente agente antiproliferativo a la par que un buen antioxidante a bajas dosis (Ravindran et al., 2010).

1.1.1. La curcumina como antioxidante

El estrés oxidativo es un fenómeno muy habitual que produce daños en nuestro organismo debido a la producción de radicales libres. Un radical libre es un átomo que tiene un electrón libre, por lo que son muy reactivos y tienden a captar un electrón de otras moléculas que son estables con el fin de alcanzar su propia estabilidad química. Estos radicales libres en una concentración adecuada constituyen un mecanismo de defensa frente a patógenos externos como pueden ser los microorganismos (Nelson & Cox, 2005). El problema radica cuando estas

concentraciones de radicales libres aumentan por encima de una concentración que el organismo ya no puede tolerar y, por lo tanto, se produce estrés oxidativo, dañándose estructuras biológicas como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas.

El mecanismo de acción de los antioxidantes, en general, consiste en ceder tanto un electrón o, en otros casos, un protón para así estabilizar estas especies reactivas. La curcumina es un potente antioxidante que, como otras muchas otras moléculas antioxidantes, tiene la capacidad de prevenir o retardar la oxidación de un sustrato, así como en algunos casos revertir la oxidación ya producida.

Esta propiedad antioxidante de la curcumina se podría pensar que se debe a algunos de sus metabolitos; sin embargo, estudios han verificado que la capacidad antioxidante de sus metabolitos es nula una vez metabolizada la curcumina (Choudhury et al., 2015). Se ha visto que esta propiedad antioxidante se debe sobre todo a los grupos fenólicos, ya que son capaces de influir sobre la expresión de enzimas relacionadas con reacciones redox, como la glutatión sintasa y la citocromo P-450 oxidasa, neutralizando de esta manera las especies reactivas de oxígeno (Zheng et al., 2017).

1.1.2. Estabilidad de curcumina

1.1.2.1. Estabilidad con el pH

La curcumina presenta una estabilidad muy baja ante variaciones de pH, ya que se descompone muy rápidamente a pH 8. Asimismo, se puede afirmar que el intervalo de pH de máxima estabilidad oscila entre 3 y 6 (Wang et al., 1997), como se observa en la figura 2.

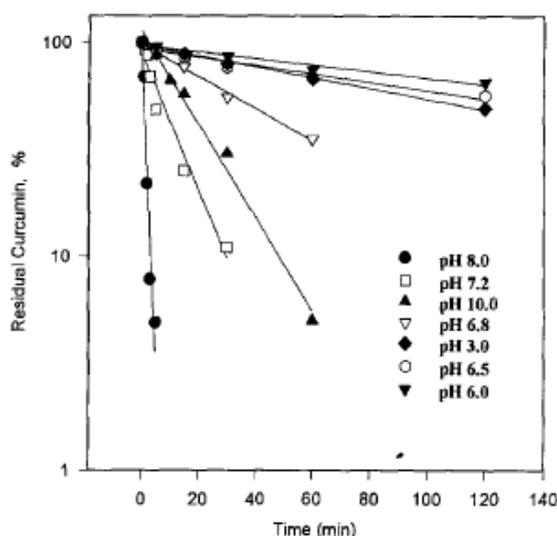


Figura 2. Degradación de la curcumina en función del pH (Wang et al., 1997).

Esta estabilidad a pH relativamente ácido se cree que puede ser debido al dieno que se forma a estos pH, el cual en medios neutros y básicos no se produce debido a la desprotonación que sufren los grupos hidroxilos (Elguero, 2015). Además, se ha observado que la velocidad de degradación se incrementa a partir de pH 7. Este efecto se ha podido dilucidar en diversos estudios que analizan la variación en la absorbancia de muestras almacenadas en soluciones a diferentes valores de pH, observándose un descenso acusado de la misma con el tiempo en valores de pH superiores a 7 (Figura 3).

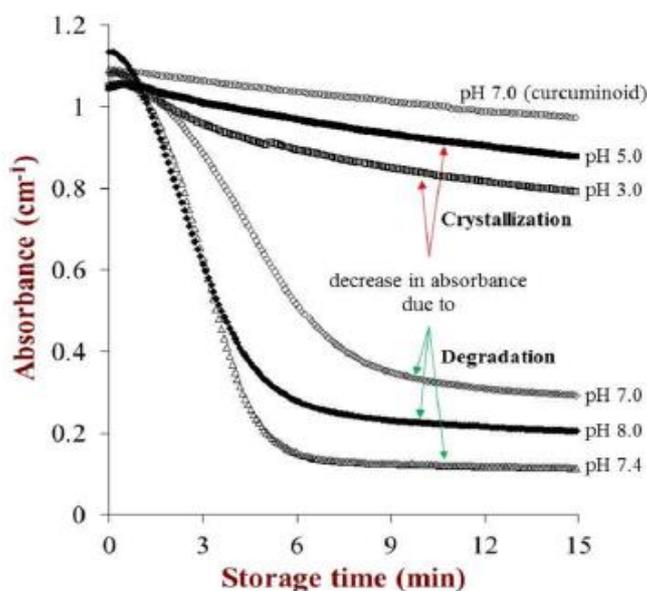


Figura 3. Estabilidad de curcumina con el pH (Kharat et al., 2017)

En cuanto a la absorbancia, se puede apreciar que al inicio de las curvas la absorbancia es mayor en soluciones alcalinas que en aquellas que son ácidas. Según se confirma en algunos estudios, la justificación a esto puede deberse a que a pH alcalino se forman productos de condensación que le otorgan una coloración más oscura que rápidamente vuelve a cambiar y, por ello, la absorbancia disminuye. Sin embargo, la absorbancia a pH ácidos disminuye de manera mucho más lenta y esto se debe a que la curcumina como hemos dicho anteriormente es algo más estable a pH más ácidos (Kharat et al., 2017).

También como se puede observar en la figura 3, el proceso de degradación ocurre de manera muy acusada, hecho que no se observa en la cristalización.

1.1.2.2. Estabilidad en solución

Esta cinética de degradación de curcumina observada en la figura 3 a partir de un pH determinado, que se manifiesta más acusada a pH neutros o alcalinos, también varía según el medio en el que se encuentre disuelta.

En medio acuoso, la curcumina se degrada en vainillina, ácido ferúlico, feruloilmetano y acetona de manera considerablemente rápida (Figura 4). Sin embargo, este proceso de degradación se ralentiza en medios orgánicos, por lo que se puede afirmar que este polifenol es más estable en este tipo de medios.

En cuanto a la tautomería, en medio acuoso se diferencian dos picos en el espectro de absorción visible: uno correspondiente al grupo enol (427 nm) y otro correspondiente al grupo ceto (360 nm). En agua, estas formas tautoméricas se mantienen en equilibrio. Sin embargo, cuando se adiciona un solvente orgánico como etanol, el pico del grupo ceto va disminuyendo, pudiendo llegar incluso a desaparecer (Mondal et al., 2016). Este fenómeno se puede visualizar en la figura 5.

Además, en tampones fosfatos salinos, se ha determinado que curcumina es mucho más estable a la degradación, y dicha estabilidad se incrementa aún más cuando se le adiciona suero humano o sangre (Lestari e Indrayanto, 2014).

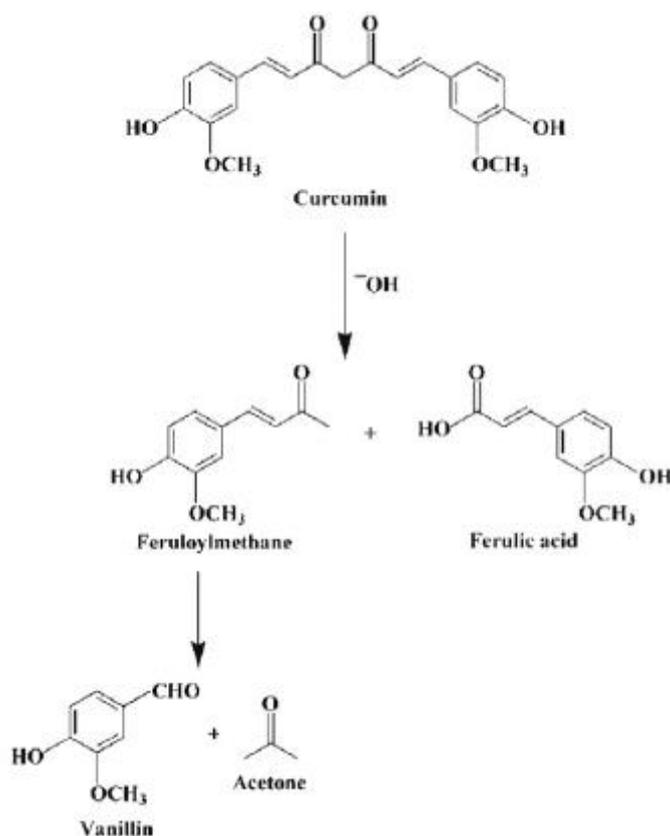


Figura 4. Degradación de la curcumina en medio acuoso (Mondal et al., 2016).

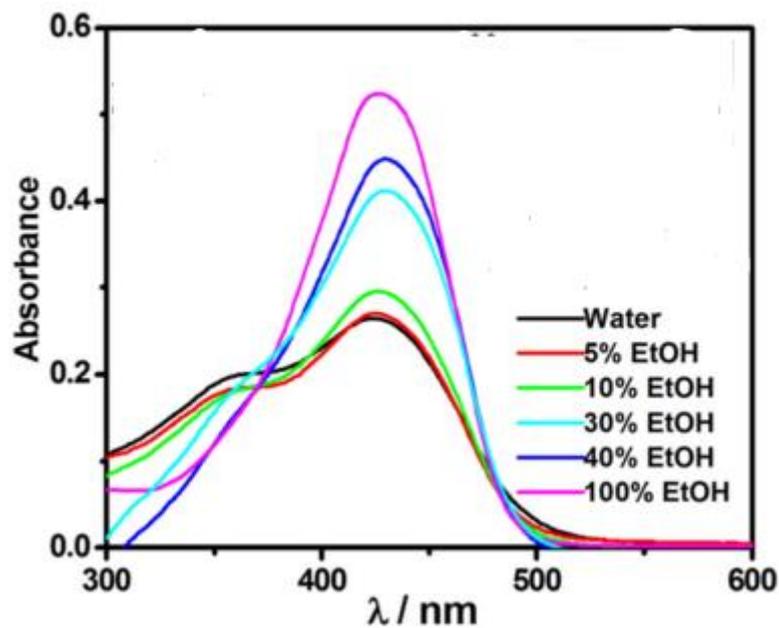


Figura 5. Espectros de absorbancias de curcumina en diferentes solventes (Mondal et al., 2016).

1.1.2.3. Estabilidad frente a la temperatura

Según diversos estudios, la curcumina, además de ser muy vulnerable al pH, se ve también muy afectada por la temperatura. De su estructura, los puentes dicarbonílicos representan las estructuras mayormente alteradas por este parámetro, siendo el primer carbono de la cadena alquilo que conecta a los catecoles el más sensible al calor.

A este respecto, son interesantes las aportaciones de algunos autores, que han observado que la curcumina es estable hasta los 70 °C tras la exposición durante 10 min; sin embargo, superando los 100 °C, la curcumina comienza a degradarse por completo, siendo su punto de fusión de 183 °C (Lestari e Indrayanto, 2014).

Se ha estudiado que a temperaturas en torno a 180 °C, la curcumina se degrada rápidamente en diferentes compuestos, algunos de ellos volátiles, como es el caso de la vainillina, el guayacol y el isoeugenol, aunque el compuesto mayoritario de su degradación es el 4-vinilguayacol. Dicha degradación se basa en una reacción de descarboxilación que se ve favorecida por el aire y la temperatura.

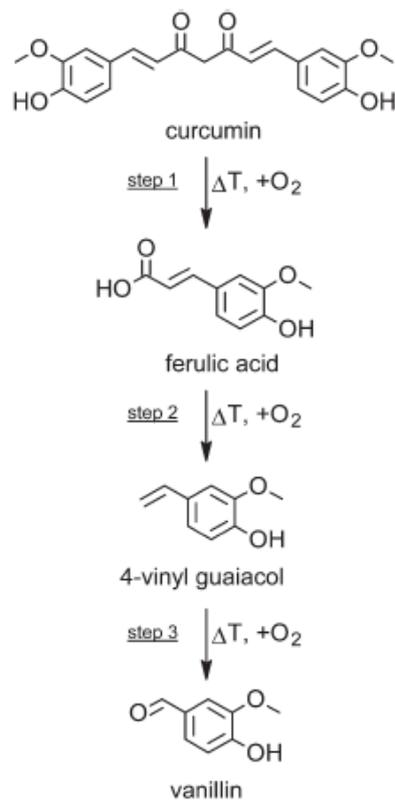


Figura 6. Esquema de la degradación de la curcumina a una temperatura de 180 °C (Esatbeyoglu et al., 2015).

También se ha visto que a esta temperatura, a los 5 minutos de iniciado el proceso de calentamiento, únicamente queda un 30% de la curcumina inicial, mientras que el resto se ha degradado a otros compuestos, lo cual sugiere que estos compuestos pueden llegar a tener un gran interés en la bioactividad de la curcumina. Efectivamente, algunos autores han demostrado que la activación del factor de transcripción Nrf2 adquiere un papel relevante en cuanto a la actividad antioxidante de la curcumina, ya que disminuye el estrés oxidativo. Esta activación de este factor se ha visto muy favorecida en modo dosis-dependiente cuando se ha usado curcumina a estas altas temperaturas, por lo que podríamos atribuirle esta actividad, sobre todo al 4-vinil-guaiacol (Esatbeyoglu et al., 2015).

1.1.2.4. Estabilidad fotoquímica

La curcumina, al igual que ante otras condiciones, también es inestable a la luz solar. Diversos estudios han demostrado que este compuesto, disuelto en metanol o etanol, se degrada totalmente tras 120 h de exposición a la luz (longitud de onda de 400-510 nm) siguiendo una cinética de primer orden. Dicha degradación da lugar a los compuestos anteriormente referidos: vainillina, ácido ferúlico y 4-vinil-guaiacol (Mangolim et al., 2014).

Además, se ha visto que si estas soluciones se dejan secar hasta obtener una fina película, esta degradación pasa a tener una cinética de segundo orden. Esto hace que en la solución fuera más estable en metanol y ahora en seco sea menos estable, esto puede deberse a que se genere el producto de ciclación de la curcumina. Además, es muy recomendable realizar los estudios pertinentes empleando material de vidrio topacio (Lestari y Indrayanto, 2014).

1.2. Liposomas

Desde hace unos 30 años aproximadamente, el uso de liposomas en terapéutica se propone como estrategia debido a las ventajas que aportan como sistemas vectores de moléculas activas y como sistemas moduladores de la liberación, lo que redundaría en un aumento de la biodisponibilidad del fármaco en el organismo consiguiendo aumentar el efecto incluso disminuyendo las dosis del mismo (www.lipomize.com).

Se trata de vesículas micro- o nanoscópicas que presentan una bicapa, generalmente formada por fosfolípidos, que constan de una parte hidrosoluble y otra liposoluble, por lo que pueden encerrar en su interior tanto sustancias lipófilas como hidrófilas, quedando ubicadas las sustancias lipófilas en la membrana lipídica y los fármacos hidrófilos en el compartimento acuoso del liposoma (Figura 7).

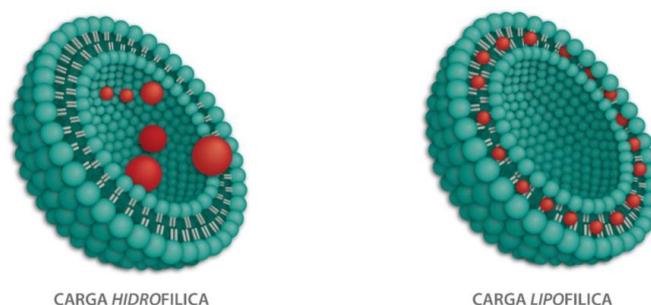


Figura 7. Estructura de un liposoma. (www.lipomize.com)

Los liposomas los podemos clasificar según su número de capas, según la forma de obtención y por su tamaño. En cuanto a la clasificación por el número de capas y por el tamaño, éstos se dividen en:

- Unilaminares: contienen únicamente una bicapa y a su vez pueden dividirse en vesículas de pequeño diámetro que son los denominados SUV y vesículas de gran diámetro que son los que se conocen como LUV. Son estos últimos los que mayor capacidad de almacenamiento interno tienen.

- Multilaminares: se disponen más de una bicapa lipídica y su tamaño varía entre 0.1 a 10 micrómetros; son los llamados MLV.

En el campo de la Tecnología Farmacéutica, los unilaminares son generalmente los más utilizados.

En la figura 8 se recoge una ilustración de la clasificación de los liposomas en función de su tamaño y su número de capas.

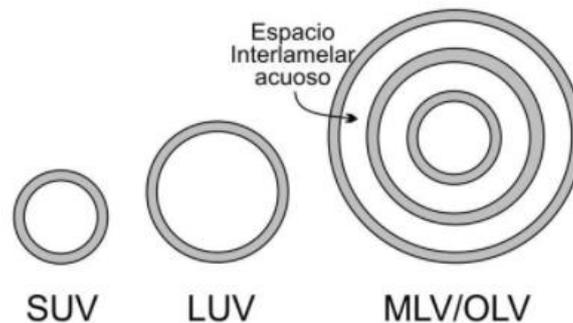


Figura 8. Tipos de liposomas (www.lipomize.com)

La adecuación de los liposomas como vehículos de fármacos depende tanto de la naturaleza de sus componentes así como del tamaño y de la carga eléctrica superficial de los mismos. Las propiedades eléctricas de la superficie de los liposomas pueden tener una gran influencia sobre la estabilidad del liposoma. Esto ocurre en liposomas con carga neutra, estos tienden a agruparse y por lo tanto pierden estabilidad. Además, uno de los mecanismos de liberación del fármaco es a través de la fagocitosis por medio de células como los macrófagos. Es por esta razón por la que debemos añadir una carga positiva a los liposomas, que además de contrarrestar la carga negativa que proporciona la fosfatidilcolina, otorgue más carga positiva. Además, esta carga positiva proporciona repulsión entre los liposomas por lo que produce una repulsión electrostática evitando que se aglomeren. Esta carga positiva se puede añadir gracias a componentes como la estearilamina (EA) y al bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB) (Bozzuto y Molinari, 2015).

En cuanto al colesterol, este componente se añade también para estabilizar, ya que reduce la permeabilidad del liposoma. Es decir, provoca un empaquetamiento de los fosfolípidos impidiendo su transferencia a lipoproteínas tanto de alta como de baja densidad (Bozzuto y Molinari, 2015).

1.3. Curcumina en liposomas

La curcumina, como se ha mencionado anteriormente, es muy inestable a diversos parámetros. Ello, junto a su biodisponibilidad muy baja, hace que se hayan desarrollado diversas estrategias para mejorar sus propiedades, entre las cuales destacan la formación de nanopartículas, nanogeles y liposomas, entre otras.

En cuanto a la formación de liposomas de curcumina, se ha demostrado que éstos mejoran las características de la curcumina, haciéndola en principio más biodisponible y más estable. Mayoritariamente, la curcumina se encuentra en la zona lipídica en el liposoma (Yallapu et al., 2012)

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El planteamiento de este trabajo de investigación ha surgido a raíz de un estudio del grupo de investigación, basado en la utilización de liposomas con curcumina como fármaco para el tratamiento de la osteoartritis.

Tras la visualización de las diferencias en el color de los *films* de los liposomas, se dedujo que había un componente que estaba modificando algunas de las propiedades de la curcumina y con ello se podría ver afectada la estabilidad.

Es por esto, que el objetivo de este trabajo es analizar el comportamiento de la curcumina cuando forma parte de las películas lipídicas en la formulación de liposomas, así como evaluar la posible existencia de alguna interacción posible entre la curcumina y el único componente que varía en los liposomas, que es el agente de carga, que pueda afectar a la estabilidad de los mismos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La revisión bibliográfica de artículos científicos se realizó consultando las bases de datos *MedLine*, *Web of Science*, *Pubmed*, en los idiomas español e inglés. Se comenzó buscando por palabras clave, acotando la búsqueda con otras palabras. No se hicieron restricciones respecto al tipo de estudio. Se revisaron los *abstracts* y en los casos necesarios, los artículos completos, teniéndose en cuenta finalmente todos los artículos que incluían recomendaciones sobre cribado de agudeza visual y eliminando el resto.

3.1. Materiales

Los productos utilizados en la realización del presente estudio fueron los siguientes:

- Acetonitrilo calidad HPLC (Panreac)
- Ácido acético calidad para análisis (Panreac)
- Agua destilada y agua miliQ
- Bromuro de didodecildimetilamonio, DDAB (Sigma-Aldrich)
- Cloroformo estabilizado con etanol, calidad análisis (Panreac)
- Colesterol 95% GC, Cho (Sigma-Aldrich)
- Curcumina, Cur (Sigma-Aldrich)
- Etanol absoluto calidad análisis (Panreac)
- Fosfato disódico (Panreac)
- Fosfato potásico (Panreac)
- Hidróxido sódico calidad para análisis (Panreac)
- Laurilsulfato sódico (Panreac)
- L- α -Fosfatidilcolina de huevo, PC (Sigma-Aldrich)
- Metanol calidad HPLC (Panreac)
- Octadecilamina o estearilamina, EA (Sigma-Aldrich)
- Trolox (Sigma- Aldrich)
- ABTS (Sigma- Aldrich)

3.2. Equipos

Las siguientes técnicas fueron realizadas gracias a los equipos que se mencionan a continuación:

- Agitador magnético *IKA RT10*
- Balanza analítica de precisión *Dhaus Explorer Pro*
- Bomba de vacío *Millipore*

- Cromatógrafo de líquidos HPLC *Hitachi Elite LaChrome*
- Filtro Nylon 0.45µm *RephiQuik*
- Micropipetas de volumen variable 0-10 µL, 100-1000 µL y 500-5000 µL *Easy 40+ Labbox*
- Micropipeta de volumen variable 20-200 µL Sartorius.
- Rotavapor *Buchi R210*
- Sistema de filtración a vacío *Millipore*
- Sonicador *VWR Ultrasonic Cleaner*
- Vortex *Velp Scientifica ZX3*
- Z-sizer *Malvern Instruments*
- DSC *Setaram*

3.3. Elaboración de los liposomas

Como se ha referido en la memoria, el objetivo central del trabajo consiste en esclarecer el comportamiento de curcumina ubicada en la bicapa lipídica de los liposomas.

Para ello, se recurre a una técnica común de formación de MLV, que consiste en la hidratación mediante agitación de una película lipídica la cual se ha formado previamente por evaporación de una solución de los lípidos con un solvente orgánico. Una vez formados estos MLV, se pueden tratar mediante sonicación o extrusión para formar liposomas unilaminares, tanto SUV como LUV (Lanio et al. 2009).

Para elaborarlos, se añadieron los siguientes compuestos en las cantidades que se especifican: colesterol (12.41 µmol), fosfatidilcolina (64.84 µmol), curcumina (2.71 µmol) y estearilamina (14.84 µmol) o DDAB (14.84 µmol) como agentes de carga.

Siguiendo esta técnica, en primer lugar se procedió a pesar los componentes en un matraz de fondo redondo (balanza de precisión, Explorer Pro), seguido de su disolución en 3.8 mL de metanol y 4.2 mL de cloroformo. Una vez disuelto, se llevó a cabo la eliminación de los solventes orgánicos mediante rotaevaporación con vacío y a una temperatura de 58 °C, que es una temperatura superior a la temperatura de transición de los lípidos. Con esta técnica se

asegura que el disolvente se elimina de forma homogénea en toda la superficie de la película, de manera que así se evita la cristalización de los componentes. Así se consigue la formación de una fina película lipídica que se va depositando en las paredes del matraz.

A continuación se procedió a hidratar esta fina capa lipídica con la fase acuosa, tal y como se describe en todo proceso de elaboración de liposomas (Maestrelli et al., 2005), (Allen et al., 1989). En este caso se utilizó PBS a un pH de 6.5. Para ello, se sometió el preparado a 3 ciclos de agitación en vórtex durante 1 minuto intercalados con 5 minutos en baño termostatizado a 58 °C hasta la obtención de un producto de color amarillento- anaranjado en el que se encuentran dispersos los liposomas. Finalmente, se procedió a su conservación a 4 °C hasta su posterior uso. Los lotes elaborados se recogen en la tabla 1.

LIPOSOMA (3 mL)	FOSFATIDILCOLINA	COLESTEROL	AGENTE DE CARGA	CURCUMINA
Curcumina	49.8 mg	4.8 mg	_____	1 mg
EA + CURC	49.8 mg	4.8 mg	4 mg de EA	1 mg
DDAB + CURC	49.8 mg	4.8 mg	6.86 mg de DDAB	1 mg

Tabla 1. Composición de liposomas.

3.4. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (también conocida como DSC, *Differential Scanning Calorimetry*), es una técnica termoanalítica utilizada para detectar transiciones endotérmicas y exotérmicas, así como la determinación de temperaturas de transformación y la entalpia de sólidos y líquidos. Esta técnica se ha empleado en el presente trabajo de investigación con el objeto de indagar el comportamiento de curcumina durante el proceso de elaboración de los liposomas en las diferentes etapas y en combinación con EA y DDAB. Estudios previos realizados en el laboratorio con diferentes formulaciones demostraron que los compuestos de interés en los cuales hay que centrar la investigación fueron curcumina, estearilamina y DDAB).

El ensayo se realizó añadiendo un peso aproximado de 10 mg al portamuestras y tomando el aire como referencia. La velocidad de calentamiento fue de 33 K/min.

Las muestras a analizar fueron Cur, EA y DDAB comerciales, mezclas físicas Cur-DDAB (1:6,86 p/p) y Cur-EA (1:4 p/p) y la mezcla de componentes tratados según el método de fabricación de los liposomas. Para ello, los sólidos correspondientes se disolvieron en 3.8 mL de metanol y

4.2 mL de cloroformo y, posteriormente, se evaporaron a 58 °C con vacío. Para asegurar la total evaporación de los disolventes, las muestras se mantuvieron en desecador durante 24 h. De esta técnica, se van a analizar las entalpías de cada uno de los componentes por separado, así como las temperaturas de fusión de cada uno de ellos. Con esto se intenta conseguir determinar la posible interacción que se puede estar dando entre los componentes. Estos resultados se van a presentar en una gráfica en la que se representa el flujo de calor frente a la temperatura de la muestra. Con esto se consiguen observar los picos endotérmicos, en los que la mezcla se funde, y también los picos exotérmicos, los cuales normalmente determinan una recristalización.

3.5. Microscopía en platina caliente (HSM)

Esta técnica se basa en el calentamiento gradual de la muestra a estudio gracias a una platina caliente que va aumentando la temperatura a una velocidad constante, mientras la muestra se va observando al microscopio óptico. Gracias a esta técnica, se puede ver el comportamiento de los sólidos con la temperatura y esclarecer algún fenómeno recogido en el DSC. Se trata de técnicas complementarias.

Para la realización de estas pruebas, se colocó en un portaobjetos una fina capa del producto a analizar y se procedió a su calentamiento. En cuanto a las muestras que contenían DDAB, la temperatura de inicio se fijó a 40 °C, mientras que para las muestras con curcumina y la mezcla de curcumina y EA se fijó una temperatura de inicio de 80 °C. Esto se hizo así teniendo en cuenta los picos tanto endotérmicos como exotérmicos que aparecieron en los termogramas del DSC.

Asimismo, y en base a los DSC obtenidos, se realizó una prueba únicamente al DDAB para la determinación de agua en el producto. Esto se llevó a cabo añadiendo a la fina capa de polvo una gota de vaselina líquida y se siguió el mismo procedimiento de calentamiento.

De esta técnica, al igual que del DSC, se intenta averiguar las temperaturas a las que funden los distintos compuestos así como su comportamiento cuando contactan los diferentes compuestos. Los resultados de esta técnica se van a poder visualizar en una serie de videos.

3.6. Estudio de estabilidad de los liposomas de curcumina

Para el estudio de estabilidad de los liposomas, tanto de aquellos que llevan solo curcumina como de las combinaciones curcumina – EA y curcumina - DDAB, se usaron los liposomas anteriormente descritos y se dividieron en 5 viales diferentes para poder evaluar su integridad

y su comportamiento con el paso del tiempo. Así, la primera muestra se tomó el mismo día que se prepararon los liposomas (tiempo 0), la segunda muestra a la semana (tiempo 1), la tercera dos semanas después de la elaboración (tiempo 2), la cuarta muestra a las tres semanas (tiempo 3) y la quinta muestra a las cuatro semanas (tiempo 4).

A estas cinco muestras se les realizaron diferentes ensayos, unos con el fin de caracterizar distintos parámetros propios de las vesículas y otros inherentes a la molécula encapsulada, curcumina. Tales ensayos se describen a continuación.

3.6.1. Tamaño y carga vesicular

El tamaño de las vesículas se determinó por espectroscopía de correlación fotónica. Esta técnica analiza la intensidad de la luz dispersada en intervalos de tiempo de milisegundos, de forma que es el movimiento browniano de las partículas el que origina la amplitud del espectro, estando dicha intensidad relacionada con el tamaño y la forma de las mismas. Esta técnica permite determinar el radio hidrodinámico de las partículas o coloides, así como su índice de polidispersión, el cual es indicativo de la distribución de tamaños presentada por la muestra.

En cuanto a las propiedades eléctricas de la superficie de los liposomas, sabemos que estas pueden tener gran influencia sobre la estabilidad física de la dispersión coloidal. El potencial zeta es una medida de la carga que se encuentra en la superficie de las partículas en suspensión. Este parámetro es muy importante en los preparados coloidales tales como los liposomas ya que determina el grado de estabilidad de la dispersión, de forma que el sistema coloidal será más estable cuando mayor sea la fuerza de repulsión entre las partículas.

El equipo empleado fue un Zetasizer Nano ZS (Malvern). Para ello, se tomaron 200 μL de muestra que se diluyeron con 3.8 mL de fase acuosa que, en nuestro caso, fue PBS; tras un correcto mezclado, se añadió la muestra a las diferentes cubetas de medición.

3.6.2. Eficacia de encapsulación de curcumina mediante HPLC

Este parámetro es indicativo de la integridad de las vesículas con el tiempo, ya que mide la cantidad de curcumina encapsulada en los liposomas. Por regla general, el fármaco tiende a salir del mismo con el tiempo.

Para ello, un volumen de 700 μL de la muestra se centrifugó durante 60 min a 11000 rpm y a una temperatura de 4 °C. Una vez finalizado el proceso, se recogió el sobrenadante y se le

añadió hasta llegar a 2 mL de PBS, filtrándose a continuación para su posterior cuantificación en curcumina por HPLC.

En cuanto al sedimento del centrifugado, éste se recogió y se le añadieron 3 mL de lauril sulfato sódico con el fin de destruir las vesículas con este tensioactivo. Para ello, se sometieron las muestras a 3 ciclos de 10 minutos en sonicador y 1 minuto en vortex. Una vez finalizados los ciclos, la muestra se filtró y se puso en un vial de HPLC para la determinación de curcumina.

La determinación de curcumina se realizó siguiendo el método propuesto (Musfiroh et al., 2013). La columna empleada fue una columna Agilent Zorbax SB C-18 4.6x150 mm, la fase móvil fue una combinación de acetonitrilo: ácido acético 2 % 50:50 v/v, el flujo se fijó en 1.2 mL/min, el volumen de inyección fue de 20 µL y la longitud de onda fijada en 420 nm.

3.6.2. Capacidad antioxidante de la curcumina

Para determinar la capacidad antioxidante de la curcumina a lo largo de las 4 semanas, se empleó la técnica de ABTS^{•+}, que se basa en la degradación o en el secuestro de este catión radical debido a su interacción con nuestra sustancia a estudiar.

Para este ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos en las que se prepararon diversas diluciones de las muestras y se mezclaron con el radical catiónico, midiendo la absorbancia a 734 nm transcurridos 6 minutos de reacción. Como control positivo se usó Trolox, que es un derivado hidrosoluble de la vitamina A.

El procedimiento a seguir se recoge en las siguientes etapas:

1. Preparación de una solución madre de ABTS (1.536 mg/mL), disolviendo 6.6 mg de persulfato potásico y 38.4 mg de ABTS en 25 mL de agua destilada, dejando madurar la solución en nevera y oscuridad durante 16 horas, para así formar el radical catiónico.
2. Preparación de la solución estándar de ABTS^{•+} a partir de la solución madre, a una concentración de 0.14 mg/mL en etanol absoluto.
3. Preparación de la solución de Trolox a una concentración de 10.5 mg/mL.
4. Preparación de las diluciones, las cuales se recogen en la tabla 2.

Dilución	Muestra (μl)	Etanol (μl)
Puro	100	0
1 de 2	50	50
1 de 5	20	80
1 de 10	10	90
1 de 20	5	95
1 de 50	10	980
1 de 100	5	495

Tabla 2. Diluciones preparadas para el ensayo ABTS.

5. Muestras de liposomas a analizar. En cuanto a las muestras de liposomas, estas recibieron tratamientos diferentes con el fin de analizar la capacidad antioxidante tanto de la curcumina no encapsulada como del total encapsulado.

La cantidad total encapsulada se determinó destruyendo los liposomas añadiendo 1200 μl de lauril sulfato sódico seguido de 3 ciclos de 10 minutos en sonicador y 1 minuto en vortex.

Para la determinación de curcumina encapsulada, se partió de 1.2 mL de muestra. A ambos grupos se les sometió a un proceso de centrifugación durante 60 min a 11000 rpm y a una temperatura de 4 °C, recogiendo los sobrenadantes que fueron las muestras resultantes sobre las que se realizaron las diluciones y sobre las que se estudió el poder antioxidante.

6. De cada dilución, en cada pocillo de la placa se añadieron 10 μL de dilución, 90 μL de etanol absoluto y 100 μL de solución estándar de ABTS

7. Lectura de absorbancia a 734 nm, que es la longitud de máxima absorbancia del ABTS en el espectro visible.

Con esta técnica se analizará la capacidad antioxidante que tiene la curcumina y su evolución con el tiempo, a lo largo de un mes de estudio. Para ello, se representarán los valores de EC50 frente al tiempo en las distintas muestras evaluadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo de investigación que se presenta se plantea a raíz de unos resultados previos obtenidos por el grupo de investigación cuando se estaba llevando a cabo la formulación de liposomas catiónicos de curcumina empleando dos agentes de carga: EA y DDAB. Los

antecedentes de los que se parten se resumen a continuación. Durante la elaboración de los liposomas, los diferentes componentes de la bicapa se disuelven en una mezcla de cloroformo y metanol. En primer lugar, se ha observado una diferencia de color en el *film* lipídico debido a la presencia de uno u otro agente de carga, DDAB o EA. Aquellos lotes que llevan EA muestran una coloración de color rojizo en presencia de metanol que retorna a amarillo al adicionar cloroformo. Una vez se eliminan los disolventes, el *film* queda rojo como se puede apreciar en la imagen (Figura 9), independientemente de la nueva adición de cloroformo y posterior evaporación en caso de necesidad. Por el contrario, los lotes con DDAB, mantiene su coloración amarilla durante todo el proceso, no observándose cambios con la adición de metanol ni de cloroformo.



Figura 9. Film de liposomas, de izquierda a derecha: curcumina-EA (Cur- EA), Curcumina (Cur) y Curcumina-DDAB (Cur- DDAB).

La diferencia en la polaridad de los medios resultantes en cada etapa parece afectar a la ionización de la curcumina y, por tanto, a su coloración. La curcumina es una molécula muy poco soluble en agua, cuya solubilidad se ve afectada por el pH. Esto se debe al equilibrio cetoenólico que sufre la molécula, explicado ya en el apartado de introducción. En este equilibrio, la forma enólica tiene la capacidad de perder un protón a pH entre 7.5 y 8.5, sufriendo un cambio de color de amarillo a naranja cuando el pH supera este pKa (Sun et al., 2008).

4.1. Análisis calorimétrico

A pesar de que los cambios de color son fundamentalmente debidos a los cambios de pH, esto no puede ser explicado exclusivamente con esta teoría, ya que ambos agentes de carga afectan de manera diferente a la ionización de la molécula, por lo que se tiene que determinar si existe algún tipo de interacción entre los diferentes compuestos del film. Por esto se

procedió a realizar un estudio pormenorizado del comportamiento de la curcumina en presencia de cada uno de los agentes de carga.

4.1.1. Muestras de curcumina

La curcumina, por su estructura molecular, puede tener 4 formas polimórficas, que se denominan forma 1, 2, 3 y forma amorfa. Las formas 2 y 3 se conocen como formas ortorrómbicas, mientras que la forma 1 se conoce como forma monoclinica. Ésta forma es la más común en las presentaciones comerciales del compuesto (Lestari e Indrayanto 2014). La molécula en esta forma tiene un anillo tipo macrólido a través de puentes de hidrógeno con moléculas vecinas, resultando en una forma ligeramente retorcida sobre el eje horizontal. La formación de estos puentes de hidrógeno intermoleculares entre las propias moléculas de curcumina apenas deja libres átomos para la formación de puentes de hidrógeno con el agua, lo que explica su baja solubilidad. Por el contrario, las formas 2 y 3 son planas. También forman puentes de hidrógeno intermoleculares, pero la conformación del conjunto de moléculas es diferente (Kurniawansyah et al., 2017).

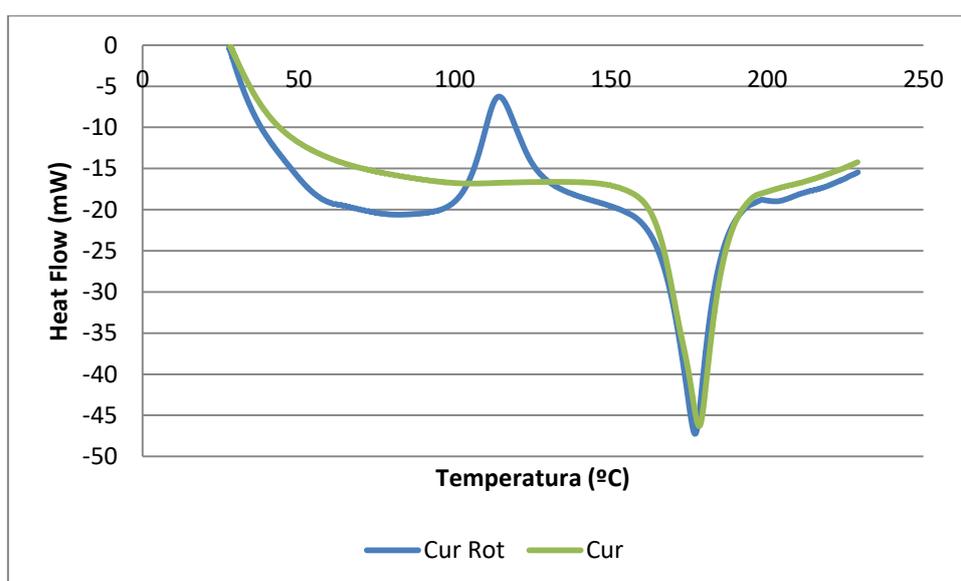


Figura 10. Termograma de la curcumina comercial y la curcumina rotaevaporada.

El estudio calorimétrico de la curcumina en polvo (Figura 10) muestra un único pico endotérmico a una temperatura de 178 °C, que corresponde al punto de fusión de la misma. En base a la bibliografía consultada, cada una de las diferentes formas polimórficas muestra gráficos de DSC ligeramente diferentes, correspondiendo este perfil a la forma 1 de la molécula, forma más habitual.

Por microscopía de platina caliente se pudo observar y comprobar que el punto de fusión de la curcumina, se encontraba en torno a los 180 °C.

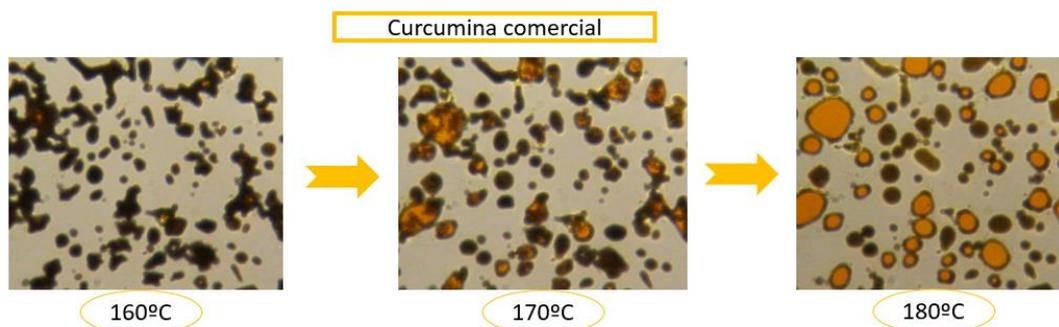


Figura 11. HSM de la curcumina comercial.

Cuando se disolvió el compuesto en metanol y cloroformo empleando las mismas proporciones que en la formación de liposomas (3.2 mL y 4.8 mL, respectivamente), el DSC cambia ligeramente. Sigue apareciendo el pico endotérmico a 176 °C que indica la presencia de forma 1 en el polvo; sin embargo, aparece también un pico exotérmico a 114 °C. Estos picos normalmente indican recristalizaciones del producto y suelen ir acompañados de un pico endotérmico previo. Por tanto, la aparición de este fenómeno indicaría que, al evaporarse el disolvente, la curcumina precipita a la forma polimórfica amorfa (Sanphui et al., 2011). Esta forma, al calentarse, recristaliza a forma I, que es la más estable de las tres. Además, si a esta misma muestra le realizamos un calentamiento lento, se puede apreciar de forma mucho más intensa un pico endotérmico a 60 °C.

Al igual que anteriormente, para corroborar este planteamiento, se realizó el ensayo de la muestra por HSM. Si bien los procesos de recristalización son difíciles de ver en este ensayo, en el análisis se apreció un ligero cambio de color a 120 °C, en el que estaba algo más naranja y se oscureció perdiendo el color anaranjado, lo que puede interpretarse como un reordenamiento de la estructura interna del sólido hacia una forma cristalina. Esto, junto con la bibliografía consultada, confirmaría la formación de un amorfo durante la evaporación de los disolventes y este fenómeno se debe a la rápida evaporación de los mismos durante el proceso evaporación.

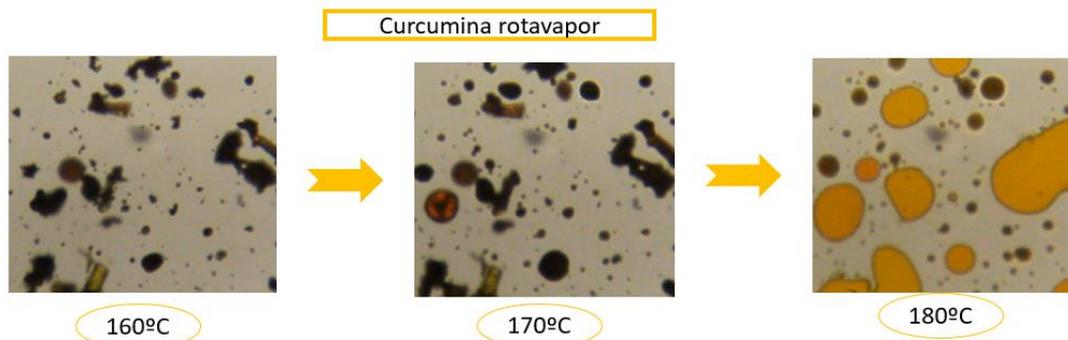


Figura 12. HSM de la curcumina rotavapor.

4.1.2. Muestras con curcumina y EA

La estearilamina (EA) es un lípido saturado con una amina cargada positivamente que proporciona carga positiva a los liposomas, cuya estructura molecular se recoge en la figura 13.



Figura 13. Estructura de la estearilamina (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

En nuestro estudio, se ha observado que cuando ambos compuestos se encuentran en solución cloroformo-metanol, hay un cambio de color de naranja a rojo ladrillo, lo que podría indicar una interacción entre ambos compuestos. Además, como se ha visto en otros estudios del grupo de investigación, cuando ambos se encuentran en la bicapa, la carga superficial de la misma desciende drásticamente sin importar la cantidad de EA o de curcumina presente.

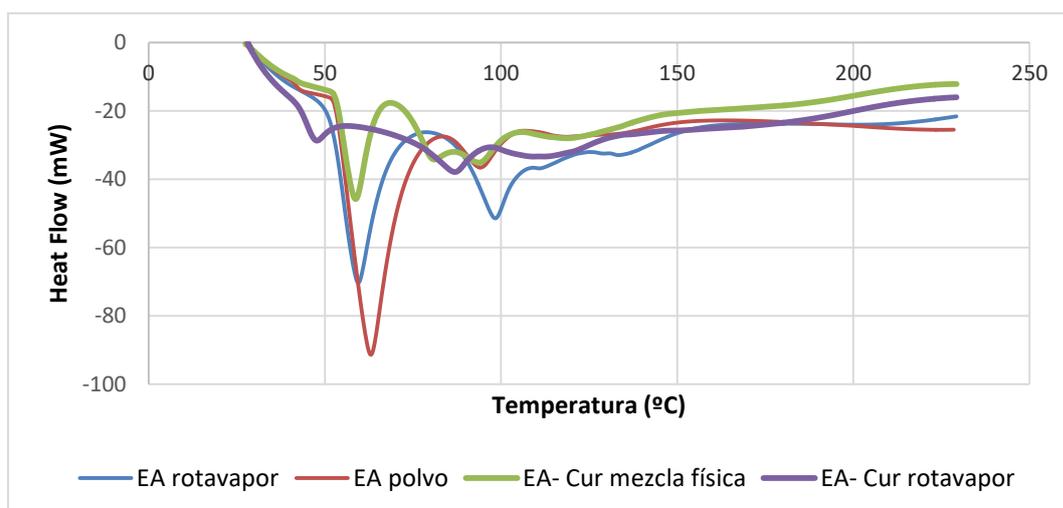


Figura 14. Termograma de EA comercial, EA rotavapor, mezcla física de EA-Cur y EA-Cur rotavapor.

Del estudio calorimétrico, en lo que corresponde a la EA polvo, se obtienen dos picos, ambos endotérmicos. El primero de ellos, a 62 °C correspondiente a la fusión del compuesto (Pandita et al, 2011). El segundo, a 92 °C, puede deberse a alguna impureza del producto (Sigma indica que la pureza del polvo es del 97%). Al realizar el HSM se observó una única temperatura de fusión a 60 °C, lo que concuerda con aquella extraída del termograma. Sin embargo, no se observó ningún otro fenómeno de fusión a los 90 °C, lo que confirmaría que este pico en el termograma no corresponde a la EA, sino a una impureza del polvo comercial.

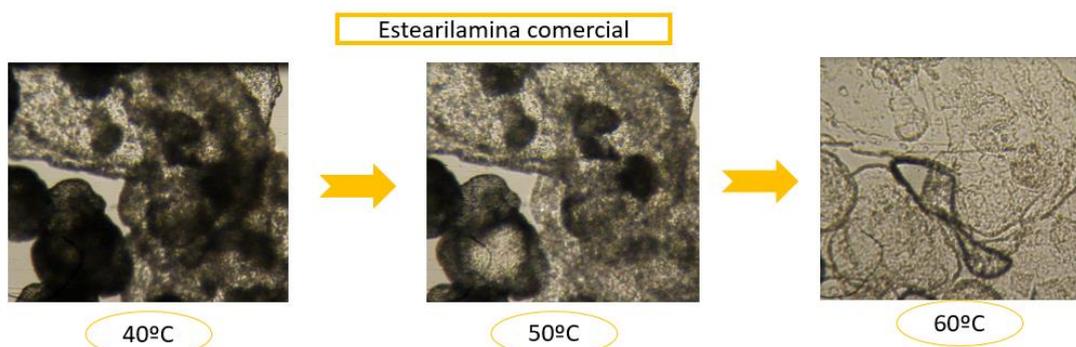


Figura 15. HSM de la EA comercial.

Para conocer el comportamiento de este lípido durante la formación de la película lipídica antes de formar los liposomas, también se realizó un estudio del compuesto precipitado por evaporación del disolvente. En este caso, se obtiene que la entalpía del primer pico disminuye mientras que la del segundo aumenta, lo que puede indicar, o bien una descomposición de la EA o bien un cambio a una forma polimórfica. Inicialmente, se consideró que la diferencia podía deberse al peso, pero la diferencia entre ambos pesos no era significativa. Además, se observa, junto al segundo pico, un pequeño valle que, inicialmente, no se tomó en consideración. Sin embargo, después de hacer precipitar la EA por eliminación del disolvente, este pico adquiere relevancia.

Para estudiar la interacción entre ambos compuestos, se hicieron dos ensayos, uno con la mezcla física de ambos y otro con la precipitación conjunta por evaporación del disolvente. Para realizar los ensayos se pesaron las mismas cantidades de curcumina y EA que corresponderían a la formulación de los liposomas. En el caso de la mezcla física, ambos polvos, libres de grumos, se mezclaron de forma manual hasta conseguir un color homogéneo. En el caso de la precipitación, se siguió el mismo protocolo anterior.

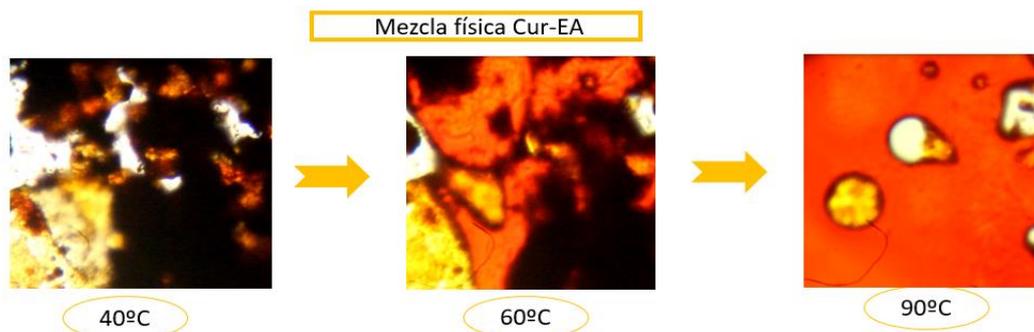


Figura 16. HSM de la mezcla física de Cur + EA

En la mezcla física, se observan 4 picos diferentes (Figura 14). La EA se adelanta y se desdobra en el segundo pico. En este caso se podría pensar que la curcumina se estuviera disolviendo en la EA fundida y que sea por este motivo por el cual no aparece el punto de fusión de la curcumina. Esta hipótesis se comprobó por HSM, donde se aprecia cómo la EA funde a una temperatura de 60 °C y poco a poco va disolviendo a la curcumina. Asimismo, a 80 °C aún queda algo de curcumina que se resiste a ser disuelta, es decir, que no interacciona tan fácilmente, y esto puede corresponder a los otros picos que aparecen en el termograma de esta mezcla.

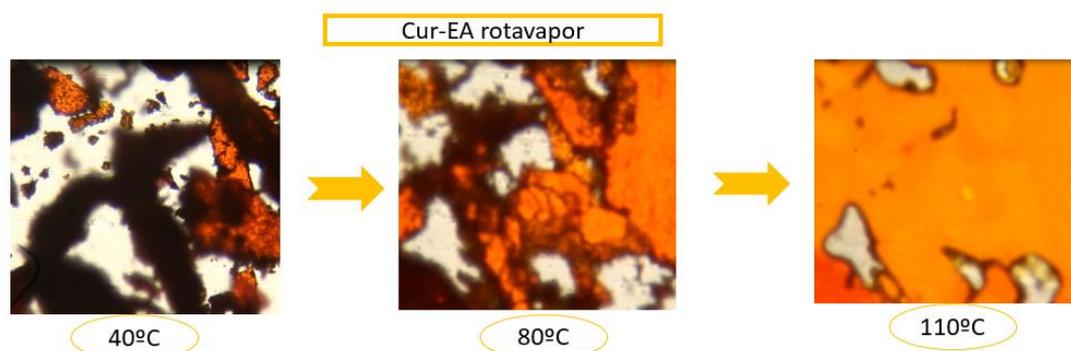


Figura 17. HSM de Cur + EA rotavapor.

Respecto a la mezcla de curcumina y EA sometida a rotaevaporación, se observan únicamente 3 picos en el termograma. Se podría pensar en la presencia de un punto eutéctico, por lo que el pico exotérmico a 113 °C correspondería a la curcumina. Al no aparecer recristalización (pico exotérmico) puede que la curcumina esté precipitando en otra forma diferente a la amorfa, pudiendo existir un cristal conjunto de EA y curcumina. Sin embargo, al observarlo en HSM se aprecia que la interacción entre ambos compuestos es más íntima, visualizándose al principio en el color, ya que éste se presenta naranja desde el principio. En este caso, la fusión se

produce antes que la mezcla física, incluso se ve con luz polarizada un cierto carácter cristalino, que puede deberse a la curcumina que ha pasado a forma 1.

4.1.3. Muestras con curcumina y DDAB

El DDAB (bromuro de didodecildimetilamonio) es un tensioactivo de doble cadena hidrocarbonada que en su estructura tiene dos metilos unidos a un nitrógeno con carga positiva al que le acompaña un bromuro (Figura 18).

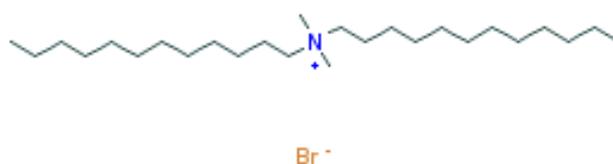


Figura 18. Estructura del DDAB (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Este tensioactivo tiene una temperatura de fusión en torno a 165 °C (Fontell et al., 1986), que no se aprecia en el termograma, ya que se trata de un polvo higroscópico, por lo que aparece un pico ancho a 60 °C que se puede decir que se trata del agua captada por el DDAB. Este resultado se pudo comprobar por HSM ya que al añadir al producto un aceite como la vaselina líquida se observaron las burbujas de agua. Al observar el polvo de DDAB comercial por HSM sí se pudo corroborar dicha fusión a 168 °C.

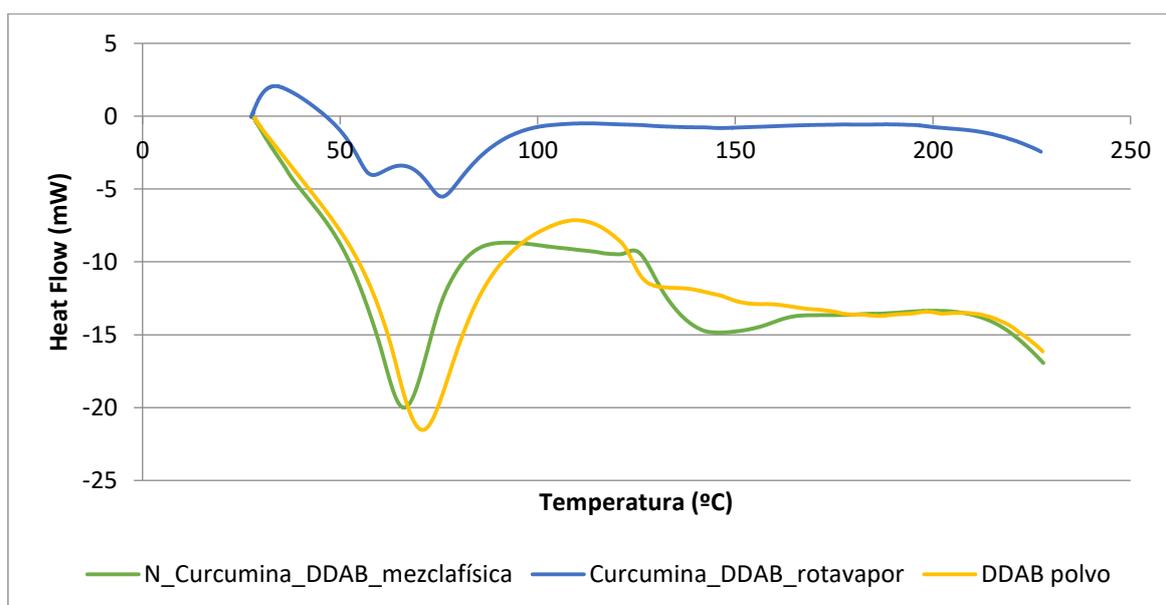


Figura 19. DSC del DDAB y de la mezcla con curcumina.

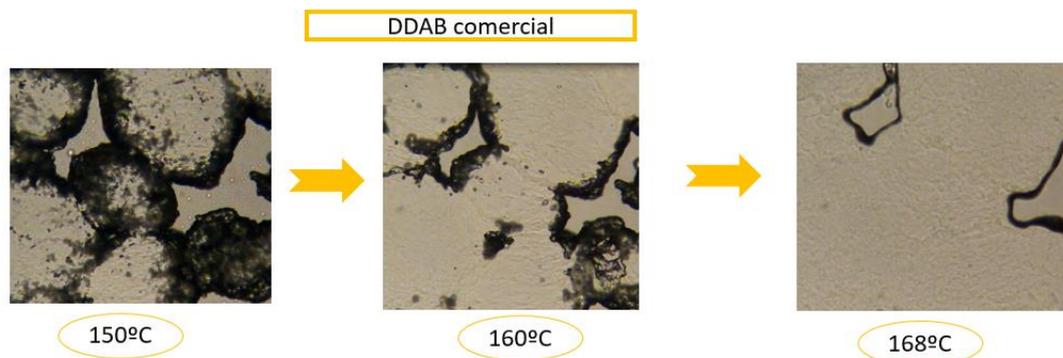


Figura 20. HSM del DDAB comercial.

Cuando se elaboró la mezcla física de curcumina y DDAB en proporciones 1: 6.86 p/p, se pudo observar en el DSC que aparecía de nuevo el pico de agua del DDAB, por lo que esto nos puede estar enmascarando qué es lo que realmente está ocurriendo. Sin embargo, por microscopía se pudo observar que, al igual que ocurría con la EA, el DDAB se está fundiendo y en él se está disolviendo la curcumina.

Esto mismo es lo que está ocurriendo en la mezcla en mismas proporciones de curcumina y DDAB, cuando la tratamos con el mismo procedimiento de evaporación con rotavapor de los disolventes. La única diferencia es que, en este caso, el proceso se ve mucho más acusado.

En ambos casos la curcumina a 90 °C está completamente disuelta en el DDAB previamente fundido, por lo que el pico que aparece en el termograma del DSC de la Cur+DDAB rotavapor puede deberse a impurezas que contenga el polvo.

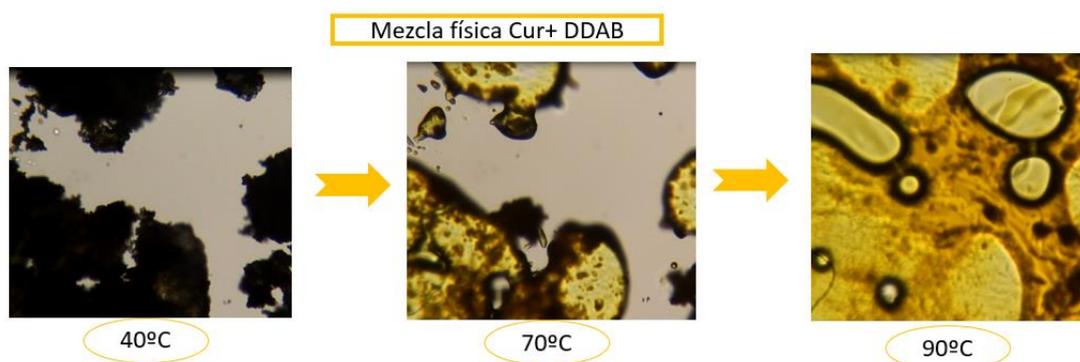


Figura 21. HSM de la mezcla física de Cur + DDAB

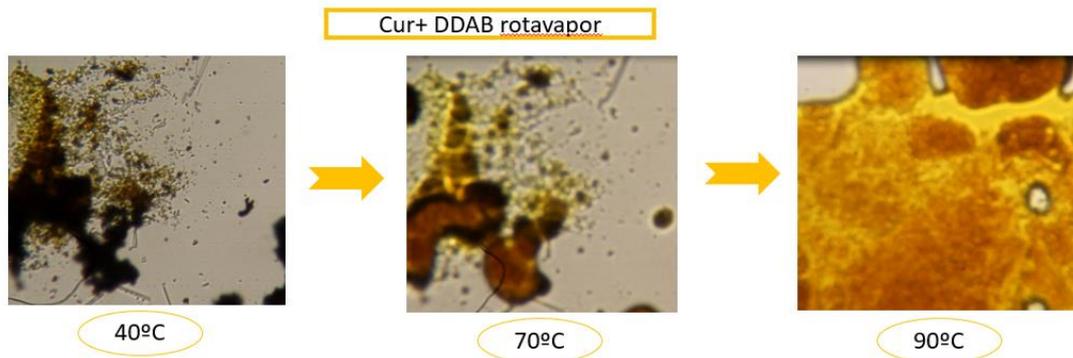


Figura 22. HSM de Cur + DDAB rotavapor.

4.2. Estudio de estabilidad de los compuestos

En general, la estabilidad de almacenamiento es un índice muy importante a la hora de formular medicamentos y, en concreto, los liposomas. La inestabilidad física provocaría agregaciones y fusiones de los mismos, lo que podría conllevar a una pérdida de fármaco (Chen et al., 2015).

En este apartado, se muestran los resultados que se han obtenido del estudio de estabilidad de las muestras durante cuatro semanas. Para determinar esta estabilidad se han medido los siguientes parámetros: tamaño vesicular, índice de polidispersión, carga superficial, porcentaje de encapsulación y poder antioxidante de la curcumina.

Como se ha descrito en el apartado de métodos, los diferentes *films* lipídicos se hidrataron con PBS ajustado a pH 6.5, para así amortiguar las variaciones de pH provocadas por la EA y el DDAB. Además, se ha demostrado que con este pH y con este tampón, la estabilidad de la curcumina es máxima. (Schneider et al., 2015). Asimismo, se han ajustado condiciones de oscuridad y frío, para eliminar factores externos que pudieran afectar a la estabilidad de la molécula. (Lestari y Indrayanto, 2014).

En lo que respecta a la **carga superficial**, se observa un descenso de los valores de potencial zeta con el tiempo en los lotes con DDAB y con EA. En cambio, en los lotes sin agente de carga, se mantiene una carga superficial neutra durante todo el estudio, lo cual concuerda con la bibliografía.

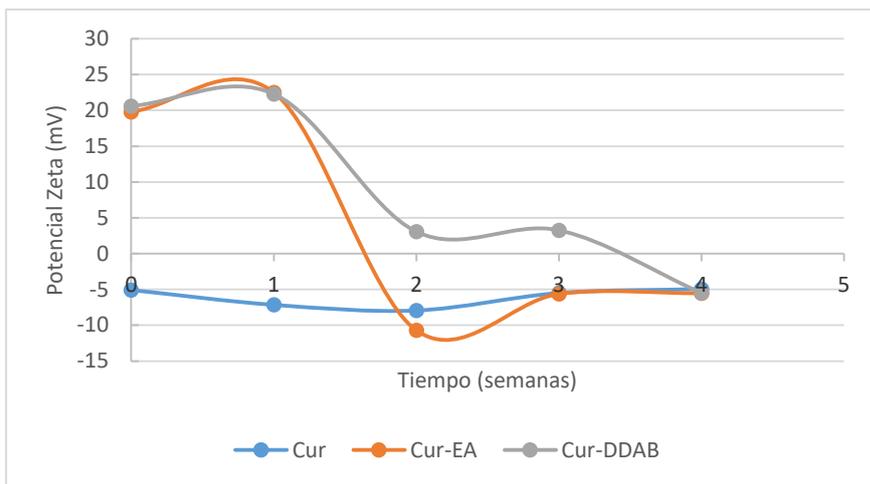


Figura 23. Potencial zeta de liposomas: Cur (liposomas de curcumina); Cur-EA (liposomas de curcumina y EA); Cur-DDAB (liposomas de curcumina y DDAB).

Este fenómeno puede deberse a una neutralización de las cargas positivas por parte de la curcumina, que a pH 6.5 se encuentra parcialmente ionizado. Como se aprecia en la gráfica, este descenso es más acusado en la EA (llegando a revertir el signo de la carga a las 2 semanas) que en el DDAB, debido a la ausencia de iones bromuro que amortigüen la capacidad de la curcumina de neutralizar las cargas positivas. Además, se pueden producir procesos de agregación y fusión de los liposomas, que modifican la carga superficial (durante los procesos de fusión, no se asegura que todos los lípidos queden ordenados de igual forma). Esta teoría se puede argumentar con las gráficas tanto de tamaño como de PDI (Figuras 24 y 25).

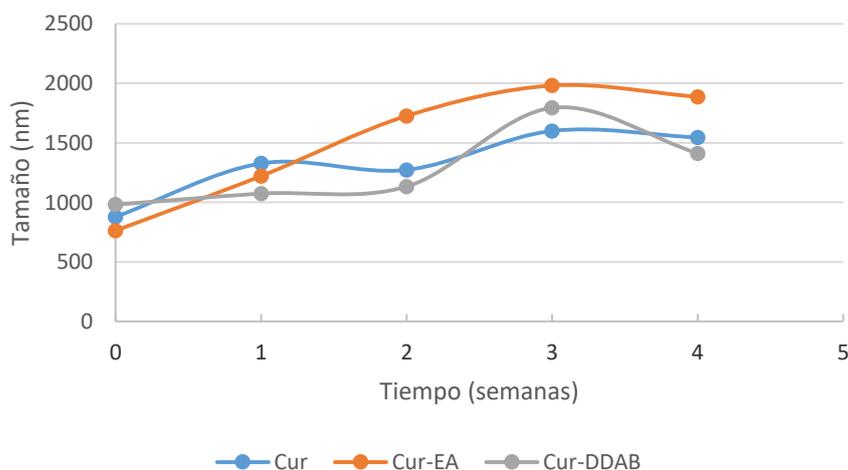


Figura 24. Tamaño de liposomas. Cur (liposomas de curcumina); Cur-EA (liposomas de curcumina y EA); Cur-DDAB (liposomas de curcumina y DDAB).

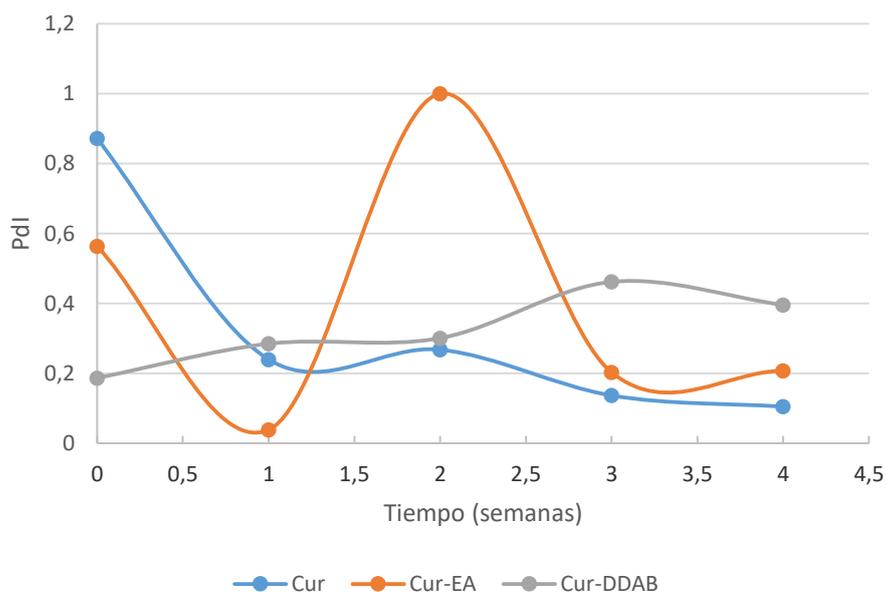


Figura 25. Índice de polidispersión de liposomas. Cur (liposomas de curcumina); Cur-EA (liposomas de curcumina y EA); Cur-DDAB (liposomas de curcumina y DDAB).

En cuanto a la **distribución de los tamaños**, se observa una tendencia a aumentar el tamaño con respecto al tiempo, debido a las agregaciones y posteriores fusiones de los liposomas. Ello va acompañado de cambios en la homogeneidad de los sistemas vesiculares, produciéndose aumentos y descensos bruscos en el caso de la EA, pocas modificaciones en el caso del DDAB, y un descenso y posterior homogeneización en el caso de los liposomas neutros (Roy et al., 2016).

Las técnicas de DLS (*Dynamic Light Scattering*) miden el volumen hidrodinámico de las partículas, es decir, miden el diámetro de la esfera que representa la partícula. En el caso de un liposoma esférico, el diámetro medido se corresponde con el real (Roy et al., 2016). Sin embargo, esto no ocurre en los agregados, ya que el sistema reconoce el agregado completo como una única partícula a la que le mide el diámetro. Por ello, los agregados dan como resultado de la medición tamaños más grandes y heterogéneos (PDI más altos) que lotes no agregados o fusionados.

Es por esto que se piensa que los lotes con EA sufren procesos de agregación, seguidos de fusión, mientras que los de DDAB tienen una fusión simultánea a la agregación. Esto, como se ha mencionado anteriormente, provoca un descenso en la carga superficial del liposoma por un reordenamiento interno de los lípidos. (Zhou et al., 2016).

Además a la hora de hidratar la película, debido al diferente estado de la curcumina con EA o DDAB en el film, esto va a repercutir en los parámetros de tamaño y PDI. Como por ejemplo en los liposomas con EA aparece un estado cristalino en el film, hecho que no ocurre con el DDAB y esto puede ver afectado el tamaño.

Respecto a la **eficacia de encapsulación**, se observa un mínimo valor de curcumina atrapada en las vesículas, a la tercera semana en todos los lotes. Esto puede deberse a los procesos de fusión que hemos comentado anteriormente. Este descenso es más acusado y rápido, en los lotes con EA y neutros, mientras que el lote con DDAB mantiene la encapsulación más estable en el tiempo, aunque también alcanza un mínimo a las tres semanas. Además, en todos los casos, se aprecia un repunte a las cuatro semanas, especialmente notorio en el caso del DDAB.

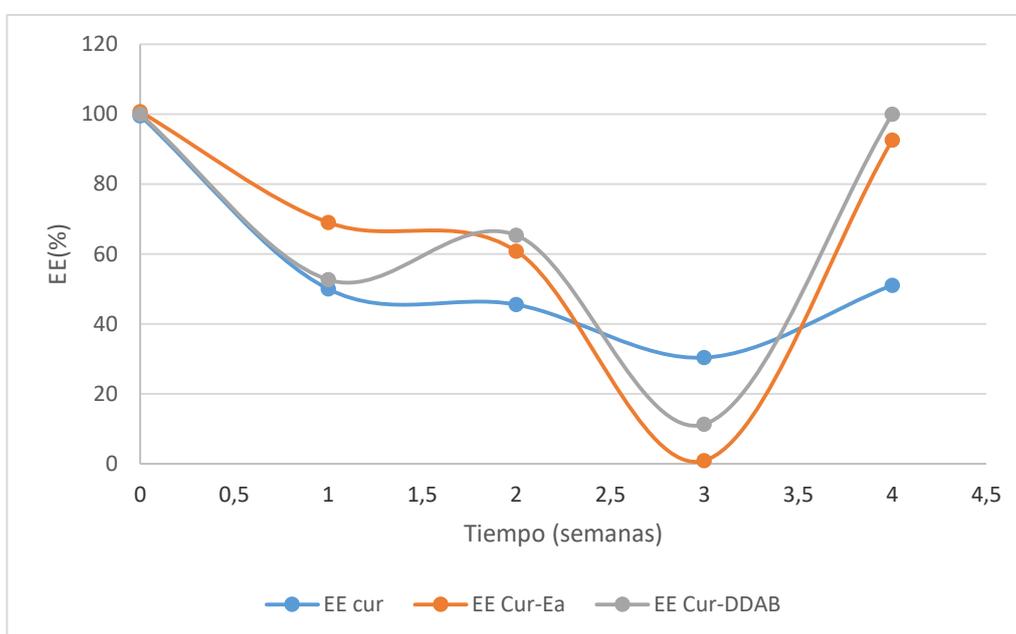


Figura 26. Encapsulación de liposomas. Cur (liposomas de curcumina); Cur-EA (liposomas de curcumina y EA); Cur-DDAB (liposomas de curcumina y DDAB).

Este resultado puede estar relacionado con la neutralización de cargas observada en la figura 23 y descrita anteriormente. Durante el proceso de neutralización, las moléculas de curcumina ionizadas están muy próximas a la bicapa, con lo cual, es fácil que se produzca su interiorización. El proceso está, además, favorecido por la afinidad de la curcumina por medios no polares. Este comportamiento ya se ha descrito en bibliografía, ocurriéndole lo mismo a diversos fármacos como son las fluoroquinolonas (Montero et al., 1996). Además, es posible que la naturaleza tensioactiva del DDAB favorezca esta inclusión, por ello, el incremento de fármaco atrapado es más acusado en este caso.

La **actividad antioxidante** se expresa como EC50, que es la concentración equivalente de antioxidante para disminuir la concentración inicial de ABTS en un 50%. Se expresa como equivalentes de Trolox, sustancia empleada como referencia por tratarse de un derivado soluble del betacaroteno:

$$\text{Equiv Trolox} = \frac{EC50 \text{ compuesto}}{EC50 \text{ Trolox}}$$

Para determinar la capacidad antioxidante, en primer lugar, es necesario calcular la capacidad anti-antioxidante, la cual se calcula como porcentaje, relacionando la absorbancia de la muestra con una absorbancia control. Para determinar la capacidad antioxidante se resta este valor a 100.

$$\text{Actividad anti-antioxidante (\%)} = \frac{\text{Absorb muestra}}{\text{Absorb control}} \times 100$$

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = 100 - \% \text{ actividad anti-antioxidante}$$

A continuación, se escoge el intervalo de concentraciones que incluya el 50% de la actividad antioxidante, que se utiliza para calcular el equivalente en Trolox. Estos valores se recogen en las tablas 3-7, para las muestras analizadas, que han sido descritas en el apartado de metodología de la presente memoria.

Los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante se interpretan de manera que cuanto menor sea el valor del equivalente en Trolox, más capacidad antioxidante presenta la muestra. Esto se debe a que es necesaria menos concentración de curcumina para obtener el mismo poder antioxidante del Trolox.

Como se observa en las tablas, existen valores de sobrenadante que no contienen el intervalo del 50%. Esto indica que existe muy poca cantidad de curcumina como para que tenga una capacidad antioxidante significativa sobre el ABTS, a excepción del DDAB.

Si se representan gráficamente los valores de EC50 de las diferentes muestras respecto al tiempo de almacenamiento, se puede determinar el mantenimiento de la actividad antioxidante de la curcumina tras su formulación en los liposomas. Así, se observa en la Figura 27 que la actividad se mantiene superior al Trolox en todas las formulaciones, a excepción de la curcumina existente en el sobrenadante de las dispersiones liposomales, tanto de la formulación de curcumina sola como la que contiene EA. En cambio, el sobrenadante de las muestras con DDAB, aunque tiene un máximo de equivalente en Trolox que indica poca

capacidad antioxidante, ésta es cuantificable en el tiempo de almacenamiento evaluado. Este resultado obtenido con el DDAB se relaciona con la evolución del porcentaje de fármaco atrapado a lo largo de las 4 semanas, la estabilidad de la curcumina en el interior de las vesículas y el mantenimiento de la actividad antioxidante de la fracción encapsulada.

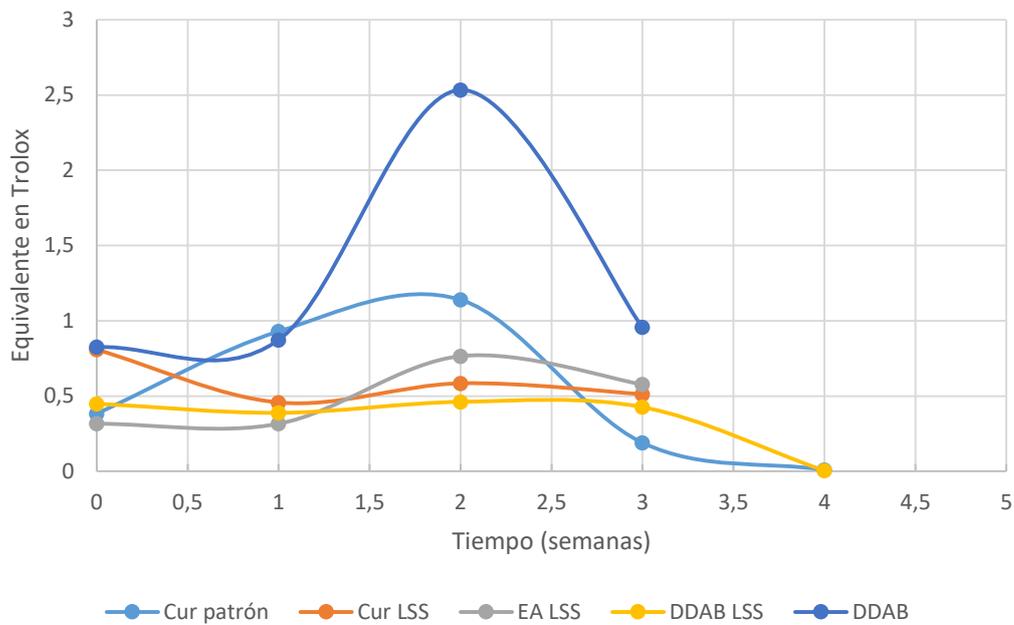


Figura 27. Capacidad antioxidante de la curcumina. Cur (liposomas de curcumina); Cur-EA (liposomas de curcumina y EA); Cur-DDAB (liposomas de curcumina y DDAB).

Trolox	Curcumin	Sob-CurLSS3,0	Sob-Cur2,0	Sb-EALSS3,0	Sb-EA2,0	Sb-DDABLSS3,0	Sb-DDAB2,0
Actividad antioxidante (%) Día uno							
39,7329	11,0184	6,1770	1,5025	0,8347	2,1703	6,0100	3,8397
51,4190	9,1820	5,8431	4,3406	1,3356	77,9633	5,5092	4,3406
91,4858	21,0351	6,3439	8,3472	15,1920	7,3456	6,5109	4,3406
91,6528	35,7262	5,3422	10,3506	4,8414	9,6828	12,0200	11,6861
90,6511	47,0785	11,0184	16,3606	19,1987	15,1920	18,6978	26,7112
91,6528	70,4508	26,8781	38,8982	58,9316	45,4090	41,5693	50,9182
91,9866	86,4775	48,7479	60,1002	80,1336	62,4374	81,8030	88,9816

Tabla 3. Actividad antioxidante primer día

Trolox	Curcumin	Sob Cur-LSS3,0	Sob Cur-2,0	Sb-EALSS3,0	Sb-EA2,0	Sb-DDABLSS3,0	Sb-DDAB2,0
Actividad antioxidante (%) Primera Semana							
39,7329	11,0184	10,3506	5,6761	4,8414	-3,5058	1,8364	1,3356
51,4190	9,1820	7,3456	4,8414	1,6694	2,8381	4,0067	3,1720
91,4858	21,0351	10,6845	4,8414	4,1736	5,6761	6,6778	3,5058
91,6528	35,7262	9,6828	4,5075	5,5092	5,6761	11,6861	10,8514
90,6511	47,0785	16,1937	7,8464	16,1937	9,6828	21,5359	20,8681
91,6528	70,4508	44,9082	28,5476	57,0952	36,7279	52,2538	49,2487
91,9866	86,4775	66,4441	40,7346	72,9549	40,7346	77,4624	74,1235

Tabla 4. Actividad antioxidante primera semana

Trolox	Curcumin	Sob Cur-LSS3,0	Sob Cur-2,0	Sb-EALSS3,0	Sb-EA2,0	Sb-DDABLSS3,0	Sb-DDAB2,0
Actividad antioxidante (%) Segunda semana							
45,8929	0,3571	0,1786	-2,3214	-1,7857	0,0000	0,0000	1,2500
60,7143	8,2143	3,9286	4,1071	2,3214	-0,5357	0,7143	-0,7143
90,5357	21,9643	9,1071	2,3214	4,8214	1,7857	4,8214	4,4643
90,3571	29,2857	11,0714	5,7143	9,6429	2,1429	9,1071	8,5714
90,1786	51,2500	17,1429	6,2500	23,2143	4,2857	24,4643	18,5714
90,8929	62,8571	36,9643	20,3571	40,7143	15,7143	59,2857	34,6429
90,3571	76,4286	50,1786	22,1429	65,3571	19,2857	61,6071	50,5357

Tabla 5. Actividad antioxidante segunda semana

Trolox	Curcumin	Sob Cur-LSS3,0	Sob Cur-2,0	Sb-EALSS3,0	Sb-EA2,0	Sb-DDABLSS3,0	Sb-DDAB2,0
Actividad antioxidante (%) Tercera semana							
43,3757	18,6933	6,1706	10,3448	8,8929	0,5445	5,2632	18,6933
57,3503	32,6679	4,9002	15,6080	0,0000	1,2704	5,6261	1,4519
88,9292	71,1434	6,8966	2,5408	7,0780	2,5408	9,0744	7,2595
88,7477	68,0581	7,0780	3,6298	11,0708	3,9927	14,8820	7,4410
89,1107	79,4918	21,2341	5,4446	24,8639	10,1633	24,8639	24,5009
90,0181	89,1107	40,6534	16,1525	45,0091	25,5898	56,4428	55,7169
90,9256	90,5626	85,2995	37,2051	75,1361	39,0200	59,7096	65,6987

Tabla 6. Actividad antioxidante tercera semana

Trolox	Curcumin	Sob Cur-LSS3,0	Sob Cur-2,0	Sb-EALSS3,0	Sb-EA2,0	Sb-DDABLSS3,0	Sb-DDAB2,0
Actividad antioxidante (%) Cuarta semana							
53,7786	19,5079	4,3937	4,5694	-11,7750	2,9877	2,1090	2,9877
63,9719	10,8963	4,2179	1,2302	8,7873	19,1564	5,7996	1,4060
90,1582	24,4288	13,8840	6,6784	17,3989	19,3322	23,0228	11,0721
87,6977	24,7803	8,0844	3,6907	7,0299	-1,2302	54,1301	4,0422
89,1037	47,2759	12,4780	7,0299	16,1687	10,0176	22,6714	9,8418
89,2794	57,8207	20,2109	18,8049	34,6221	10,5448	48,6819	19,3322
89,6309	69,5958	39,7188	27,0650	48,1547	24,7803	56,2390	26,1863

Tabla 7. Actividad antioxidante cuarta semana

En cuanto al tratamiento que se realizó con LSS, se puede comprobar que el liposoma en sí está estabilizando a la curcumina, ya que incluso en aquellos lotes que no llevan agente de carga, el poder antioxidante se mantiene en el tiempo.

A modo de resumen, y como conclusión al estudio de estabilidad, los liposomas con DDAB se encuentran más estabilizados con el tiempo y a su vez, este tensioactivo provoca una mayor estabilización de la curcumina. Visualmente, en la figura 28, este hecho se puede comprobar al comparar el aspecto y el color de los liposomas al principio y tras las cuatro semanas del ensayo (Choudhury et al., 2015). En las fotografías, además de observar cómo ha cambiado el color, también es posible apreciar el aro que se ha formado en el vial como muestra a cómo se va desestabilizando el liposoma con el paso del tiempo.

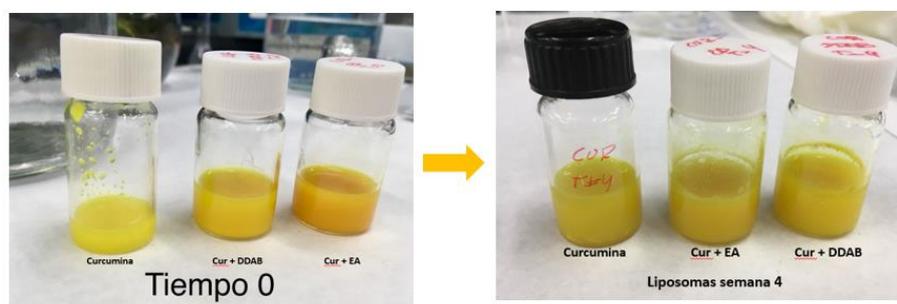


Figura 28. Imagen de los liposomas a tiempo cero y a tiempo cuatro

Igualmente, en la Figura 29 se observa el deterioro de los liposomas a la tercera semana. Se observa cómo en aquellos que llevan EA se han agregado y aglomerado más que los otros dos.

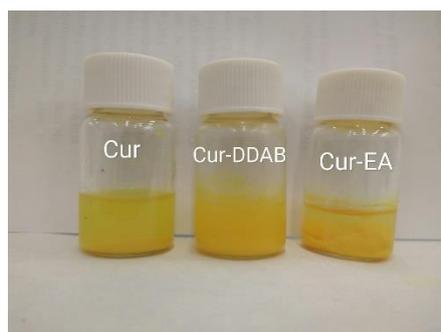


Figura 29. Lotes de liposomas a la tercera semana.

5. CONCLUSIONES

1ª La primera conclusión que extraemos de este estudio es el papel crítico que juega el pH para mantener la curcumina en un mismo estado tautomérico.

2ª En segundo lugar, se puede concluir que entre la curcumina y los agentes de carga no existe una interacción molecular; aun así, sí se puede afirmar que la curcumina se comporta de diferente manera dependiendo del tipo de agente de carga que se seleccione.

3ª En cuanto a la estabilidad, una vez estudiados los parámetros de PDI, tamaño y carga, se puede confirmar que los liposomas con el tiempo van sufriendo cambios en sus tamaños y esto conlleva cambios en la carga; sin embargo, con EA estos cambios son más bruscos que los que se observan usando DDAB.

4ª Una vez estudiados y discutidos los datos de eficacia de encapsulación, se comprueba que debido a los procesos que están ocurriendo de fusión y de agregación, se pierde gran parte de la curcumina que hay en el interior del liposoma; sin embargo, la naturaleza tensioactiva del DDAB permite que gran parte de esta curcumina se pueda reubicar en la bicapa. Además, es este DDAB el que mejor mantiene la capacidad antioxidante de la curcumina durante el tiempo de estudio.

Es por todo esto, que aunque es cierto que el hecho de formación de liposomas mejora todas las propiedades de la curcumina, es la elección del DDAB la que mejor resultados ofrece, por ello, en los próximos estudios se procederá a la formación de liposomas seleccionando el DDAB como agente carga.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Allen TM, Hansen C, Rutledge J. Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *BBA - Biomembr.* 1989;981(1):27-35.
2. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine.* 2015;10:975-99.
3. Chen X, Zou LQ, Niu J, Liu W, Peng SF, Liu CM. The stability, sustained release and cellular antioxidant activity of curcumin nanoliposomes. *Molecules.* 2015;20(8):14293-311.
4. Choudhury AK, Raja S, Mahapatra S, Nagabhushanam K, Majeed M. Synthesis and evaluation of the anti-oxidant capacity of curcumin glucuronides, the major curcumin metabolites. *Antioxidants.* 2015;4(4):750-67.

5. Nelson DL, Cox M. Principios de Bioquímica 4ª ed. Barcelona: Omega; 2005.
6. Elguero J. Curcumin and curcuminoids : chemistry , structural studies and biological properties. An. Real Acad. Nac. Farm. 2015;81(4):278-310.
7. Esatbeyoglu T, Ulbrich K, Rehberg C, Rohn S, Rimbach G. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. Food Funct. 2015;6(3):887-93.
8. Fontell K, Ceglie A, Lindman B, Ninham B, Nielsen CJ, Urso F, et al. Some observations on phase diagrams and structure in binary and ternary Systems of Didodecyldimethylammonium Bromide. Acta Chem. Scand. 1986;40:247-56.
9. Gonçalves JLS, Valandro SR, Poli AL, Schmitt CC. Influence of clay minerals on curcumin properties: stability and singlet oxygen generation. J. Mol. Struct. 2017;1143:1-7.
10. Kharat M, Du Z, Zhang G, McClements DJ. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: impact of pH, temperature and molecular environment. J. Agric. Food Chem. 2017;65(8):1525-32.
11. Kidd PM. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. Altern. Med. Rev. 2009;14(3):226-46.
12. Kurniawansyah F, Mammucari R, Foster NR. Polymorphism of curcumin from dense gas antisolvent precipitation. Powder Technol. 2017;305:748-56.
13. Lanio M, Luzardo M, Laborde R, Sánchez O, Cruz Y, Pazos F, et al. Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. Rev. Cuba. Física. 2009;26(1):23-30.
14. Lestari MLAD, Indrayanto G. Curcumin. En: Brittain HG, editor. Profiles drug Subst. excipients Relat. Methodol. 1.ª ed. New Jersey: Academic Press; 2014. p. 113-204.
15. Lipomize NanoBio Solutions. NanoBiotecnología aplicada. 2018. [Consultado en junio de 2018]. Disponible en: <http://www.lipomize.com>
16. Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P. Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. Int. J. Pharm. 2005;298(1):55-67.
17. Mangolim CS, Moriwaki C, Nogueira AC, Sato F, Baesso ML, Neto AM, et al. Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy and food application. Food Chem. 2014;153:361-70.
18. Mondal S, Ghosh S, Moulik SP. Journal of Photochemistry & Photobiology , B : Biology Stability of curcumin in different solvent and solution media : UV – visible and steady-

- state fluorescence spectral study. *J. P. B.* 2016;158:212-8.
19. Montero MT, Saiz D, Sitges R, V JL, Borrell JH. Influence of physicochemical properties of fluoroquinolones on encapsulation efficiency in liposomes. *Int. J. Pharm.* 1996;138:113-20.
 20. Musfiroh IDA, Mutakin M, Angelina T, Muchtaridi M. Capsaicin level of various *Capsicum* fruits. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2013;5(1):248-51.
 21. Pubchem. Open Chemistry Database. 2018 [en línea]. [Consultado en junio de 2018]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
 22. Ravindran J, Subbaraju G V., Ramani M V., Sung B, Aggarwal BB. Bisdemethylcurcumin and structurally related hispolon analogues of curcumin exhibit enhanced prooxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 2010;79(11):1658-66.
 23. Roy B, Guha P, Bhattarai R, Nahak P, Karmakar G, Chettri P, et al. Influence of lipid composition, pH and temperature on physicochemical properties of liposomes with curcumin as model drug. *J. Oleo Sci.* 2016;65(5):399-411.
 24. Schneider C, Gordon ON, Edwards RL, Luis PB. Degradation of curcumin: from mechanism to biological implications. *J. Agric. Food Chem.* 2015;63(35):7606-14.
 25. Sun Y, Lee CC, Hung WC, Chen FY, Lee MT, Huang HW. The bound states of amphipathic drugs in lipid bilayers: study of curcumin. *Biophys. J.* 2008;95(5):2318-24.
 26. Wang Y-H, Mh P, Al C, Li L, Ys H, Cy H, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997;15:1997.
 27. Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov. Today.* 2012;17:71-80.
 28. Zheng QT, Yang ZH, Yu LY, Ren YY, Huang QX, Liu Q, et al. Synthesis and antioxidant activity of curcumin analogs. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2017;19(5):489-503.
 29. Zhou M, Wang T, Hu Q, Luo Y. Low density lipoprotein / pectin complex nanogels as potential oral delivery vehicles for curcumin. *Food Hydrocoll.* 2016;57:20-9.