



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Evaluación de la actividad antiinflamatoria de curcumina acarreada en dos vehículos (organogel y nanogel) sobre el proceso inflamatorio en un modelo murino con edema auricular

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

Luis Alberto González Ortega

Asesores:

Dr. Hugo Sergio García Galindo

Dra. Cynthia Cano Sarmiento

Dra. Carolina Palmeros Exsome

H. Veracruz Ver. México

Diciembre 2017

DEDICATORIA

RECONOCIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico recibido durante mis estudios de Maestría, haciendo posible el desarrollo de este trabajo.

Al **Dr. Hugo Sergio García Galindo**, la **Dra. Cynthia Cano Sarmiento** y la **Dra. Carolina Palmeros Exsome** por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, confiar en mí, brindarme siempre su apoyo, paciencia y disposición, gracias por contribuir durante este tiempo a mi desarrollo personal, profesional y académico.

A la **Dra. Rosa Maria Oliart Ros** y al **Dr. Gerardo Valerio Alfaro** por contribuir en la revisión de este trabajo y por siempre brindarme consejos muy valiosos.

Al **Dr. Peter Grube Pagola** gracias por recibirme y orientarme en el análisis histológico, el apoyo que me proporciono fue indispensable para culminar este proyecto.

Al **Dr. Andrés Acosta Osorio** por todo el apoyo brindado a lo largo de toda mi maestría, por las charlas y las palabras de ánimo.

RESUMEN

Luis Alberto González Ortega. M. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Diciembre del 2017. **Evaluación de la actividad antiinflamatoria de curcumina acarreada en dos vehículos (organogel y nanogel) sobre el proceso inflamatorio en un modelo murino con edema auricular.** Asesores, Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dra. Cynthia Cano Sarmiento y Dra. Carolina Palmeros Exsome.

La curcumina es un compuesto bioactivo que ha mostrado tener actividad antiinflamatoria; entre sus mecanismos de acción está el inhibir a la enzima ciclooxigenasa, que produce sustancias pro-inflamatorias pero también puede actuar como antioxidante. Sin embargo, la curcumina cuenta con una baja solubilidad y absorción en el organismo, lo que lleva a la necesidad de la implementación de sistemas acarreadores como los organogeles y nanogeles, los cuales mejoran la absorción en la piel y logran actuar de manera localizada en el sitio dañado. El proceso inflamatorio se considera como la respuesta biológica del organismo ante un daño inducido por diversos estímulos. Si este proceso no logra controlarse, se convierte en un daño potencial para el organismo. Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antiinflamatoria de la curcumina administrada mediante dos vehículos tópicos (organogel y nanogel) en un modelo murino con edema auricular inducido por la aplicación repetida de TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Para lograr dicho objetivo se formularon organogeles y nanogeles utilizando como gelificantes Fosfolipon 90H[®] y Carbopol 940[®], respectivamente. Posteriormente, se caracterizaron mediante calorimetría diferencial de barrido, reología y microscopía electrónica de barrido. A continuación, se evaluó la actividad antiinflamatoria de los distintos tratamientos. Finalmente se realizó un análisis histopatológico de las porciones de orejas de ratones que recibieron los distintos sistemas (nanogel y organogel). Como

resultado se obtuvo la concentración crítica gelante y fue posible desarrollar los dos geles. Los termogramas mostraron que en los organogeles la entalpía tuvo un crecimiento lineal respecto a la concentración del gelificante usado, lo que indica que el aumento del gelificante dio una mayor estabilidad al sistema (se requiere más energía para causar un cambio de fase). Los barridos de deformación confirmaron un comportamiento tanto viscoso como elástico en ambos sistemas. Durante la evaluación de la actividad antiinflamatoria, el nanogel tuvo una mayor actividad (61.8%) respecto al organogel (45.9%), la curcumina libre (33.2%) y el hidrogel (28.1%). El diclofenaco, usado como fármaco antiinflamatorio logró la mayor inhibición (85.4%) sin embargo, causó la muerte del 30% de los sujetos de estudio debido a efectos secundarios adversos. El posterior análisis histopatológico corroboró los resultados obtenidos.

ABSTRACT

Luis Alberto González Ortega. MSc. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. December 2017. **Evaluation of the antiinflammatory activity of curcumin carried in two vehicles (organogel and nanogel) on the inflammatory process in a murine model with atrial edema.** Advisors: Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dr. Cynthia Cano Sarmiento, Dr. Carolina Palmeros Exsome.

Curcumin is a bioactive compound with proven anti-inflammatory activity; One of its mechanisms of action is inhibiting the enzyme cyclo-oxygenase, which produces pro-inflammatory substances but can also act as an antioxidant. However, curcumin has a low solubility and absorption in the body, which leads to the need for the implementation of compatible systems such as organs and nanogels, that improve skin absorption and reach the damaged site in a localized manner. The inflammatory process is considered as the biological response of the organism to damage induced by various stimuli. If this process fails to control itself, it becomes a potential damage to the organism. Based on this information, the objective of this work was to evaluate the ant-inflammatory activity of curcumin administered by two topical vehicles (organogel and nanogel) in a murine model with atrial edema induced by the repeated application of TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). To achieve the goal, organogels and nanogels were formed using Fosfolipon 90H® and Carbopol 940® as gelling agents, respectively. Subsequently, they were characterized by differential scanning calorimetry, rheology and scanning electron microscopy. Next, the anti-inflammatory activity of the different treatments was evaluated. Histopathological analysis of the portions of mouse ear extracts that received the different systems (nanogel and organogel) was performed. As a result, the critical concentration was obtained and the two gels could be developed. Data from thermal analysis suggested that in the organogels, the enthalpy had a linear growth with respect to the concentration of

the gelling agent used, which indicates that increasing the gelling agent provided greater stability to the system. The deformation sweeps confirmed a viscoelastic behavior in both systems. During the evaluation of the anti-inflammatory activity, the nanogel had a greater activity (61.8%) respect to the organogel (45.9%), the free curcumin (33.2%) and the hydrogel (28.1%). Diclofenac achieved the highest inhibition (85.4%); however, it caused the death of 30% of the study subjects by secondary adverse events. The subsequent histopathological analysis confirmed the results.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Proceso inflamatorio	2
2.1.1 Mediadores inflamatorios.....	2
2.1.2 Inflamación crónica y el cáncer.....	4
2.2 La piel	4
2.2.1 Rutas de liberación a través de la piel.....	5
2.2.1.1 Ruta a través de los apéndices.....	5
2.2.1.2 Ruta transcelular.....	5
2.2.1.3 Ruta intercelular.....	6
2.3 Compuestos bioactivos	7
2.3.1 Curcumina.....	7
2.3.2 Propiedades biológicas.....	8
2.3.2.1 Efectos anticancerígenos.....	8
2.3.2.2 Actividad hipolipidémica.....	9
2.3.2.3 Actividad antiinflamatoria.....	9
2.4 Geles	11
2.4.1 Tipos de estructuras en un gel.....	11
2.4.2 Clasificación de geles.....	11
2.4.3 Geles transdérmicos.....	12
2.5 Organogeles	13
2.5.1 Preparación de organogeles	14
2.5.2 Moléculas gelificantes.....	14
2.5.2.1 Fosfolípidos.....	14
2.5.3 Propiedades de los organogeles.....	17

2.5.4 Interacción entre la piel y los organogeles.....	19
2.6 Nanogeles.....	19
2.6.1 Preparación de nanogeles.....	19
2.6.2 Ventajas de los nanogeles	22
2.6.3 Componentes de los nanogeles.....	23
2.6.3.1 Nanoemulsión.....	23
2.6.3.2 Carbopol 940®	25
2.6.4 Interacción entre la piel y los nanogeles.....	26
2.7 Prueba de tubo invertido.....	27
2.8 Caracterización de geles	28
2.8.1 Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	28
2.8.2 Caracterización reológica.....	29
2.8.3 Caracterización morfológica.....	29
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPÓTESIS.....	32
5 OBJETIVOS	33
5.1 Objetivo general.....	33
5.2 Objetivos específicos.....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1 Reactivos.....	34
6.2 Métodos.....	34
6.2.1 Diseño experimental para la formulación de organogeles.....	35
6.2.2 Determinación de concentración crítica gelificante.....	36
6.2.3 Desarrollo de organogeles	36
6.2.4 Prueba de tubo invertido	37
6.3 Caracterización de organogeles.....	37
6.3.1 Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	37
6.3.2 Caracterización reológica.....	38
6.4 Diseño experimental para la formación de nanogeles	38
6.4.1 Preparación de nanogeles	39

6.4.2 Formación de nanoemulsiones.....	40
6.4.3 Tamaño de partícula de las nanoemulsiones.....	40
6.4.4 Caracterización de las nanoemulsiones.....	41
6.5 Caracterización de nanogeles.....	41
6.5.1 Microscopia electrónica de barrido.....	41
6.6 Evaluación de la bioactividad <i>in vivo</i>	42
6.6.1 Inflamación crónica inducida por aplicación repetida de TPA en oreja de ratón.....	42
6.6.2 Análisis histológico.....	43
6.7 Análisis estadístico.....	44
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1 Organogeles.....	45
7.1.1 Concentración crítica gelante.....	45
7.1.2 Desarrollo de organogeles.....	45
7.1.3 Prueba de tubo invertido.....	46
7.1.4 Calorimetría Diferencial de barrido (DSC).....	46
7.1.5 Reología de organogeles.....	49
7.2 Nanogeles.....	50
7.2.1 Desarrollo y caracterización de las nanoemulsiones.....	50
7.2.2 Estabilidad de las nanoemulsiones.....	51
7.2.3 Concentración crítica gelante.....	53
7.3 Desarrollo de nanogeles.....	53
7.3.1 Caracterización reológica.....	54
7.3.2 Morfología de los nanogeles.....	57
7.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	57
7.4.1 Análisis histopatológico.....	60
8. CONCLUSIONES.....	69
9. BIBLIOGRAFIA.....	70

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación de mediadores inflamatorios producidos después de la identificación de una lesión	3
TABLA 2. Factores que afectan la permeabilidad de fármacos en la piel.....	6
TABLA 3. Clasificación de fosfolípidos	15
TABLA 4. Propiedades de los organogeles.....	18
TABLA 5. Características de los nanogeles	21
TABLA 6. Niveles y factores del diseño de experimentos para la preparación de organogeles.....	36
TABLA 7. Diseño factorial para la preparación de nanogeles acarreadores de curcumina con emulsificante sin modificar.	39
TABLA 8. Grupos experimentales para el estudio de bioactividad.	42
TABLA 9. Intervalos de temperatura de los distintos porcentajes de gelificante en los organogeles	48
TABLA 10. Entalpías de las distintas formulaciones de organogeles.	48
TABLA 11. Logaritmo de módulo de almacenamiento de las distintas concentraciones de gelificante en los organogeles	49
TABLA 12. Módulo de almacenamiento para las distintas formulaciones de nanogeles.	56
TABLA 13. Peso (mg) y letras de la comparación de tukey de las orejas a las que se les aplicó los diferentes tratamientos.....	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura química de la curcumina	8
FIGURA 2. Mecanismos antiinflamatorios de la curcumina.....	10
FIGURA 3. Clasificación de geles de acuerdo al medio en el que se forman.	12
FIGURA 4. Estructura de la lecitina	16
FIGURA 5. Estructura del ácido esteárico.....	17
FIGURA 6. Desarrollo de nanogeles a partir de una nanoemulsión	20
FIGURA 7. Estructura del Carbopol 940®.....	26
FIGURA 8. Diagrama de flujo experimental	35
FIGURA 9. Evaluación de la concentración crítica gelante de organogeles.....	45
FIGURA 10. Organogeles desarrollados durante la prueba de tubo invertido.....	46
FIGURA 11. Termograma de un organogel analizado en un equipo DSC	47
FIGURA 12. Efecto de la concentración de gelificante y de la curcumina sobre la entalpía de los organogeles.....	49
FIGURA 13. Reograma de un organogel donde se puede observar la región viscoelasticalineal.....	50
FIGURA 14. Nanoemulsiones de curcumina.....	51
FIGURA 15. Distribución de tamaño de partícula de la nanoemulsión	51
FIGURA 16. Estabilidad de la nanoemulsión durante dos días.....	53
FIGURA 17. Concentración critica gelante del carbopol en la preparación de nanogeles	53
FIGURA 18. Nanogeles desarrollados durante la prueba de tubo invertido.....	54
FIGURA 19 Barrido de deformación de los nanogeles, se señala en el cuadro el intervalo viscoelástico lineal.....	56

FIGURA 20. Micrografías del nanogel desarrollado obtenidas en la microscopía electrónica de barrido a diferentes acercamientos a) 9.0 Kx donde se aprecia una vista general b) 40 Kx agregado de partículas c) partículas en tamaños nanométricos encontradas en el nanogel.....	57
FIGURA 21. Porcentaje de inhibición de edema auricular de los distintos tratamientos aplicados sobre el edema auricular en un modelo murino.	59
FIGURA 22. Análisis histológico de oreja de ratón del testigo enfermo teñido con H&E en 10x y 40x, visto en microscopio Olympus BX51 al final del modelo de inflamación auricular inducido por aplicación múltiple de TPA A) Tejido con denso infiltrado inflamatorio B) Detalle de infiltrado inflamatorio.	61
FIGURA 23. Análisis histológico de oreja de ratón del testigo sano teñido con H&E en 10x y 20x, visto en microscopio Olympus BX51 donde se observan las diferentes capas de la piel sin alteraciones histológicas.	62
FIGURA 24. Análisis histológico de oreja de ratón del testigo tratado con diclofenaco teñido con H&E en 10x, observado en un microscopio Olympus BX51, donde se observan las diferentes capas de la piel sin alteraciones histológicas. .	63
FIGURA 25. Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con nanogeles teñido con H&E en 10x, observado en un microscopio Olympus BX51.....	65
FIGURA 26 Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con organogeles teñido con H&E en 10x, observado en un microscopio Olympus BX51.	66
FIGURA 27 Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con curcumina libre teñido con H&E en 10x, observado en un microscopio Olympus BX51.....	67
FIGURA 28 Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con hidrogeles teñido con H&E en 10x, observado en un microscopio Olympus BX51.....	68

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es definida como la respuesta biológica del organismo ante un daño inducido por diferentes estímulos; ésta es esencial para la homeostasis del cuerpo y a pesar de que normalmente se regula, en algunas ocasiones esto no se logra (inflamación aguda) y se convierte en un daño potencial para el organismo. Los estados iniciales de la inflamación son mediados por la activación del sistema inmunitario, tiene una duración corta de horas o días. Sin embargo, si la respuesta inflamatoria persiste, se da la aparición de una inflamación crónica, la cual predispone a varias patologías crónicas, como es el caso de artritis, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Esto hace muy importante la búsqueda de tratamientos antiinflamatorios.

El uso de plantas medicinales como tratamiento contra la inflamación existe desde tiempos ancestrales observando buenos resultados. Ahora se sabe que son los compuestos bioactivos los que le dan a las plantas estas propiedades; un compuesto bioactivo es un producto que, más allá de aportar energía al organismo proporciona beneficios tales como protección biológica, prevención y recuperación de alguna enfermedad.

En la actualidad existe una gran variedad de vías de administración de fármacos antiinflamatorios; entre ellos se puede mencionar las vías orales, nasales, intravenosas y tópicas. Estas últimas, han tomado gran importancia en la pasada década debido a que no son invasivas y evitan el tracto gastrointestinal. Dentro de este tipo de vehículos, los organogeles y nanogeles mejoran la penetración de los fármacos en la piel, su producción es de bajo costo, pueden acarrear una gran cantidad de compuestos, y son biodegradables.

2. ANTECEDENTES

2.1 Proceso inflamatorio

La inflamación es un conjunto complejo de interacciones entre factores y células que pueden surgir en cualquier tejido en respuesta a una lesión traumática, infecciosa, post-isquémica, tóxica o autoinmune (Nathan, 2002).

La terminación de la respuesta inflamatoria y la transición al estado homeostático es un proceso activo y altamente regulado. El proceso normalmente lleva a la recuperación de la infección y una curación del organismo, sin embargo, si el proceso inflamatorio no se elimina por la respuesta inflamatoria aguda o persiste por cualquier otra razón, puede conllevar a un estado inflamatorio crónico. Este estado puede ser causado por infecciones crónicas, daños en los tejidos no reparados o alérgenos persistentes (Medzhitov, 2008; Meng *et al.*, 2015).

2.1.1 Mediadores inflamatorios

El reconocimiento inicial de la infección es mediada por macrófagos residentes en tejidos, lo que lleva a la producción de una variedad de mediadores inflamatorios. El efecto principal y más inmediato de estos mediadores es obtener un exudado inflamatorio a nivel local, las proteínas del plasma y los leucocitos (principalmente neutrófilos) que normalmente están restringidos a los vasos sanguíneos se mueven a través de las vénulas postcapilares, a los tejidos extravasculares en la zona dañada (Medzhitov, 2008).

Los mediadores celulares pueden ser producidos por los leucocitos o por las células presentes en los tejidos locales. Algunos mediadores (tales como la histamina y serotonina) se preforman y almacenan en los gránulos de mastocitos, basófilos y plaquetas. Otros están preformados y circulan como precursores inactivos en el plasma. La concentración plasmática de estos mediadores puede crecer notablemente como resultado del aumento de la secreción de los precursores

durante la respuesta de fase aguda (Medzhitov, 2008). Además de los mediadores inflamatorios antes mencionados, también participan enzimas como la fosfolipasa A2 (PLA2), la cual escinde ácidos grasos en la posición sn-2 de los fosfolípidos de glicerol para liberar lisofosfolípidos y ácidos grasos, como el ácido araquidónico, que se encuentra esterificado en los fosfolípidos de membrana y triglicéridos en todos los tejidos de los mamíferos, los cuales sirven de sustrato para la síntesis de eicosanoides proinflamatorios por dos vías enzimáticas diferentes, la vía cíclica mediante la enzima ciclooxigenasa (COX) que conduce a la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano, y por medio de la lipooxigenasa (LOX) para sintetizar leucotrienos (Meng *et al.*, 2015). En la Tabla 1 se encuentran compilados los tipos de mediadores inflamatorios.

TABLA 1. Clasificación de mediadores inflamatorios producidos después de la identificación de una lesión

Aminas vasoactivas	La histamina y la serotonina tienen efectos complejos sobre la vasculatura, causando aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación o vasoconstricción, dependiendo del contexto.
Lipoxinas	Activan el reclutamiento de leucocitos, la vasodilatación, vasoconstricción y el aumento de la permeabilidad vascular.
Péptidos vasoactivos	Se pueden almacenar en una forma activa en vesículas secretoras o ser generados por el procesamiento proteolítico de precursores inactivos en el líquido extracelular.
Citocinas	Las citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6) se producen por muchos tipos de células como macrófagos o mastocitos y causan la inducción de la respuesta de fase aguda.

Fuente: Medzhitov (2008).

2.1.2 Inflamación crónica y el cáncer

La respuesta inflamatoria crónica generalmente se localiza en el sitio donde el inductor inflamatorio está presente y persiste o no logra repararse el daño y a menudo resulta en diferentes tipos de remodelación del tejido local. La inflamación crónica está involucrada en la etiología del cáncer (puede oxidar el ADN lo suficiente como para promover la transformación neoplásica) y puede causar un daño en el endotelio, lo que promueve un ambiente proinflamatorio. Dicha disfunción del endotelio es un determinante temprano en el desarrollo de la hipertensión, dando una idea de la relación entre la inflamación y los problemas cardiovasculares. Todos estos procesos son regulados por mediadores inflamatorios (Rapaport *et al.*, 2015; Siti *et al.*, 2015). El presente estudio se centra en la inflamación causada por lesiones en la piel.

2.2 La piel

La piel es una parte vital del cuerpo humano, es el órgano más largo con un promedio de 1.5 a 2 m² y tiene una función protectora, además mantiene numerosos vasos sanguíneos los cuales hacen posible la absorción de fármacos a través de aplicaciones tópicas (Raut *et al.*, 2012; Sreedevi *et al.*, 2012). La piel se usa como un puerto para administrar diversos medicamentos, pero también actúa como una barrera para la entrada de algunos materiales, ya que sólo permite penetrar en la circulación sistémica a materiales pequeños en un cierto período de tiempo. Una de las maneras de suministrar una cantidad suficiente de fármaco por vía transdérmica es mediante la incorporación del fármaco en un gel, de forma que se suministra en un mecanismo de difusión controlada. Para la mayoría de las moléculas el estrato córneo es la barrera que deben pasar para lograr la liberación, mientras que para algunos fármacos lipófilos la principal barrera para una buena permeación puede residir en la membrana de la epidermis esencialmente acuosa (Kaur & Singh, 2015).

2.2.1 Rutas de liberación a través de la piel

2.2.1.1 Ruta a través de los apéndices

Los apéndices (folículos pilosos, conductos sudoríparos) ofrecen poros que pasan a través del estrato córneo. La apertura del poro folicular de la superficie de la piel es mayor que el de las glándulas ecrinas, aunque son menos numerosos. Las posibles rutas de penetración a través de los folículos pilosos podrían implicar la propia fibra capilar, a través de la vaina radicular externa del cabello en las células viables de los folículos, o a través del canal de aire por el que se introducen en la glándula sebácea. Además, la liberación de sebo por las glándulas sebáceas puede proporcionar una vía lipoidal que puede influir en la absorción. Redes capilares densas envuelven estrechamente las bases tanto de los folículos pilosos como de los conductos de sudor, proporcionando acceso a la circulación para la mayoría de las moléculas que llegan a estas regiones (Kaur & Singh, 2015).

2.2.1.2 Ruta transcelular

La vía transcelular es a menudo considerada como una ruta polar a través de la membrana. Los componentes celulares que el soluto difunde (queratina), proporcionan un entorno esencialmente acuoso, y por lo tanto la difusión de moléculas hidrófilas a través de estos queratinocitos es rápida. Sin embargo, no existen las células llenas de queratina de forma aislada, estas están unidas a una envoltura lipídica que se conecta a unos dominios intercelulares lipídicos de multicapa, por lo tanto, la molécula que usa esta ruta se enfrenta a numerosos obstáculos. En primer lugar, existe la partición en el queratinocito, seguido por difusión a través de la queratina hidratada. Con el fin de salir de la célula, la molécula debe repartirse en los lípidos de la bicapa antes de la difusión a través de la bicapa de queratinocitos (Kaur & Singh, 2015).

2.2.1.3 Ruta intercelular

Los espacios intercelulares del estrato córneo fueron usados inicialmente como una vía de liberación potencialmente significativa debido al pequeño volumen que ocupan. Sin embargo, la estructura física de los lípidos intercelulares es un factor significativo en las propiedades de barrera de la piel. Los principales lípidos de la piel son ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres (Kaur & Singh, 2015). En la Tabla 2 se muestran los distintos factores que afectan la permeabilidad de los fármacos en la piel.

TABLA 2. Factores que afectan la permeabilidad de fármacos en la piel.

Factor	Características
Formulación	Formulaciones basadas en lípidos son más eficientes para la penetración de fármacos a través de la piel, pero alteran el estado de hidratación, lo que puede causar dermatitis. Las formulaciones a base de agua mantienen en buen estado la piel pero pueden presentar bajas penetraciones.
Tamaño molecular	La difusión del fármaco a través de la piel es un mecanismo pasivo, pequeñas moléculas atraviesan la piel con mayor rapidez que las moléculas más grandes.
Solubilidad/ punto de fusión	Los materiales orgánicos con puntos de fusión altos tienen solubilidades acuosas relativamente bajas. Moléculas lipófilas tienden a penetrar a través de la piel con mayor rapidez que las moléculas hidrófilas.

Fuente: (Kaur & Singh, 2015).

Con base a lo anterior, se han buscado diversos tratamientos para detener el proceso inflamatorio, entre los cuales el uso de compuestos bioactivos de forma tópica (a través de la piel) ha mostrado tener un mayor efecto benéfico.

2.3 Compuestos bioactivos

En la actualidad existe un gran interés sobre el papel que juegan los compuestos bioactivos en relación a la mejora del estado de salud de las personas. Se ha definido a los compuestos bioactivos como "constituyentes de los alimentos y suplementos, distintos de los necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales humanas básicas, que son responsables de cambios en el estado de salud". Por otra parte, se define a los alimentos funcionales como "alimentos que, en virtud de la presencia de compuestos fisiológicamente activos, proporcionan un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica (Wallace *et al.*, 2015).

Entre los beneficios que aportan los compuestos bioactivos están el control de peso y la prevención de problemas cardiovasculares, entre otros (Wallace *et al.*, 2015). A pesar de esto, no son necesariamente tan activos en nuestro organismo como se podría pensar, debido a su bajo nivel de absorción en el intestino, su alto metabolismo y su rápida eliminación (Xu, 2014). El compuesto bioactivo de interés para este trabajo es la curcumina.

2.3.1 Curcumina

La planta *Cúrcuma longa* es una planta usada en la medicina tradicional china que posee propiedades para prevenir y curar diversos padecimientos. De esta planta se deriva la cúrcuma, la que después de secarse se usa en forma de polvo como el ingrediente principal del curry en la india, además debido a su alta efectividad como colorante también se usa para teñir ropa (Aggarwal *et al.*, 2007; Epstein *et al.*, 2010). Su fórmula molecular es $C_{21}H_{20}O_6$, tiene un peso molecular (MW) de 368.38 g/mol, y un punto de fusión de 179-183 °C. La curcumina es más soluble en etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol y acetona que en agua (Tiwari *et al.*, 2017). Los compuestos bioactivos presentes en la cúrcuma llevan por nombre curcuminoides, de los cuales el más importante es la curcumina, cuyo ingrediente activo es el diferuloilmetano, un polifenol hidrofóbico con un característico color amarillo (1,7-bis

(4-hidroxi-3 metoxifenil) 1-6-heptadieno-3,5 dion), en la Figura 1 se puede observar su estructura química (Epstein *et al.*, 2010; Shanmugam *et al.*, 2015).

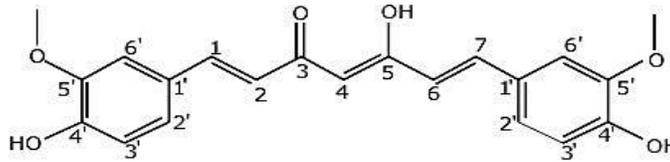


FIGURA 1. Estructura química de la curcumina (Shanmugam *et al.*, 2015).

2.3.2 Propiedades biológicas

La curcumina es conocida como “el oro indio”. Ha sido utilizada como ayuda en el tratamiento de diversas enfermedades entre las que se encuentran el Alzheimer, asma, enfermedades del hígado, puede actuar como antioxidante, además posee efectos antiinflamatorios, cardioprotectores, antiartríticos, anticarcinogénicos y quimiopreventivos (Chen *et al.*, 2011; Shanmugam *et al.*, 2015; Tiwari *et al.*, 2017). A continuación se muestra cómo actúa la curcumina en algunos de estos padecimientos.

2.3.2.1 Efectos anticancerígenos

La curcumina suprime la angiogénesis de tumores a través de la supresión de citosinas angiogénicas, muestra además efecto antitumoral debido a sus propiedades antiinflamatorias (Aggarwal *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha encontrado que la curcumina actúa en las células madre del glioblastoma a través de la inducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), potencialmente a través de la regulación negativa de la actividad del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT 3) (Gersey *et al.*, 2017). El STAT 3 es un activador transcripcional con un rol ubicuo en la tumorigénesis. Está involucrado en la desregulación del crecimiento de células, angiogénesis, metástasis y

resistencia a la apoptosis, como demostraron Shanmugam *et al.* (2015). Así mismo, se encontró que las dosis bajas de curcumina inhiben las propiedades de auto-renovación de las células madre de glioblastoma (GSC), una característica importante que controla la recaída de glioblastoma (GBM) y que disminuye la viabilidad de GSC de una manera dependiente de la dosis (Gersey *et al.*, 2017).

2.3.2.2 Actividad hipolipidémica

En un estudio realizado por Mohamadi *et al.* (2011), se evaluó el efecto de la curcumina en el perfil de lípidos de individuos obesos que presentaban dislipidemias. El estudio concluyó que hubo una disminución significativa en los niveles de triglicéridos séricos, encontrando también un aumento en los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), lo que llevó a pensar que la curcumina puede movilizar el colesterol de tejidos extrahepáticos al hígado donde es catabolizado (Soudamini *et al.*, 1992).

2.3.2.3 Actividad antiinflamatoria

La curcumina tiene diversos mecanismos para controlar el proceso inflamatorio (Figura 2) entre los cuales se encuentran: La modulación del metabolismo del ácido araquidónico (Huguet *et al.*, 2000), inhibiendo las actividades de la COX-2 y la LOX, dos enzimas involucradas en la inflamación. La enzima COX-2 es inducida por citocinas que transforman el ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos durante los episodios de inflamación y la agregación plaquetaria, mientras que la LOX transforma el ácido araquidónico en leucotrienos, los cuales tienen un papel en el reclutamiento de leucocitos por las células endoteliales y su movilización de la vasculatura a los tejidos dañados (Mesa, 2000; Duvoix *et al.*, 2005; Shanmugam *et al.*, 2015). Otra vía de este compuesto bioactivo para inhibir la actividad de la COX es suprimiendo la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-KB) e inhibiendo la expresión de la enzima pro-

inflamatoria LOX-5, quimiocinas y óxido nítrico sintasa, además reduce la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa, el cual regula la expresión de genes proinflamatorios (Duvoix *et al.*, 2005). Por otra parte regula la expresión de varias citocinas inflamatorias como IL-1, IL6, citocinas multifuncionales involucradas en la respuesta inflamatoria y su progresión hacia el cáncer (Sordillo *et al.*, 2015). Se ha observado además que es un potente inhibidor de la producción de radicales libres de oxígeno, lo que disminuye la inflamación (Vijaykumar *et al.*, 2004).

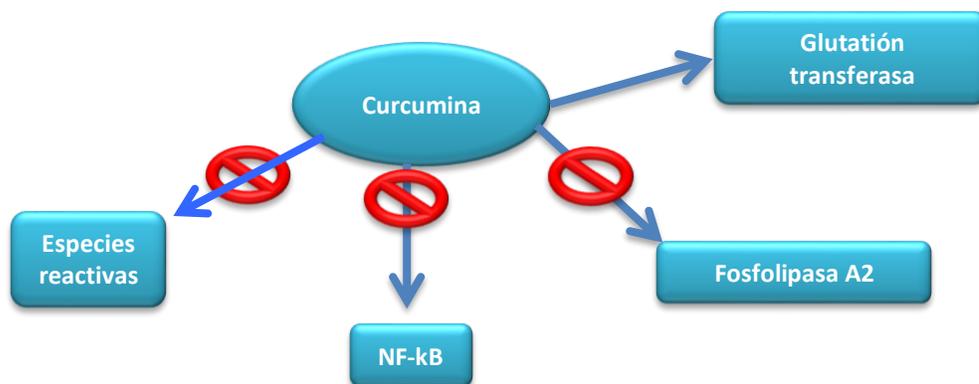


FIGURA 2. Mecanismos antiinflamatorios de la curcumina (Naksuriya *et al.*, 2014).

Pese a todas estas propiedades reportadas, la curcumina tiene una baja solubilidad en medios acuosos de solo 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de manera que 10 o 12 g/mL de curcumina administrada por vía oral en seres humanos conduce a un nivel de curcumina sérica de 50 ng/mL , lo cual está por debajo del valor mínimo para alcanzar los efectos terapéuticos de la curcumina (Nazari-Vanani *et al.*, 2017). Por otra parte, es susceptible a la degradación bajo medios alcalinos y tiene una rápida degradación biológica. Estas características son causa de su baja biodisponibilidad, lo que resulta en una concentración sub-óptima en sangre al liberar sus efectos terapéuticos (Naksuriya *et al.*, 2014). Debido a esta limitación, se han buscado transportadores que puedan proteger este material hidrofóbico (Tuttle *et al.*, 2014) con el fin de lograr un efecto benéfico. De manera que en este trabajo se desarrollaron geles (organogeles y nanogeles) como sistemas acarreadores de curcumina.

2.4 Geles

Los geles han sido definidos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) como suspensiones de partículas semisólidas interpenetrados con un líquido. Los principales componentes de un gel son el solvente y un gelificante; su apariencia sólida se debe a la inmovilización de las moléculas del solvente en una red continua tridimensional formada por las moléculas del gelificante, la cual evita que la fase acuosa fluya. Una mejor definición sería que un gel es un material semisólido compuesto de un agente gelificante que, en la presencia del solvente adecuado se ensamblan mediante interacciones físicas o químicas en una red tridimensional y forma una tensión superficial la cual limitará el fluido entrelazando e inmovilizando las moléculas del solvente (Vintiloiu & Leroux, 2008; Debnath *et al.*, 2014).

2.4.1 Tipos de estructuras en un gel

Para entender mejor el mecanismo de formación de un gel se ha fragmentado la red tridimensional en estructura primaria, secundaria y terciaria. La estructura primaria (en la escala de Å a nm) está determinada por el reconocimiento a nivel molecular, en esta, los gelificantes se agregan unidimensionalmente. La estructura secundaria (en la escala de nm a mm), se encuentra directamente influenciada por la estructura molecular y el solvente, está definida por la morfología de los agregados: micelas, vesículas, fibras, o láminas. Finalmente, la estructura terciaria del gel (escala de nm a mm) implica la interacción de los agregados individuales y determina, en última instancia, si efectivamente se forma el gel o los agregados precipitan de la solución en lugar de atrapar el solvente (Skilling *et al.*, 2014).

2.4.2 Clasificación de geles

La clasificación de los geles (Figura 3) puede darse de acuerdo a su naturaleza, es decir, si su síntesis se da artificialmente o naturalmente, según su constitución en

macromoléculas (constituidos por macromoléculas) o supramoleculares (formados por el auto-ensamblaje de moléculas de bajo peso molecular), y con base al tipo de entrecruzamiento (geles físicos y químicos). En los geles supramoleculares sólo existen entrecruzamientos físicos, estos se mantienen unidos por fuerzas no covalentes; además, son termorreversibles, mientras que los químicos tienen enlaces covalentes y no son termorreversibles. Otra forma de clasificarlos es según el medio en el que se forman; de esta manera se llama organogel, si el disolvente usado es de naturaleza orgánica, o hidrogel si el disolvente es agua (Oteo, 2013; Gupta *et al.*, 2014). En este trabajo se desarrollaron geles de aplicación tópica por que se liberan por ruta transdérmica.

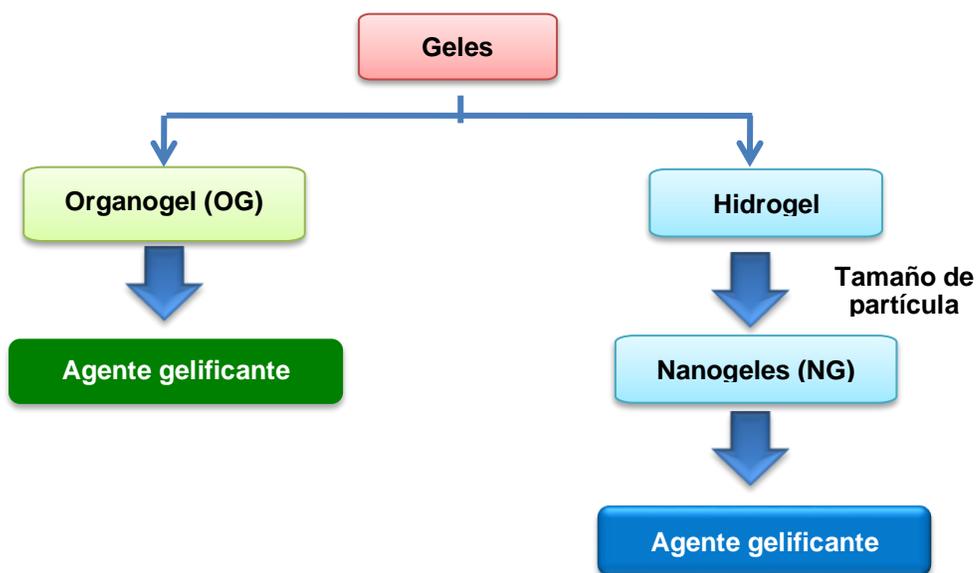


FIGURA 3. Clasificación de geles de acuerdo al medio en el que se forman (Vintiloiu & Leroux, 2008).

2.4.3 Geles transdérmicos

La definición de sistemas de administración transdérmica de fármacos fue propuesta por Alejandro Zaffaroni a principios de la década de los 1970's (Chaudhary *et al.*, 2011). Este tipo de geles son preferibles cuando los medicamentos tienen una baja biodisponibilidad oral debido a que es rápidamente metabolizada en el hígado y/o

una vida media corta, o si los medicamentos producen algunos efectos secundarios adversos tras la administración oral (Kaur & Singh, 2015). El objetivo final de la administración transdérmica de los fármacos es asegurar que los compuestos se administren a una velocidad específica a la circulación sistémica, a pesar del estrato córneo. La curcumina tiene una biodisponibilidad oral deficiente y una vida media biológica corta (1.7 ± 0.5 h). Se ha administrado con dosis orales que varían de 3.6 a 12 g por día, después de una administración oral de hasta 8 g por día; es pobremente absorbida y solo trazas del compuesto aparecen en sangre; por lo tanto, es un candidato adecuado para la formulación transdérmica (Chaudhary *et al.*, 2011). Para lograr liberar el fármaco o compuesto bioactivo exitosamente, se debe buscar un soporte que interactúe con la piel humana y permita la permeación en la piel. Estos dos requisitos son cumplidos por los organogeles y nanogeles (De Vargas *et al.*, 2012).

2.5 Organogeles

Un organogel es una preparación semisólida y termorreversible que incluye una molécula gelificante, una fase orgánica y un solvente polar (Gupta *et al.*, 2014). La formación de un organogel se basa en el auto-ensamblaje de moléculas de bajo peso molecular (< 3000 Da) en una fase apolar, las cuales se auto-organizan en polímeros supramoleculares de naturaleza fibrilar, cuya estructura se mantiene debido a interacciones no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals (Debnath *et al.*, 2014).

Las aplicaciones tópicas de diversos fármacos contenidos en organogeles han demostrado mejorar significativamente la permeación de la piel y la absorción de sustancias tanto lipófilas e hidrófilas. Esto se observó en un estudio donde las tasas de permeación fueron más altas después de incorporar nicardipina en la matriz de un organogel (Aboofazeli *et al.*, 2002; Murashova & Yurtov, 2015).

2.5.1 Preparación de organogeles

Los organogeles se preparan disolviendo las moléculas gelificantes en el aceite líquido a una temperatura ligeramente superior a los puntos de fusión de los componentes para favorecer la dispersión de todo el sistema. Posteriormente, las soluciones calentadas se enfrían a temperatura ambiente y se almacenan en cámaras de refrigeración para inducir la gelificación (Kodali *et al.*, 2009; Septiembre *et al.*, 2011).

2.5.2 Moléculas gelificantes

Entre los gelificantes usados para elaborar organogeles se pueden mencionar derivados de ácidos grasos, derivados de carbohidratos, derivados de sorbitan, urea, derivados de aminoácidos y derivados de lípidos (fosfolípidos). En general las moléculas orgánicas biocompatibles y biodegradables como los fosfolípidos son preferibles debido a que su empleo es seguro (Arellano, 2008; Alvarez *et al.*, 2012; Sreedevi *et al.*, 2012).

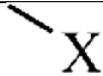
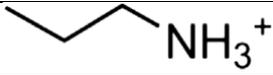
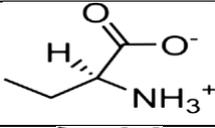
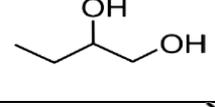
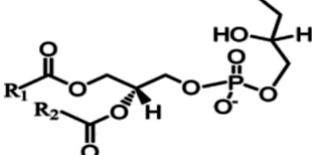
2.5.2.1 Fosfolípidos

Los fosfolípidos (PL) son los principales componentes estructurales de las membranas biológicas y desempeñan un papel crucial en la bioquímica y la fisiología de la célula. Son utilizados como emulsionantes en los alimentos, productos farmacéuticos, y en la preparación de liposomas para los cosméticos (Reddy *et al.*, 2005). Estas moléculas están constituidas por una parte apolar y otra polar donde se encuentran el grupo fosfato y el sustituyente X. En el organismo están presentes como parte de la membrana celular y diversos organelos. La naturaleza del acilo y el tipo de sustituyente X determinan no solo su clasificación, sino también sus propiedades y funciones biológicas (Ochoa *et al.*, 2013).

Su naturaleza anfifílica (debido a la presencia de grupos alquilo o acilo hidrófobo y grupos hidrófilos polares) les permite formar agregados con el agua, tales como

micelas, micelas inversas o vesículas de doble capa. Los fosfolípidos han mostrado efectos benéficos a la salud, tales como reducir el colesterol y triacilglicéridos en la sangre. También han sido considerados efectivos sistemas acarreadores de compuestos y han demostrado poseer propiedades para mejorar la permeación y la hidratación de la piel (Chávez, 2015). La variación en el grupo polar en las cadenas alifáticas y alcoholes conduce a una amplia variedad de fosfolípidos, como se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3. Clasificación de fosfolípidos.

Tipo	Estructura
Fosfolípidos	
Fosfatidilcolina	
Fosfatidiletanolamina	
Fosfatidilserina	
Ácido fosfatídico	
Fosfatidilglicerol	
Cardiolipina	

Fuente: (Li *et al.*, 2014).

2.5.2.2 Fosfolipon 90H®

El Fosfolipon 90H® es el nombre comercial que recibe la lecitina modificada compuesta por 85% de ácido esteárico y 15% de ácido palmítico. La molécula de lecitina, como se puede observar en la Figura 4, incluye residuos de colina, ácido fosfórico, glicerol y dos ácidos grasos, la parte no polar está formada por las cadenas de hidrocarburos de los residuos de ácidos grasos, el resto de los residuos constituyen la región polar. La molécula de lecitina es un ion híbrido por tener una carga positiva en la colina y una negativa en el grupo fosfato. Generalmente se observa un residuo de ácido graso saturado en la posición sn-1 y residuos de ácidos grasos insaturados en la posición sn-2 (Shchipunov, 2001).

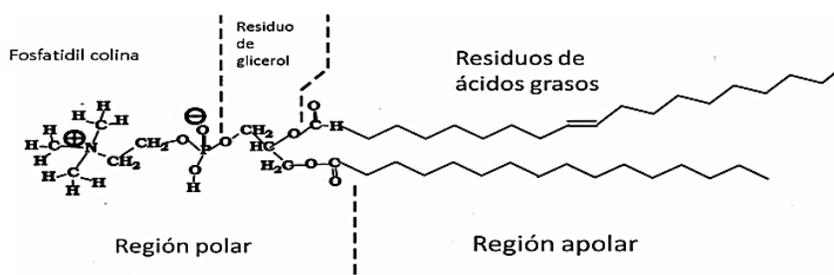


FIGURA 4. Estructura de la lecitina (Joshi *et al.*, 2006).

Los ácidos grasos saturados mejoran la estabilidad oxidativa de los fosfolípidos, en un estudio (Reddy *et al.*, 2005) se enriqueció la fosfatidilcolina (PC) con ácidos palmítico y esteárico usando una transesterificación catalizada por una lipasa (Novozym 435 y Lipozyme TL IM) de PC aislada de lecitina huevo y soya. Los métodos enzimáticos para incorporar ácidos grasos saturados e insaturados hacen uso de lipasas y fosfolipasas. El ácido esteárico es un miembro de los ácidos carboxílicos saturados y es conocido por penetrar en las capas internas lipídicas del estrato córneo, en la Figura 5 se muestra su estructura química. Es usado como aditivo para cremas y aceites de uso tópico en los que ha mostrado un efecto

protector de compuestos bioactivos, además de propiedades hidratantes (Lohan *et al.*, 2016).

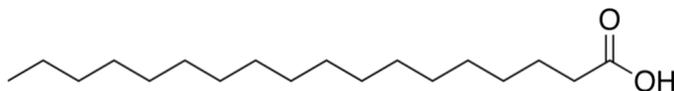


FIGURA 5. Estructura del ácido esteárico (Lohan *et al.*, 2016).

La principal fuente de lecitina es la soya y la yema de huevo; ambas han sido usadas para la formación de organogeles. Debido a sus propiedades anfifílicas logra reducir la tensión interfacial, lo que lleva a la homogeneización de dos líquidos inmiscibles como agua y aceite. Así mismo, posee un gran potencial como acarreador de compuestos bioactivos a través de un organogel (Singh *et al.*, 2015). Dado que esta molécula es un zwitterion, el pH de la fase acuosa influye en el proceso de gelificación (Murashova & Yurtov, 2015).

Al usar lecitina como gelificante, se obtiene un mejoramiento en el transporte que puede ser atribuido a que tiene una zona lipofílica y otra hidrofílica, lo que permite una alta capacidad de solubilización, y a la capacidad para hacer fluir los lípidos de las membranas de la piel. Además, estudios histológicos no han mostrado signos de toxicidad incluso con el uso prolongado de la lecitina (Hoare & Kohane, 2008)

2.5.3 Propiedades de los organogeles

Los organogeles pueden incorporar una amplia gama de sustancias con diversas características fisicoquímicas (naturaleza química, solubilidad, peso molecular y tamaño). Además al ser termodinámicamente estables, la integridad estructural se mantiene durante largos periodos de tiempo. Por otra parte, por su carácter lipofílico, pueden dispersarse de manera eficiente en la piel y mejorar la penetración y el transporte de las moléculas. Finalmente, son biocompatibles y biodegradables, lo

que los hace seguros para aplicaciones a largo plazo. Las propiedades de los organogeles se describen en la Tabla 4 (Kumar & Katare, 2005).

TABLA 4. Propiedades de los organogeles.

Característica	Funcionalidad
Viscoelasticidad	Los organogeles se comportan como un sólido a velocidades de corte bajas mostrando una propiedad elástica. A medida que aumenta la tensión de corte, los puntos que interactúan físicamente entre las fibras comienzan a debilitarse hasta que la tensión de corte es lo suficientemente alta para romper las interacciones entre las estructuras de fibra y el organogel comienza a fluir.
No birrefringente	Cuando se observan bajo luz polarizada dan la apariencia de una matriz oscura. La naturaleza isotrópica de los organogeles no permite que la luz polarizada pase a través de la matriz.
Termorreversibilidad	A medida que los organogeles se calientan por encima de una temperatura crítica, pierden su estructura y empiezan a fluir. Esto se ha atribuido a la interrupción en las interacciones físicas entre las moléculas gelificantes debido al incremento en la energía térmica dentro de los organogeles. Pero, a medida que se enfrían, la interacción física entre los gelificantes prevalecerá y volverán a ser estables.
Termoestabilidad	Mientras que los gelificantes experimentan el auto-ensamblaje, existe una disminución de la energía libre total del sistema por la cual permanecen en un estado de baja energía. Debido a esto son un vehículo termoestable para los agentes bioactivos y para aplicaciones cosméticas, donde se desea una vida útil más larga.

Fuente: (Sreedevi *et al.*, 2012; Mujawar *et al.*, 2014).

2.5.4 Interacción entre la piel y los organogeles

La estructura regular del estrato córneo consta de varias capas hechas de lípidos; esto hace suponer que los lípidos pueden interactuar con los fosfolípidos de la lecitina en el organogel. Dicha interacción puede aumentar la permeabilidad de la piel para los compuestos bioactivos (Murashova & Yurtov, 2015). También se ha sugerido que las micelas que son de tamaño pequeño y que cuentan con una envoltura de hidrocarburos podrían ser recibidas por la piel como entidades hidrófobas, lo cual permite una interacción estrecha con la barrera de la piel que conduce al aumento de permeabilidad de las moléculas del fármaco o mediante la penetración de las fracciones de ácidos grasos en la bicapa del estrato córneo y la consecuente creación de regiones altamente permeables (Debnath *et al.*, 2014; Kumar & Katare, 2005).

2.6 Nanogeles

Los Nanogeles pueden definirse como hidrogeles de tamaño nanométrico compuestos de co-polímeros o monómeros que pueden ser iónicos o no iónicos. El tamaño de los nanogeles oscila entre 20-200 nm. Otra definición es que los nanogeles son redes hidrofílicas tridimensionales de tamaño nanométrico que tienen la tendencia a embeber agua o un fluido fisiológico en gran cantidad, sin cambiar en la estructura interna de la red (Yadav *et al.*, 2017). Esta composición conlleva un módulo elástico en el intervalo de 0.1-100 kPa (Buwalda *et al.*, 2017).

2.6.1 Preparación de nanogeles

Para preparar un nanogel a partir de una nanoemulsión, se debe dispersar la cantidad apropiada de Carbopol 940[®] en la nanoemulsión y mantener en agitación constante (mediante un agitador magnético), teniendo cuidado de evitar la formación de grumos; finalmente se deja hidratar durante 4 a 5 horas (Figura 6). Pasado este tiempo la dispersión se neutraliza con trietanolamina para ajustar el pH a 7, el cual es

cercano al pH de la piel y no causa irritación (Arora *et al.*, 2014). Incorporar la nanoemulsión dentro de nanogeles, puede reducir la coalescencia entre las partículas durante el proceso de emulsificación, debido al incremento en la viscosidad de la fase acuosa (Restrepo *et al.*, 2016). En otro estudio, se mostró que la concentración del agente gelificante (Carbopol 940[®]) en intervalos de 0.5 a 2.0 afectan ligeramente la velocidad de liberación de los fármacos (Altunbas *et al.*, 2011). El agregar Carbopol 940[®] a una nanoemulsión ayuda a que las gotas se distribuyan en la red del gel, lo que puede contribuir a mejorar la estabilidad de las gotas en la nanoemulsión, además de lograr restringir el movimiento browniano. Finalmente, se han reportado recientemente que los nanogeles cambian las propiedades reológicas de las nanoemulsiones para su administración tópica (Mou *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2014). Es importante mencionar que en un sistema de nanogeles con nanoemulsiones contenidas, la estabilidad realmente depende de las nanoemulsiones. La inestabilidad de las gotas en la nanoemulsión se origina a partir de la coalescencia y la maduración de Ostwald, de estas dos, la coalescencia es a menudo considerada como el más importante mecanismo de desestabilización de las nanoemulsiones (Mou *et al.*, 2008).



FIGURA 6. Desarrollo de nanogeles a partir de una nanoemulsión.

Los nanogeles se han utilizado ampliamente para el tratamiento tópico en los últimos años; esto por que poseen características favorables para utilizarlos como vehículos para la liberación controlada y selectiva de fármacos en el organismo: a) poseen una estructura tridimensional que permite almacenar moléculas pequeñas, b) pueden ser

biocompatibles debido al gran contenido de agua que poseen en su estructura, c) reducen de esta forma la irritación producida por la fricción de los tejidos con los que entran en contacto, y d) logran disminuir la desnaturalización de proteínas (Ramirez & Astudillo, 2016). Para preparar el nanogel se pueden utilizar diversos polímeros basados en polisacáridos. Los polisacáridos son todos los polímeros de carbohidratos que contienen al menos veinte residuos de monosacáridos (Yadav et al., 2017). Dentro de las redes del nanogel pueden quedar atrapadas las gotas de una nanoemulsión, para proporcionar una liberación prolongada de un compuesto bioactivo. Así mismo, una nanoemulsión se puede convertir en un gel con el fin de ser más adecuada para aplicaciones dérmicas; esto se logra mediante la adición de diferentes polímeros solubles en agua o matrices de nanogel tales como carbómero, Carbopol 940® y carragenina, de manera que sólo la fase de agua externa se gelifica, mientras que las gotas de la nanoemulsión internas permanecen líquidas (Hoare & Kohane, 2008). En la Tabla 5 se mencionan distintas características de estos sistemas.

TABLA 5. Características de los nanogeles.

Característica	Descripción
Biocompatibilidad y degradabilidad	Son altamente biocompatibles y biodegradables evitando así su acumulación en el organismo.
Mayor capacidad de carga de fármacos.	Debido a la propiedad de hinchamiento que permite que la formulación absorba gran cantidad de agua y así proporcionará espacio de carga suficiente para contener biomateriales.
Facilidad en su preparación	No requiere reactivos tóxicos ni catalizadores y no genera subproductos, lo que lo hace favorable para aplicaciones biomédicas.

Fuente: (Shen *et al.*, 2016).

2.6.2 Ventajas de los nanogeles

Los nanogeles poseen muchas ventajas en la administración de fármacos vía tópica. Pueden ayudar en la creación de una dispersión uniforme y aumentar el tiempo de contacto, que se traducen en una mayor penetración en la piel de los compuestos bioactivos acarreados; además, su tamaño nanométrico y la formación de una red donde se pueden incorporar diversas biomoléculas, las hacen más ventajosas que las micelas, vesículas, liposomas, y otras.

Para aplicaciones biomédicas (Sabitha *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha observado que debido a que las moléculas del compuesto bioactivo se adsorben físicamente en la superficie del nanogel y quedan atrapadas dentro del portador, el tamaño de partícula es un poco más grande que nanogeles testigos sin compuesto bioactivo. Esto se confirmó en un estudio mediante un análisis en un microscopio electrónico de barrido, el cual también mostró la forma esférica de las nanopartículas (Sabitha *et al.*, 2013). Los nanogeles poseen una combinación única de las propiedades potenciales de hidrogeles (hidrofilicidad, flexibilidad, versatilidad y alta absorción de agua) y las ventajas dimensionales de las nanopartículas (Peng *et al.*, 2012). Una investigación realizada en 2009 por Raemdonck *et al.*, demostró que los fármacos hidrófilos y lipófilos de bajo peso molecular y agentes terapéuticos macromoleculares pueden incorporarse a la red de un nanogel. Esto se da por: a) atrapamiento físico y/o b) interacciones no covalentes. El atrapamiento de los agentes terapéuticos dentro de la red del nanogel implica, en la mayoría de los casos, que los compuestos están presentes en la solución del polímero durante el proceso de gelificación. Gong *et al.* (2013) demostraron que se puede usar un nanogel para el tratamiento de lesiones y que puede liberar los fármacos de manera sostenida. Otra ventaja observada fue que los copolímeros usados pueden ser biodegradables (Gong *et al.*, 2013).

2.6.3 Componentes de los nanogeles

2.6.3.1 Nanoemulsión

La nanoemulsión es un sistema prometedor para la administración transdérmica de fármacos y se define como una solución líquida termodinámicamente estable con un diámetro de gota por lo general en el intervalo de 10- 200 nm, que consiste en aceite, un agente tensioactivo y una fase acuosa. Las nanoemulsiones son interesantes como vehículo para productos tópicos, ya que tienen partículas muy pequeñas que causan la reducción de la fuerza gravitatoria y evita que se produzca la sedimentación, además de que impide el proceso de floculación y coalescencia. También cabe destacar su baja tensión interfacial que aumenta la humectabilidad, la propagación y las propiedades de penetración (Oliveira *et al.*, 2011). Además, tienen otras ventajas significativas incluyendo poca irritación de la piel, poderosa capacidad de permeación y alta capacidad para acarrear fármacos para el suministro tópico, en comparación con microemulsiones o liposomas. Cuando se utiliza para el suministro tópico de fármacos, posee otras ventajas. En primer lugar, los ingredientes pueden reducir la barrera de difusión de la capa córnea y aumentar la velocidad de permeación del fármaco a través de la piel al actuar como mejoradores de la permeación, y hay una mayor concentración del fármaco que entrará en contacto con la piel. Sin embargo, su baja viscosidad limita su administración transdérmica. La incorporación de una nanoemulsión en la matriz de un gel puede ser más relevante para la aplicación transdérmica en comparación con la nanoemulsión sola (De Vargas *et al.*, 2012; Arora *et al.*, 2014).

En un estudio llevado a cabo por Arora *et al.* (2014) se prepararon diversas formulaciones de nanoemulsiones que tuvieron bajas viscosidades y fueron inapropiadas para su uso dérmico. Con el fin de conferirle aplicabilidad a las nanoemulsiones, se incorporó en el sistema el carbomero 940 y se observó un aumento en la viscosidad, lo que mejoró su aplicación tópica. Una nanoemulsión hecha gel es preferible debido al efecto prolongado y una mayor viscosidad que mejora la aplicabilidad en la piel. En otro estudio (Oliveira *et al.*, 2011) se desarrolló

un nanogel a partir de nanoemulsiones con vitamina A; dichos sistemas mostraron buena estabilidad, tamaño de gota pequeño y un aumento en la viscosidad, siendo posible utilizarlo como un sistema de administración para aplicación tópica.

2.6.3.1.1 Medición del tamaño de partícula de la nanoemulsión

Mientras que en el organogel el tamaño de partícula no es importante, en el caso del nanogel es indispensable corroborar que el tamaño de la partícula contenida en el sistema se encuentre dentro de los intervalos establecidos (10 – 200 nm). El tamaño de partícula de los nanogeles que estabilizan la emulsión. No se pueden medir empleando métodos tradicionales de dispersión de luz o por medio de microscopio óptico, debido a que la fase acuosa se encuentra gelificada y el tamaño de partícula es demasiado pequeño. Pequeños tamaños de gotas son requisito previo para la administración de fármacos en la piel, ya que las gotas de aceite tienden a fusionarse con la piel, proporcionando así un canal para la administración de fármacos. Esto se puede determinar usando microscopía con el fin de confirmar el tamaño de partícula obtenido mediante la espectroscopia de dispersión de láser (Modi & Patel, 2011).

2.6.3.1.2 Medición de la estabilidad de la nanoemulsión

Mediante el uso del equipo Turbiscan Lab[®] Expert es posible medir la estabilidad de nanoemulsiones y detectar los fenómenos de inestabilidad más temprano de lo que normalmente es posible a simple vista. El Turbiscan Lab[®] Expert basa su funcionamiento en la incidencia de un haz de luz sobre la muestra, la cual recibe dos señales: una de transmisión y otra de retrodispersión (Celia *et al.*, 2009). Entre las ventajas de este equipo está el que la muestra no necesita ser procesada, no altera al sistema y la detección del mismo es 50 veces más rápido que el ojo humano (Lecmarchan *et al.*, 2003).

La modificación de una señal de retrodispersión puede producirse en función del tiempo y la migración de partículas, esto se representa en una gráfica en forma de picos positivos (aumento de retrodispersión) o negativos (disminución de retrodispersión). Concretamente, la migración de partículas de la parte inferior a la parte superior de una muestra conduce a una disminución progresiva de la concentración en el fondo de la muestra y como consecuencia una disminución en la señal de retrodispersión (pico negativo) y un aumento en la intensidad de la transmisión (pico positivo). Además, proporciona información sobre el tipo de proceso de desestabilización que tiene lugar, pudiendo discriminar entre la migración de partículas (cremado o sedimentación), que es un proceso reversible, y la variación del tamaño de las partículas (coalescencia), que a menudo es irreversible. De hecho, para partículas más pequeñas que la longitud de onda incidente un aumento en el tamaño conduce a una disminución en el perfil de retrodispersión (Celia *et al.*, 2009).

2.6.3.2 Carbopol 940®

El Carbopol 940® es un derivado poliacrílico aniónico en el que el grado de ionización depende significativamente del pH del medio. Es uno de los excipientes más ampliamente utilizados para el espesamiento de sistemas tópicos como lociones, cremas y geles, y pueden formar un nanogel en agua o solución alcalina debido a la ionización de los grupos carboxílicos. El Carbopol 940® posee propiedades deseables como gelificación, alta viscosidad a baja concentración y es estable al calor con una variabilidad insignificante de lote a lote, en la Figura 7 se puede observar su estructura. Además aumenta la estabilidad de la formulación, y no es compatible con el crecimiento bacteriano o fúngico, y la formulación resultante tiene una textura agradable y no es irritante (Oliveira *et al.*, 2011; De Vargas *et al.*, 2012). Kumar *et al.*, (2015) encontraron que los geles que contienen Carbopol 940® son adecuados para gelificar nanoemulsiones debido a su consistencia, sensación y alta capacidad de extensión. La estructura de los geles de Carbopol 940® puede ser determinada por el

nivel en el que las macromoléculas se conectan y forman los entrecruzamientos (Alves *et al.*, 2005).

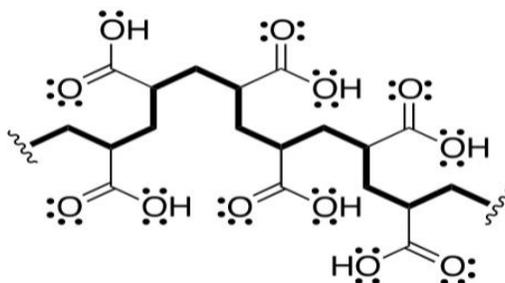


FIGURA 7. Estructura del Carbopol 940®.

2.6.4 Interacción entre la piel y los nanogeles

La entrega transdérmica de fármacos a través de nanogeles mejora el potencial de permeabilidad de los diferentes componentes del sistema. Entre los mecanismos que ayudan a mejorar la capacidad de penetración de nanogeles por vía tópica, diversos autores han afirmado que las gotas con una carga modificada tienen influencia significativa en la afinidad y unión a la piel, lo que podría promover la biodisponibilidad y actuar como depósitos de fármacos, donde el compuesto se libera de la fase interna a la fase externa y luego sobre la piel. Debido a los pequeños diámetros de las gotas en las nanoemulsiones, éstas pueden incrustarse en el estrato córneo y las moléculas del compuesto bioactivo podrían ser liberadas directamente a través de la fase hidrófila de las nanoemulsiones. Además, el número de gotas que puede interactuar en el área fija del estrato córneo aumenta a medida que disminuye el tamaño de gota (Mou *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2014). Por otra parte, los nanogeles se han utilizado para crear depósitos que suministren los agentes bioactivos y lograr con esto aumentar la biodisponibilidad del fármaco, reducir los efectos secundarios, aumentar la facilidad de su uso y reducir el dolor de la administración (Altunbas *et al.*, 2011). El uso de nanoacarreadores en el suministro

de curcumina puede mejorar su biodisponibilidad y la administración dirigida. En otro estudio se observó que los nanogeles cargados con curcumina eran más rígidos que los nanogeles sin curcumina, lo que mejoraría la aplicación tópica, esto podría ser debido a que la curcumina que reside en el núcleo hidrofóbico de las fibrillas causa el endurecimiento de los puentes presentes entre diferentes fibrillas y de este modo se producen más entrecruzamientos en la red, así mismo se observó que la curcumina también puede ser atrapada dentro de la red de fibrillas autoensambladas (Altunbas *et al.*, 2011). La liberación controlada de curcumina también dio como resultado la biodisponibilidad y estabilidad mejoradas (Lelli *et al.*, 2017).

Así, se puede observar que los dispositivos nanométricos son cada vez más importantes, ya que ofrecen la oportunidad de aumentar el efecto biológico de la curcumina por el aumento de su vida media *in vivo* en un grupo de ratones logrando reducir su liberación a los tejidos no dañados (Serri *et al.*, 2017). En otro estudio, los investigadores evaluaron la eficacia de curación de heridas *in vitro* e *in vivo* de un nanogel de curcumina. Los resultados demostraron que los grupos de ratones tratados con el nanogel expusieron una mayor cicatrización durante el tratamiento, en comparación con el grupo testigo que fue tratado con solución salina (Hussain *et al.*, 2017). En otro estudio, la velocidad de permeación de un nanogel con nanoemulsiones contenidas fue dos veces mayor que la de la solución del fármaco libre; por otra parte, el contacto del nanogel con nanoemulsiones contenidas con la piel mejoró y actuó como clave para la permeación del fármaco a través de piel. La formulación optimizada se comparó con una formulación comercializada y mostró significativamente un mayor perfil de permeación que justificaba el uso de este sistema para su uso en la administración transdérmica de ketoprofeno (Arora *et al.*, 2014).

2.7 Prueba de tubo invertido

El método más simple para establecer la formación de un gel es llevar a cabo la prueba de tubo invertido. Después de homogeneizar la muestra, se invierte el tubo

de ensayo; si el contenido del tubo de ensayo fluye, el sistema se considera como sol (o tal vez un gel débil), lo que indica que la composición particular ha fallado para inducir la gelificación, por lo que el sistema se considerará como gel si el contenido del tubo de ensayo no fluye (Sagiri *et al.*, 2014).

La cantidad mínima de gelificante que se requiere antes de que pueda inducir la gelificación a temperatura ambiente se conoce como la concentración crítica gelificante. Si la concentración del gelificante está por debajo de esta concentración, el gelificante fallará al inducir la gelificación y el sistema permanecerá en la fase líquida. En el gel existe un límite crítico superior de acomodamiento en la fase acuosa, si este límite es superado, la gelificación no se da o se puede producir un sistema bifásico, donde el exceso de agua no es retenido dentro de la estructura en red (Kumar & Katare, 2005).

2.8 Caracterización de geles

2.8.1 Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Mediante la calorimetría diferencial de barrido (DSC) se pueden determinar las temperaturas a las que se producen cambios de estado, estructurales o procesos degradativos en los organogeles. El instrumento opera con nitrógeno y consta de dos celdas. Una cápsula es la referencia, la cual es de aluminio y está cerrada sin contener ningún material en su interior, la otra contiene el material que se analiza. La temperatura se varía a una velocidad determinada junto con el flujo de calor, se debe mantener la igualdad de temperaturas entre la celda con la muestra y la referencial. Cuando la muestra experimenta una transición, los calefactores suministran la energía adicional al material para mantener el equilibrio térmico entre la muestra y la referencia. De esta manera, el termograma obtenido muestra el flujo de calor o entalpia con respecto al tiempo. Como la velocidad de calentamiento o enfriamiento es constante, el termograma equivale a una representación del flujo de calor respecto a la temperatura (Klang & Valenta, 2011).

2.8.2 Caracterización reológica

El estudio del comportamiento reológico es esencial para cualquier vehículo que se utiliza para aplicaciones de administración de fármacos de uso tópico. Es importante para su eficacia en la liberación de las moléculas sobre o a través de la zona de la piel. Los parámetros críticos, tales como la extensibilidad, la adhesividad (propiedad relacionada con la bioadhesión en el sitio de la piel), cohesividad (que indica la reforma estructural después de la aplicación de esfuerzo de corte), y la consistencia de gel, deben ser modificados de una manera favorable. Se ha encontrado que la mayoría de geles muestran propiedades reológicas plásticas (Sagiri *et al.*, 2014).

Los barridos de deformación son útiles para determinar la región viscoelástica lineal (RVL) así como los valores del esfuerzo y la deformación críticos. La RVL se define como el intervalo de esfuerzos en el que los valores de las funciones viscoelásticas no varían significativamente (Santos *et al.*, 2013). Las funciones viscoelásticas elegidas para el análisis de los sistemas son el módulo de almacenamiento o elástico (G'), el cual se relaciona con la energía que acumula el material estudiado por cada ciclo de oscilación, el módulo de pérdida (G''), asociado con la energía que se disipa y por tanto con el componente de viscosidad así como la función de control (Clemente *et al.*, 2013). En este tipo de materiales se espera que la elasticidad, medida con la G' , sea mayor que la energía disipada o comportamiento viscoso, determinado por G'' (Oteo, 2013).

2.8.3 Caracterización morfológica

La microscopía electrónica es de suma importancia para obtener información sobre la morfología de los sistemas con resolución atómica cercana. Entre las técnicas de microscopía electrónica más frecuentemente empleadas para esta tarea se encuentra la microscopía electrónica de barrido (SEM) (Klang *et al.*, 2013).

La característica esencial de un microscopio de barrido es que la imagen se forma punto por punto explorando con una sonda a través de la muestra. La sonda de un SEM es un haz de electrones enfocado, y una señal detectada se muestra como una imagen de tipo Dispositivo de Carga Acoplada (CCD). Los electrones primarios penetran en el espécimen sólido y son afectados por un gran número de procesos de dispersión elástica. El espectro energético de los electrones que sale de la muestra es recogido por el sistema detector y da como resultado tres tipos de información específica. Los electrones secundarios (SE), los electrones retrodispersados (EEB) y los rayos X. La topografía superficial cuasi-3D puede registrarse principalmente debido a las SE, es decir, todos los electrones emitidos con energías de salida inferiores a 50 eV. Los instrumentos SEM generalmente emplean energías de electrones de unos 10 keV para proporcionar una resolución nanométrica, que es suficiente para muchos análisis (Klang *et al.*, 2013).

Las principales características del análisis SEM, es la resolución de la imagen y la profundidad de campo, lo cual permite obtener imágenes con apariencia 3D, determinando la topografía de la muestra en diferentes campos (Perez-Arategui & Mulvey 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

La inflamación crónica se relaciona con numerosas patologías, por lo que se ha buscado detenerla por medio de diversos tratamientos, entre los que destacan los compuestos bioactivos.

La curcumina es un compuesto bioactivo que ha demostrado buenos resultados sobre la inflamación y que requiere un sistema acarreador para incrementar su efecto.

Los organogeles y nanogeles se han convertido en sistemas portadores potenciales de diversos compuestos bioactivos, así mismo incrementan la absorción en la piel, por lo que en este estudio se busca evaluar la bioactividad antiinflamatoria de ambos sistemas sobre un edema auricular en un modelo murino.

4. HIPÓTESIS

La administración tópica de un nanogel como acarreador de curcumina provocará una mayor disminución de la inflamación auricular en comparación con un organogel en un modelo murino.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria de la curcumina acarreada en un organogel y un nanogel en un modelo murino con edema auricular.

5.2 Objetivos específicos

1. Formular y desarrollar un organogel y un nanogel como vehículos acarreadores de curcumina.
2. Caracterizar un organogel y un nanogel como vehículos acarreadores de curcumina.
3. Evaluar la actividad de ambos sistemas en un modelo murino con edema auricular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Todos los compuestos químicos y solventes utilizados fueron grado analítico o HPLC. El emulsificante fue lecitina de soya 98% de pureza (Shenyang, Liaoning, China). En las nanoemulsiones se utilizó curcumina con una pureza de 99% (Sigma-Aldrich, Alemania) y glicerol grado reactivo (J. T. Baker); para preparar los nanogeles se empleó carbopol 940[®], y los organogeles tuvieron como gelificante Fosfolipon 90H[®]. Para inducir el edema auricular en los sujetos de estudio se hizo uso del 13-Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (Sigma-aldrich, Alemania).

6.2 Métodos

En el presente trabajo se evaluó la bioactividad antiinflamatoria *in vivo* sobre un modelo murino con edema auricular.

Para completar el trabajo se llevaron a cabo tres fases:

1. Formulación y desarrollo de organogeles y nanogeles.
2. Caracterización de organogeles y nanogeles.
3. Evaluación la bioactividad antiinflamatoria sobre un modelo murino con edema auricular.

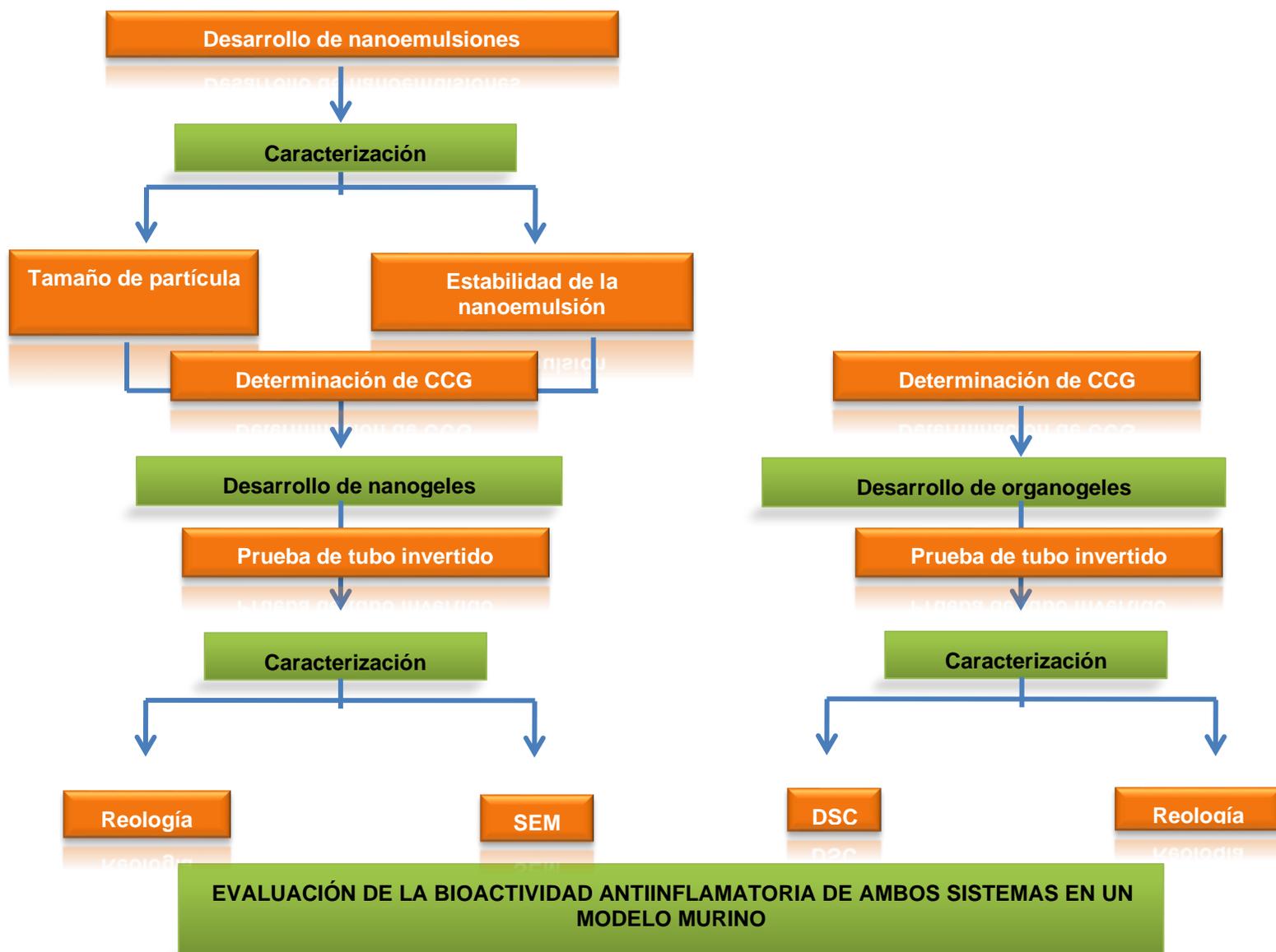


FIGURA 8. Diagrama de flujo experimental

6.2.1 Diseño experimental para la formulación de organogeles

Se realizó un diseño de experimentos de 3^2 , las variables que se eligieron son la concentración de Fosfolipon 90H® (25%, 35% y 45%) y la concentración de curcumina (5 mg, 15 mg y 25 mg). El diseño se realizó con 9 tratamientos, cada uno con una réplica. Las distintas formulaciones se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6. Niveles y factores del diseño de experimentos para la preparación de organogeles. El contenido de aceite de triglicéridos de cadena media fue el restante para completar el 100% de la formulación.

Tratamiento	Emulsificante (%) Fosfolipon 90H®	Curcumina (mg)
1	25	5
2	35	5
3	45	5
4	25	15
5	35	15
6	45	15
7	25	25
8	35	25
9	45	25

6.2.2 Determinación de concentración crítica gelificante

Se llevó a cabo la determinación de la concentración crítica gelificante. Para llevar a cabo este paso, se prepararon organogeles utilizando distintas concentraciones del gelificante: 10%, 15% y 25%. Una vez preparados los sistemas, se invirtieron durante una hora para observar si fluían y encontrar el valor mínimo de gelificante que logra formar la red tridimensional del gel (Sullivan *et al.*, 2016).

Para determinar la concentración crítica gelificante de los nanogeles, se llevó a cabo la misma metodología; sin embargo, se variaron las concentraciones de gelificante empleadas (0.25%, 0.5% y 1%).

6.2.3 Desarrollo de organogeles

Para formar los organogeles, el Fosfolipon 90H® y la curcumina se mezclaron con un aceite comercial de ácidos grasos de cadena media dentro de tubo de 1.5 cm de diámetro. Las muestras se prepararon disolviendo todos los componentes

usando una estufa de secado a 110°C, con lo que se obtuvo la fusión completa de todos los componentes. A continuación, la mezcla homogénea se agitó usando un vortex y se regresó a la estufa para fundir nuevamente los componentes y lograr una completa homogenización; después se dejó enfriar a temperatura ambiente (24°C) para finalmente almacenarse en una cámara de refrigeración a 15°C (Sato, 2009).

6.2.4 Prueba de tubo invertido

El método del tubo invertido es el método más empleado para confirmar la gelificación. En este método, la cantidad pesada del gel se tomó en un tubo de ensayo; este fue calentado cuidadosamente a 110°C para fundir completamente el sistema. A continuación, se dejó enfriar el vial durante tres horas en una cámara de refrigeración a 15°C para posteriormente retirar los organogeles e invertirlos una hora a temperatura ambiente (Balasubramanian *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2014). Después de la inversión durante una hora, la ausencia de flujo indica la formación de gel y puede suponerse que la muestra ha logrado formar la red entrecruzada que evita el flujo del líquido atrapado (Sagiri *et al.*, 2012).

Los nanogeles desarrollados también fueron analizados mediante esta prueba siguiendo la metodología descrita.

6.3 Caracterización de organogeles

6.3.1 Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Esta técnica ha sido muy utilizada para el estudio de los nanogeles. Mediante ella pueden medirse los cambios de masa y efectos térmicos en los nanogeles, en función de la temperatura (Saraydin *et al.* 1995).

Se llevó a cabo un análisis térmico usando un equipo de calorimetría diferencial de barrido (DSC) Q2000 de TA Instruments para la caracterización de los geles. La unidad DSC fue calibrada con Indio, las muestras (7 mg) fueron introducidas en

cápsulas de aluminio herméticamente selladas y calentadas en un intervalo de temperatura de 25-110°C a un incremento constante de 5 °C/min y 10°C en una atmósfera de nitrógeno controlada (mL/min). Los termogramas obtenidos para las muestras fueron analizados y se realizó un duplicado de cada muestra. Como referencia, se usó una cápsula de aluminio vacía herméticamente cerrada.

Para cada muestra se pesaron de 10 a 15 mg. Se establecieron tres etapas: la primera, de calentamiento desde 25 hasta 110 °C a una velocidad de 5 °C/min; la segunda etapa, de enfriamiento desde 110 hasta 15 °C, a la velocidad citada; y, una tercera, nuevamente llevada de 15 a 110 °C.

6.3.2 Caracterización reológica

Los organogel desarrollados fueron analizados reológicamente utilizando un reómetro modelo Discovery HR2 (TA Instruments, NewCastle, DL, USA) con geometría de plato:plato de 40 mm de diámetro y 2° del ángulo del cono, equipado con un control de temperatura Peltier situado en la base de la geometría. Para obtener las mediciones reológicas se estableció la posición inicial del hueco en 500 µm. Sin embargo, de acuerdo al espesor de cada organogel, la anchura del hueco pudo variar con el fin de utilizar una fuerza normal de cero durante las mediciones. El barrido de deformación se realizó entre 0.1 y 1000 %, a 25 °C y la frecuencia fija a 1 Hz, además se establecieron las mismas etapas que se usaron en el análisis por DSC previamente descrito (sección 6.3.1).

Los nanogel desarrollados fueron evaluados usando esta metodología con algunas modificaciones, debido a que no se realizaron cambios de la temperatura.

6.4 Diseño experimental para la formación de nanogel

Se evaluó el efecto de dos factores en las características de los nanogel mediante un diseño factorial 3². Los factores estudiados fueron: concentración del agente gelante y tiempo de activación. El diseño estuvo compuesto de un total de

nueve tratamientos. Las formulaciones de los nanogeles pueden verse en la Tabla 7.

TABLA 7. Diseño factorial para la preparación de nanogeles acarreadores de curcumina con emulsificante sin modificar.

Tratamiento	Tiempo de activación (horas)	Carbopol 940® (% w/w)
1	6	0.5
2	12	0.5
3	24	0.5
4	6	1
5	12	1
6	24	1
7	6	1.5
8	12	1.5
9	24	1.5

El gelificante fue agregado a 5 g de la nanoemulsión previamente preparada.

A estos tratamientos se les realizaron pruebas de reología (Vishwanath, 2016), de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Zumaya *et al.*, 2009), y microscopia electrónica de barrido (SEM) para la determinación de las características físicas del sistema final (Sánchez, 2007).

6.4.1 Preparación de nanogeles

Con el fin de preparar nanogeles que contienen nanoemulsiones de curcumina, se dispersó el Carbopol 940® a concentraciones de 0.5% 1% y 1.5%, de acuerdo al diseño de experimentos en la nanoemulsión previamente preparada y se dejó reposar de 6-24 horas, para que se desarrollara el gel (Atul *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2012).

La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente y se neutralizó con trietanolamina para obtener un nanogel con un pH de 7 (Ángel *et al.*, 2016).

6.4.2 Formación de nanoemulsiones

Previo a la preparación de los nanogeles, se formulación las nanoemulsiones, estas se prepararon siguiendo el método de hidratación en capa delgada reportado por Chávez (2015) y Agame (2017). Para la fase dispersa la curcumina se disolvió en 5 mL de etanol; se agregó el aceite de triglicéridos de cadena media y la mezcla se agitó orbitalmente durante 30 minutos a 45°C. La fase dispersante consistió de la cantidad suficiente de agua, PC y glicerol (5% y 25% respectivamente), ambas fases se terminaron de mezclar en un baño ultrasónico Aquawave 9376 (Barnstead/Labline) durante un minuto, finalmente las dos fases se homogenizaron manualmente y se llevaron a un homogeneizador T25 digital ULTRA-TURRAX homogenizer (IKA Works, inc., SE Wilmington NC) durante 3 minutos a 20,000 rpm para producir una emulsión gruesa que posteriormente se sometió a ultrasonificación a 20% de amplitud (9 watts) y 50 % del ciclo de trabajo en un Sonicador Branson Digital S-450D (Emerson Electric Co., St. Louis MO) durante 3 minutos para obtener la nanoemulsión.

6.4.3 Tamaño de partícula de las nanoemulsiones

Se determinó el tamaño de partícula usando un equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments Inc.), el cual emplea la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS). Analizar dicho parámetro es de suma importancia debido a que influye en el tiempo de almacenamiento y estabilidad, reología del producto, las propiedades ópticas, así como la apariencia, biodisponibilidad y textura (McClements, 2016). Las muestras fueron depositadas en celdas Versa Flour Cuvette 170-2415, antes de medir su tamaño de partícula en el equipo se diluyeron con agua destilada desionizada utilizando un factor de dilución 1:30 v/v (nanoemulsión: agua).

6.4.4 Caracterización de las nanoemulsiones

Se evaluó, además, la estabilidad durante dos días de las nanoemulsiones contenidas en el nanogel a 15°C empleando un analizador óptico de dispersión de luz, Turbiscan Lab® Expert (Formulacion, Francia) (Yuan et al., 2008; Camino, 2011). Para llevar a cabo esta tarea se depositó la nanoemulsión en una celda cilíndrica de vidrio y se analizó mediante un haz de luz emitida en la longitud de onda del infrarrojo cercano (880 nm) que escanea de arriba abajo dicha celda (Mao et al., 2010). En este equipo dos sensores ópticos diferentes reciben la luz transmitida y retrodispersada por las muestras en un ángulo de 180° y 45°, con respecto a la radiación incidente, respectivamente (Celia et al., 2009). Los dos sensores escanearon toda la altura (~8 mm) de la celda que contenía la nanoemulsión (6 mL) durante 48 horas con lecturas de dos minutos.

6.5 Caracterización de nanogeles

6.5.1 Microscopia electrónica de barrido

Para analizar la estructura de los nanogeles se utilizó un microscopio electrónico de barrido (FE- SEM) modelo MIRA3 marca TESCAN de alta resolución (aproximadamente de 1.5 nm), con Beam Deceleration Technology (BDT9). Se trabajó con bajos voltajes para evitar dañar la muestra, el modo de operación del microscopio electrónico de barrido que fue necesario utilizar, para obtener las imágenes de mayor calidad, fue sobre bajo vacío en un modo de operación de la óptica electrónica *Resolution* con el detector de electrones secundarios (SE). Se trabajó con voltajes a diferentes campos 9 kv y 10 kv, con distancias de trabajo de ± 9 mm entre el *stup* y el condensador y magnificaciones de 9kx, 40kx y 120kx, las imágenes se capturaron con el software *atla* en formato TIF. Un requisito para poder observar las imágenes es que las muestras estén secas, además deben ser lo más planas posibles para así generar una imagen homogénea y además debe ser conductora ya que, de lo contrario, durante la irradiación habría una acumulación de carga y la imagen aparecería distorsionada, un paso previo para

evitar esto es colocar la muestra sobre una cinta de carbono la cual previamente, fue puesta sobre el pin. Para optimizar la visualización de los nanogeles, se realizó una deshidratación con isopropanol (100 %) los cuales tuvieron un efecto en la resolución de las imágenes tomadas, sin afectar la estructura del sistema.

6.6 Evaluación de la bioactividad *in vivo*

Se utilizaron ratones CD-1 que fueron asignados al azar en grupos de 5 ratones, los cuales se mantuvieron en un periodo de adaptación de dos semanas con dieta comercial y agua *ad libitum*, se colocaron en un ambiente climatizado de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y en ciclos de 12 h de luz y oscuridad. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana-NOM-062-ZOO-1999. Se tuvo un total de 2 testigos y 5 grupos como se observa en la Tabla 8.

TABLA 8. Grupos experimentales para el estudio de bioactividad.

Testigo	Testigo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Edema	Sano	Inductor	Inductor	Inductor	Inductor	Inductor
		Diclofenaco	CL	HG	OG	NG
5	5	5	5	5	5	5

CL: Curcumina libre

HG: Hidrogel

OG: Organogel

NG: Nanogel

6.6.1 Inflamación crónica inducida por aplicación repetida de TPA en oreja de ratón

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de cinco individuos. El TPA se administró a la dosis de 2 μg /oreja en 20 μL de acetona, depositando 10 μL a cada lado de las dos orejas del ratón. El agente irritante se aplicó tópicamente cinco veces en días alternos por la mañana. Los tratamientos se

aplicaron durante la segunda semana con dos dosis diarias, el último día de experiencia sólo se aplicó por la mañana y 6 horas más tarde se sacrificaron a las unidades experimentales por dislocación dorsal y se extrajeron porciones de las orejas con un sacabocados. Se pesaron las orejas y se determinó el edema por diferencia de peso con respecto a un grupo testigo. La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la siguiente expresión matemática:

$$\%I = \frac{\Delta P_c - \Delta P_p}{\Delta P_c} \times 100$$

Donde:

ΔP_c = (media de pesos de las orejas tratadas con TPA) – (media de pesos de las orejas sin tratamiento).

ΔP_p = (media de pesos de las orejas con el tratamiento) – (media de pesos de las orejas sin tratamiento) (Kulkarni *et al.*, 2015).

6.6.2 Análisis histológico

Posterior al sacrificio de los sujetos de estudio por dislocación dorsal, se realizó la disección de muestras de la oreja inflamada con un sacabocados, las muestras se conservaron en formaldehído al 10% para realizar el estudio histológico de cada uno de los tejidos sanos y enfermos para evitar la autólisis del tejido. Se realizó una descripción macroscópica y se tomaron tres cortes de la muestra, los cuales se encapsularon en histocassetes y se dejaron nuevamente en formol al 10%. El siguiente paso fue usar un procesador automático de tejidos el cual tiene distintas soluciones, cada una programada con un tiempo específico. El primer paso es una deshidratación, para lo cual se colocaron en alcoholes a diferentes concentraciones (70% 80% 90% y 100%), para lograr un desprendimiento celular, en el segundo paso se pasaron las muestras a xilol para lograr un aclarado.

El siguiente paso es la inclusión que consistió en depositar las muestras en un baño de parafina líquida a 60°C, se tomó el histocassete y se retiró el tejido para depositarlo sobre un molde al que previamente se le agregó parafina líquida; con presión manual se fijó la muestra al molde, se agregó más parafina y se llevó a una superficie fría a 4°C para retirar el bloque de parafina que contenía el tejido y con el cual se realizó el corte histológico en el micrótopo.

Una vez que se obtuvo el corte deseado se llevó a un baño de flotación con una temperatura entre 40-45°C, donde la muestra se extendió por completo, se colocó en un portaobjetos, se dejó en una estufa de secado por 40 minutos para retirar el exceso de parafina y se continuó con la tinción.

Para eliminar la parafina se usaron una serie de alcoholes para rehidratar el tejido y que éste pudiera ser teñido por los colorantes acuosos; una vez devuelta el agua al tejido, fue posible meter la muestra en la cubeta de hematoxilina, la cual tiñó los núcleos de color azul, posteriormente se tiñeron los citoplasmas de color rojo con la eosina y se retiró el exceso con agua, en el último solvente (xilol) se mantuvieron todos los portaobjetos hasta que se les colocó un cubreobjetos con resina. Por último, se dejaron secar toda la noche para su almacenamiento y de esta forma fueron observados en un microscopio Olympus BX51 con cámara acoplada; se utilizaron los objetivos 10x y 40x en cada una de las láminas, los cortes se hicieron por duplicado.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados de los diseños fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias mediante la prueba Tukey, con un nivel de significancia del $p < 0.05$ utilizando el software estadístico MINITAB 17.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Organogeles

7.1.1 Concentración crítica gelante

Se llevaron a cabo experimentos donde se obtuvo la CCG. Los sistemas finales se pueden observar en la Figura 9 donde se aprecia que la CCG fue con el 25% de Fosfolipón 90H®.

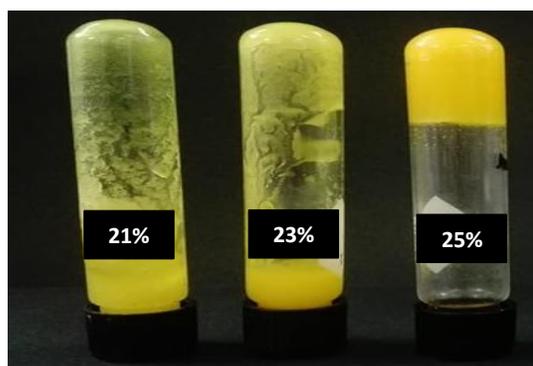


FIGURA 9. Evaluación de la concentración crítica gelante de organogeles

7.1.2 Desarrollo de organogeles

Siguiendo la metodología descrita en la sección 6.2.3 se desarrollaron los organogeles estipulados en el diseño de experimentos, en la Figura 10 se observa el aspecto de los sistemas finales.

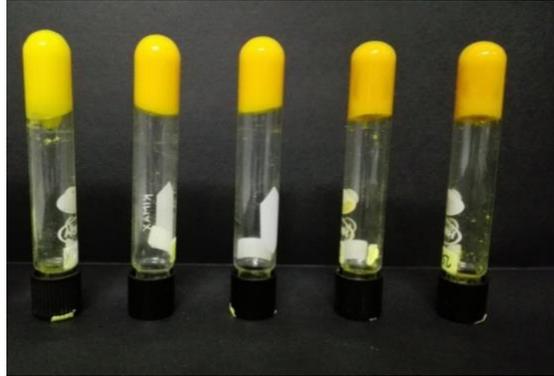


FIGURA 10. Organogeles desarrollados durante la prueba de tubo invertido.

7.1.3 Prueba de tubo invertido

Los organogeles desarrollados pasaron la prueba del tubo invertido (Figura 10), la formación del gel puede deberse a las transiciones a nivel micelar hacia un líquido newtoniano de baja viscosidad que consisten en micelas inversas de lecitina en el aceite, dando como resultado la formación de la red tridimensional (Bhatia *et al.*, 2013).

7.1.4 Calorimetría Diferencial de barrido (DSC)

Se llevó a cabo un análisis térmico usando un equipo de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se calcularon los parámetros de temperatura de fusión (T_m) y entalpia de fusión (ΔH_m) para los barridos de calentamiento (fusión) y temperatura de cambio de fase durante la rampa de enfriamiento usando el software TA Universal Analysis 2000 (versión 5 TA Instrument). Las mediciones de DSC indicaron que la temperatura de fusión (T_m) era de aproximadamente 77°C en todos los organogeles desarrollados; en dicha temperatura se observó un claro pico endotérmico (Figura 11); dicho pico corresponde al Fosfolipon 90H[®], el cual al meterse solo dentro del equipo marcó dicha tendencia, también se observó un pico exotérmico en el enfriamiento; finalmente en la segunda calefacción, se volvió a observar el pico a aproximadamente 80°C , confirmando así la reversibilidad de esta transición. Este es un comportamiento ya reportado en diversos artículos

(Oteo, 2013; Sung *et al.*, 2015), y estos resultados contrastan con los obtenidos por Borkar *et al.* (2015) quienes evaluaron la viabilidad de mejorar la solubilidad acuosa de extracto de Centella estandarizado mediante la preparación de un complejo vesicular usando Fosfolipon 90H®, si bien encontró que el Fosfolipon 90H® mostró dos picos (uno endotérmico y otro exotérmico) al igual que en la presente investigación, las temperaturas fueron de 125 °C y 182 °C, respectivamente. El primer pico probablemente se deba a la fusión del fosfolípido mientras que el segundo pico puede atribuirse a la transición de fase del gel a un estado líquido-cristalino, y la cadena de carbono en el fosfolípido puede haber experimentado quizás otros cambios isoméricos o cristalinos.

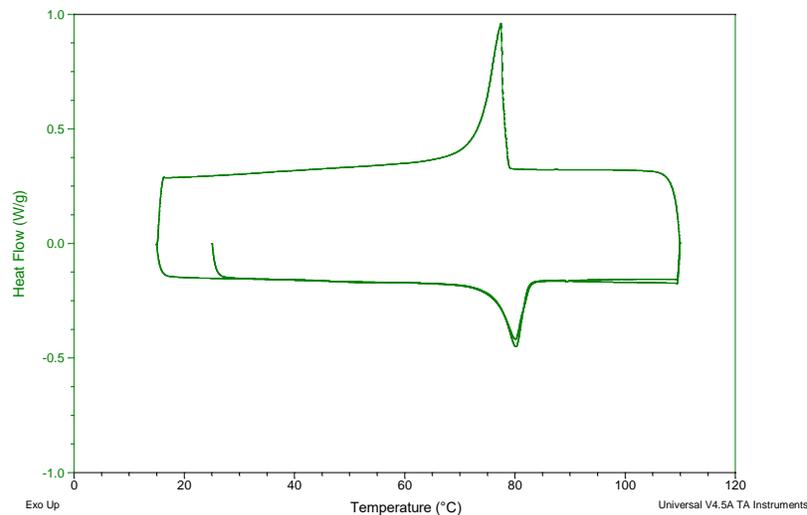


FIGURA 11. Termograma de un organogel analizado en un equipo DSC.

En la Tabla 9 se puede observar que las temperaturas de fusión de todos los organogeles mostraron estar en un intervalo de 72 a 75°C, mientras que la temperatura de cristalización varió en un intervalo de 75 a 77°C, esta pequeña variación pudo ser resultado del cambio de rampa utilizado para el enfriamiento, siendo esta mayor que la utilizada para el calentamiento.

TABLA 9. Intervalos de temperatura de los distintos porcentajes de gelificante en los organogeles.

Tratamiento	Tm (°C)	Tcr (°C)
25%	74.3	76.7
35%	73.6	76.4
45%	72.9	75.7

La entalpia de fusión de cada tratamiento se muestra en la Tabla 10, donde se puede apreciar un aumento lineal conforme la cantidad de gelificante en el sistema aumenta, mostrando que es necesaria una mayor energía para crear un cambio de fase en el organogel mientras mayor es la cantidad de gelificante usado, es decir, los organogeles con más Fosfolipon 90H[®] fueron más estables, ya que tenían una mayor resistencia a los cambios de fase. También se observó una disminución de la entalpia conforme la concentración de curcumina aumentaba, dicho comportamiento se muestra en la Figura 12. Esto podría indicar que mayores concentraciones de curcumina pueden desestabilizar el sistema.

TABLA 10. Entalpias de las distintas formulaciones de organogeles. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

TRATAMIENTOS % Fosfolipon 90H [®] / mg Curcumina	ΔH_m (J/g)	Tukey
45/5	17.3	A
45/15	15.8	AB
45/25	14.4	AB
35/5	13.7	AB
35/15	12.5	ABC
35/25	11.4	ABC
25/5	11.2	ABC
25/15	10.4	BC
25/25	10.4	BC

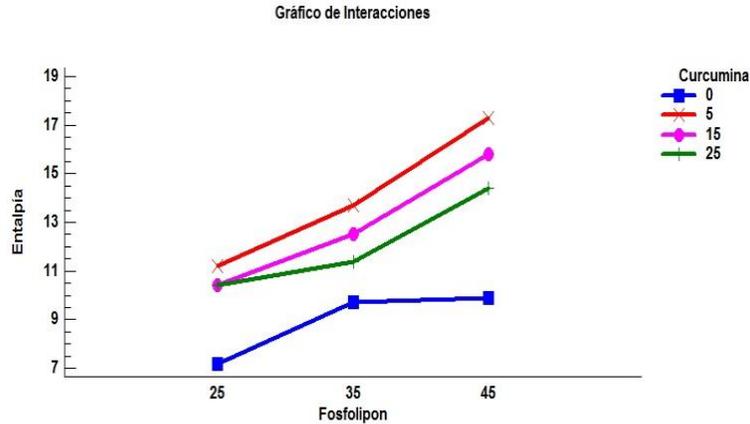


FIGURA 12. Efecto de la concentración de gelificante y de la curcumina sobre la entalpía de los organogeles.

7.1.5 Reología de organogeles

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para el logaritmo de G' expresado en pascuales en función del tiempo de activación y la concentración del Carbopol 940®, se puede observar que G' tuvo valores mayores en altas concentraciones de gelificante. Al comparar las diversas formulaciones, se encontró que al tener 25% de Fosfolipon 90H® tanto con 25 como 15 mg de curcumina se obtuvieron los organogeles más elásticos y significativamente diferentes del resto.

TABLA 11. Logaritmo de módulo de almacenamiento de las distintas concentraciones de gelificante en los organogeles. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

% Fosfolipon 90H® / mg Curcumina	LN de G' (Pa)	TUKEY
25% / 25	13.8	A
25% / 15	12.3	B
25% / 05	11.1	C
35% / 25	11.2	C
35% / 15	11.2	C
35% / 05	9	D

Esto deja en claro que aun a bajas concentraciones de reticulante se puede obtener un sistema deseado; lo cual se observa en la Figura 13 donde G' es más de una magnitud mayor que G'' .

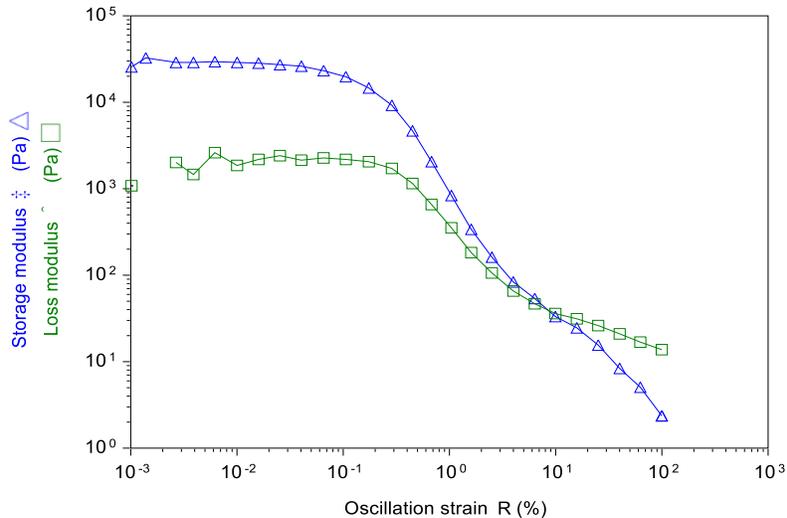


FIGURA 13. Reograma de un organogel donde se puede observar la región viscoelasticalineal.

7.2 Nanogeles

7.2.1 Desarrollo y caracterización de las nanoemulsiones

Se elaboraron nanoemulsiones acarreadoras de curcumina utilizando la metodología de Agame (2017), en la Figura 14 se observa el aspecto final de dichas nanoemulsiones. El análisis de las formulaciones mostró la presencia de partículas nanométricas con un tamaño de partícula que variaba desde 121 hasta 147 nm después de diluirlo en agua destilada, con un promedio de 131.1 ± 7.96 . Este resultado está de acuerdo con los encontrados por Agame (2017) y lo encontrado por Fontana *et al.* (2011) que verificó la presencia de nanopartículas intactas en nanogeles de Carbopol 940[®] mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Valores cercanos a 1 en el índice de polidispersidad de nanoemulsiones indican una baja calidad y una gran inestabilidad (Klang *et al.*,

2011). Los resultados observados en el índice de polidispersidad (PDI) = 0.15 para las nanoemulsiones elaboradas mostraron ser estables, y son cercanos a los reportados por Agame (2017). Se pudo apreciar un comportamiento monomodal de las nanoemulsiones y al realizar réplicas se siguió observando la misma tendencia (Figura 15).



FIGURA 14. Nanoemulsiones de curcumina.

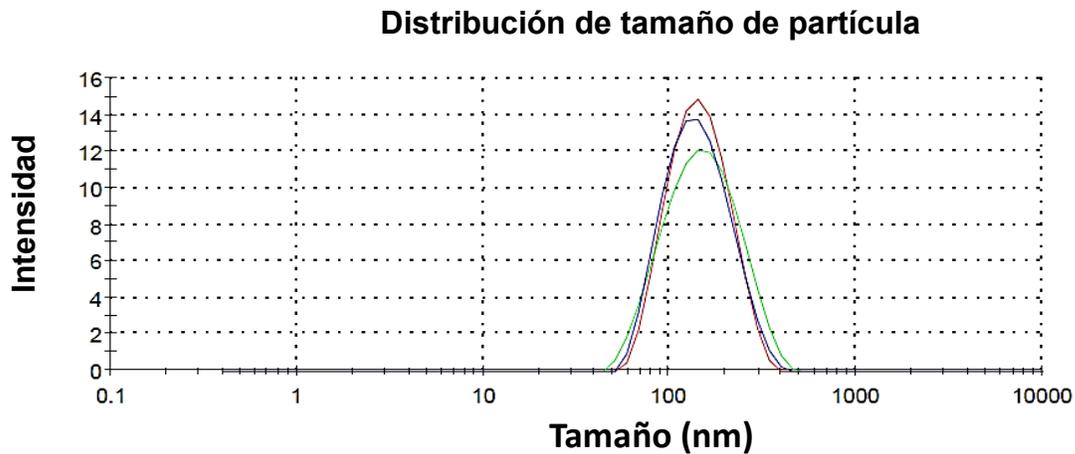
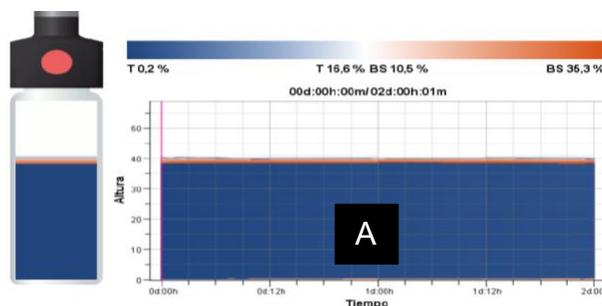


FIGURA 15. Distribución de tamaño de partícula de la nanoemulsion.

7.2.2 Estabilidad de las nanoemulsiones

Se muestran en la Figura 16 (A) los resultados de estabilidad óptica obtenidos durante dos días de almacenamiento usando un equipo Turbiscan Lab[®] Expert a temperaturas de almacenamiento de 15°C. Las nanoemulsiones tuvieron una apariencia translúcida sin ningún problema de estabilidad detectado macroscópicamente durante el tiempo medido (48 horas). Una vez analizadas las

muestras en el equipo se pudo demostrar, además, que fueron estables durante el tiempo evaluado al mostrar siempre una única fase homogénea, sin presencia de sedimentos, ni flóculos, los cuales son visibles cuando el porcentaje de retrotransmisión (franjas naranjas) aumenta. También se observó una línea recta en la parte central de la Figura 16 (B), lo que indica que la parte central de la celda se mantuvo estable durante el tiempo de prueba (Zequan *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otro estudio donde se explica que cuando ocurre un fenómeno de desestabilidad, las gotas migran desde la parte superior a la inferior de la muestra (fenómeno de sedimentación), lo que provoca un aumento de la retrodispersión en el fondo de la muestra (formación de sedimentos) (O Mengual, Meunier, & Cayre, 2000) o migran de la parte inferior a la superior de la muestra lo que induce una disminución progresiva de la concentración en el fondo de la muestra (clarificación) y por lo tanto una caída en la retrodispersión (picos negativos) (Olivier Mengual, Cayre, Puech, & Snabre, 1999), sin embargo, esto no ocurrió en nuestra nanoemulsión. Asimismo en otro estudio, varias formulaciones de vesículas se sometieron al análisis de estabilidad usando el equipo Turbiscan Expert Lab[®]. Al igual que en esta investigación, las señales de transmisión fueron cercanas al valor de la línea base durante todo el tiempo de análisis (3 h) lo que indica buena estabilidad (Celia *et al.*, 2009)



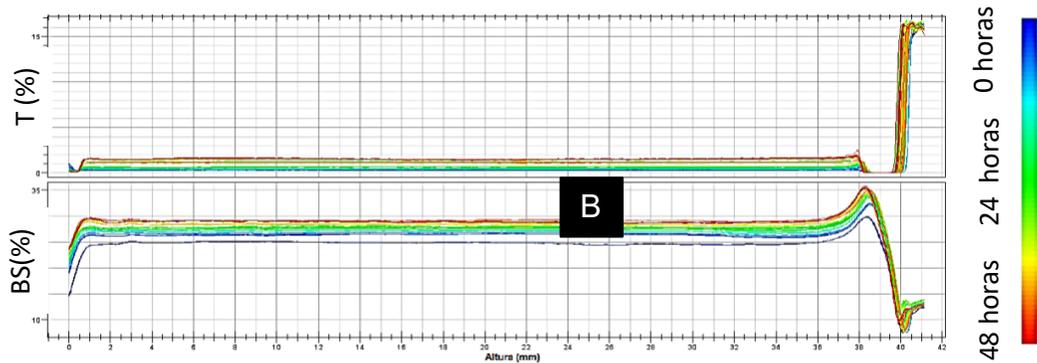


FIGURA 16. Estabilidad de la nanoemulsión durante dos días, a) Estabilidad óptica durante 48 horas a 15°C b) Gráfico de estabilidad óptica de la nanoemulsión durante 48 horas a 15°C.

7.2.3 Concentración crítica gelante

En el caso de los nanogeles se obtuvo una CCG de 0.5% de Carbopol 940[®] lo cual es similar a lo obtenido por De Vargas *et al.* (2012), quienes desarrollaron un nanogel a partir de una nanoemulsión utilizando Carbopol 940[®] como agente reticulante a concentraciones de 0.5% (Figura 17).

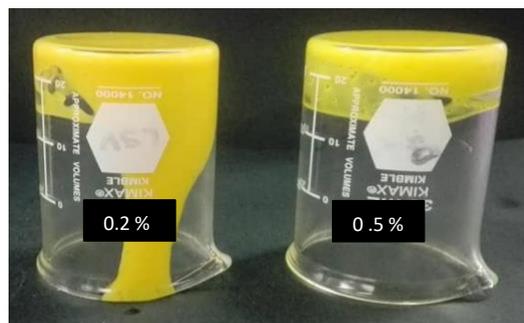


FIGURA 17. Concentración crítica gelante del carbopol en la preparación de nanogeles.

7.3 Desarrollo de nanogeles

Los nanogeles formulados tuvieron una apariencia traslúcida y de color amarillo con aspecto liso, dependiendo de la cantidad de polímero presente en las formulaciones (Figura 18). Los valores de pH se determinaron usando un

potenciómetro calibrado. Todas las formulaciones tuvieron valores de pH en el intervalo de 6.9 a 7.5, cercano a lo reportado por Atul *et al.* (2012), estos valores se consideran aceptables para evitar el riesgo de irritación después de la aplicación sobre la piel. A un pH cercano a 6, un gel que usa Carbopol 940[®] tiene mayor viscosidad y bioadhesividad. Esto se debe a que a este pH se produce la ionización completa de la cadena principal polimérica, lo que produce una repulsión entre las cargas nativas, que a su vez aumenta el hinchamiento del polímero hasta 1000 veces el volumen original y como resultado se forma un gel fuerte; estos resultados son similares a los de Chaudhary *et al.* (2011) quienes desarrollaron un gel transdérmico de curcumina usando Carbopol 940[®] con y sin potenciador de penetración y realizar estudios de permeación *in vitro* a través de la piel. Los autores lograron desarrollar los geles transdérmicos de curcumina utilizando Carbopol 940[®] como polímero de control de liberación, dichos sistemas mostraron resultados prometedores.

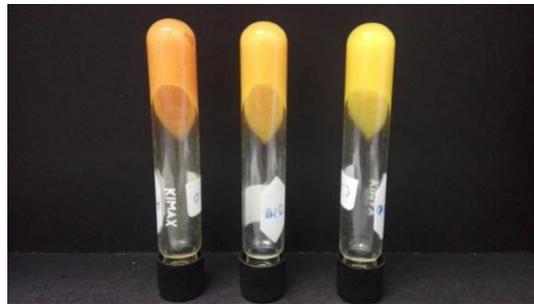


FIGURA 18. Nanogeles desarrollados durante la prueba de tubo invertido.

7.3.1 Caracterización reológica

La elasticidad de los geles aumentó al aumentar la concentración del polímero, como se aprecia en la Tabla 12, el tiempo de activación no se tomó en cuenta para el análisis de Tukey que se presenta en la Tabla 12, esto debido a que en pruebas preliminares no se obtuvieron diferencias significativas. Las formulaciones de nanogel no mostraron diferencias significativas cuando se varió el tiempo que

se dejó activando el sistema, esta información concuerda con Chaudhary *et al.* (2011) quien realizó un gel mezclando diclofenaco con curcumina. En la Figura 19 se observa que el módulo de pérdida (G'') fue menos del 20% del módulo elástico lo que indica una elasticidad completa del sistema. Conforme aumentaba la deformación, la estructura elástica de los nanogeles desarrollados disminuyó abruptamente, dicho comportamiento concuerda con el estudio de Islam *et al.* (2004) quienes realizaron una caracterización reológica de geles que contenían Carbopol 940® como reticulante. Según lo indicado por este autor, esferas más pequeñas conducen a una tensión de ruptura inferior, así mismo se pudo observar, al igual que en los resultados en este trabajo, que antes de que G' cruzara con G'' , el módulo de pérdida mostraba una ondulación característica de sistemas viscoelásticos. Con base a los resultados obtenidos en el desarrollo de los nanogeles y su análisis reológico, se eligió de entre todas las formulaciones, el nanogel con menor concentración de carbopol 940P, esto debido a que la textura obtenida una vez neutralizado el sistema, permitía una mejor aplicación al ser menos elástico, concentraciones mayores de carbopol 940P resultaban en sistemas difíciles de manipular debido a su dureza, asimismo, al no existir diferencias significativas respecto al tiempo, se optó por aplicar el nanogel con el menor tiempo de activación. La concentración de carbopol final usada para el sistema que se aplicó a los modelos murinos estuvo en concordancia con la utilizada en otro estudio donde se desarrollaron hidrogeles acarreadores de palmitato de vitamina A obteniendo sistemas viscosos (Oliveira *et al.*, 2011).

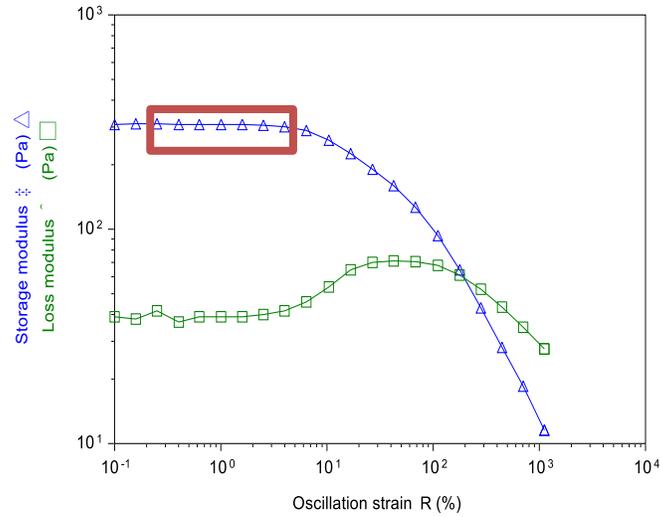


FIGURA 19 Barrido de deformación de los nanogeles, se señala en el cuadro el intervalo viscoelástico lineal.

TABLA 12. Módulo de almacenamiento para las distintas formulaciones de nanogeles. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tratamientos	G' (Pa)	Tukey
1.5%24 h	528.59	A
1.5% 6 h	518.56	A
1.5% 12 h	479.58	B
1% 12 h	477.03	B
1% 6 h	461.15	B C
1% 24 h	445.14	C
0.5% 6 h	339.9	D
0.5% 24 h	279.06	E
0.5% 12 h	257.47	E F
Testigo (1.5%)	255.93	E F
Testigo (1%)	246.9	F
Testigo (0.5%)	246.27	F

7.3.2 Morfología de los nanogeles

Se lograron observar en la imagen obtenida del SEM, nanopartículas dispersas con un tamaño de aproximadamente 90 nm en el nanogel, lo que coincide con los observado por otro estudio que realizó un nanogel a partir de una nanosuspensión de triterpenoides aislados de *Ganoderma lucidum* (GLT) y usando carbopol 940P (Shen *et al.*, 2016). En la Figura 20 se muestran las micrografías obtenidas en el SEM con la morfología de la estructura interna del sistema acarreador a diferentes magnificaciones. Es posible apreciar agregados de partículas, así como gotas redondas. Los tamaños de las partículas encontrados en los conglomerados en forma de racimo, se encuentran en el intervalo de 90-150 nm.

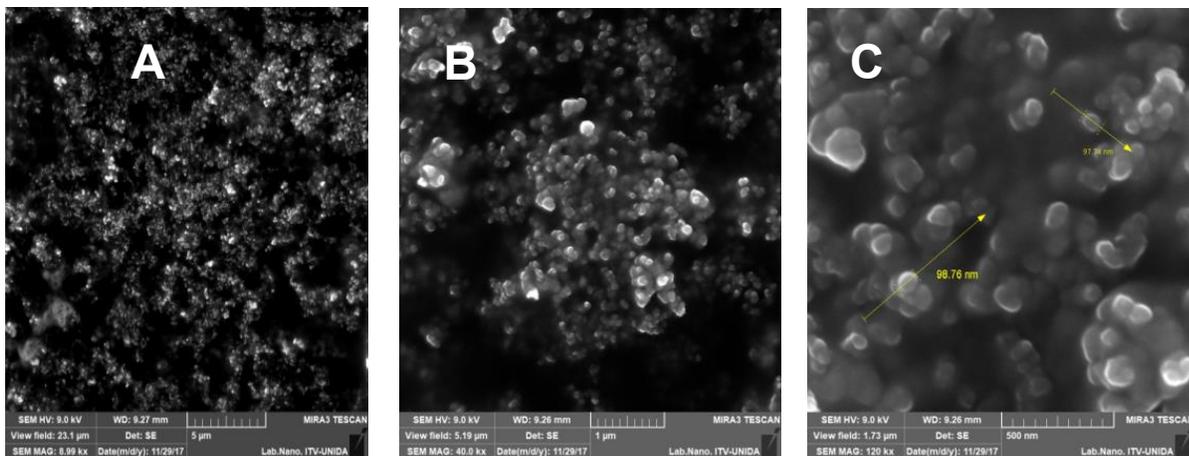


FIGURA 20. Micrografías del nanogel desarrollado obtenidas por microscopía electrónica de barrido a diferentes acercamientos a) 9.0 Kx donde se aprecia una vista general b) 40 Kx agregado de partículas c) partículas en tamaños nanométricos encontradas en el nanogel

7.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

Para evaluar los efectos de los diversos tratamientos (nanogel, organogel, diclofenaco, hidrogel y curcumina libre) se indujo un edema auricular mediante la aplicación múltiple de TPA, para lograr la inflamación en la oreja, como se explica

en la sección correspondiente de la metodología. La respuesta antiinflamatoria se determinó por el grado de hinchazón de las orejas tratadas en comparación con las que no tenían ningún tratamiento (Shah *et al.*, 2012). Los resultados se expresan como peso de la oreja y como porcentaje de inhibición frente al grupo testigo que no recibió ningún tratamiento.

Se llevó a cabo la comparación de las medias del peso de las orejas de los distintos tratamientos. Los ratones sanos y a los que solo se les aplicó Diclofenaco fueron los que tuvieron las medias más bajas, mostrando el menor edema. Por otro lado, los ratones tratados con el nanogel fueron los únicos que no presentaron diferencias significativas con el fármaco de referencia. En el caso del organogel y la curcumina libre, la respuesta de los valores promedios fue en escala intermedia siendo iguales estadísticamente. Sin embargo, los ratones tratados con el hidrogel tuvieron el valor promedio más alto de los tratamientos, llegando a no mostrar diferencias significativas con el ratón tratado con TPA (Figura 21). Al analizar el porcentaje de inhibición de los distintos fármacos, se observó que el nanogel tuvo una mayor actividad antiinflamatoria (61.8%) respecto al organogel (45.9%), la curcumina libre (33.2%) y el hidrogel (28.1%). El diclofenaco logró la mayor inhibición (85.4%); sin embargo, causó la muerte del 30% de los sujetos de estudio. Este efecto en el diclofenaco se puede asociar con hasta el 40% de probabilidad que aumenta de tener problemas cardiovasculares, como se ha reportado en diversos artículos (Mcgettigan & Henry, 2006; Trelle *et al.*, 2010). Así mismo, se ha recomendado usarlo por periodos cortos y en lo posible evitar su uso (McGettigan & Henry, 2013). En la Tabla 13 se pueden observar los pesos y el % de inhibición de los diferentes tratamientos.

TABLA 13. Peso (mg) y letras del análisis de Tukey de las orejas a las que se les aplicó los diferentes tratamientos. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Grupo	Peso (mg)	Tukey
Sano	9.9 ± 0.7	A
Diclofenaco	11.2 ± 0.8	AB
Nanogel	13.3 ± 0.6	BC
Organogel	14.7 ± 0.8	CD
Curcumina libre	15.3 ± 0.6	D
Hidrogel	16.3 ± 0.8	DE
Edema	18.9 ± 0.6	E

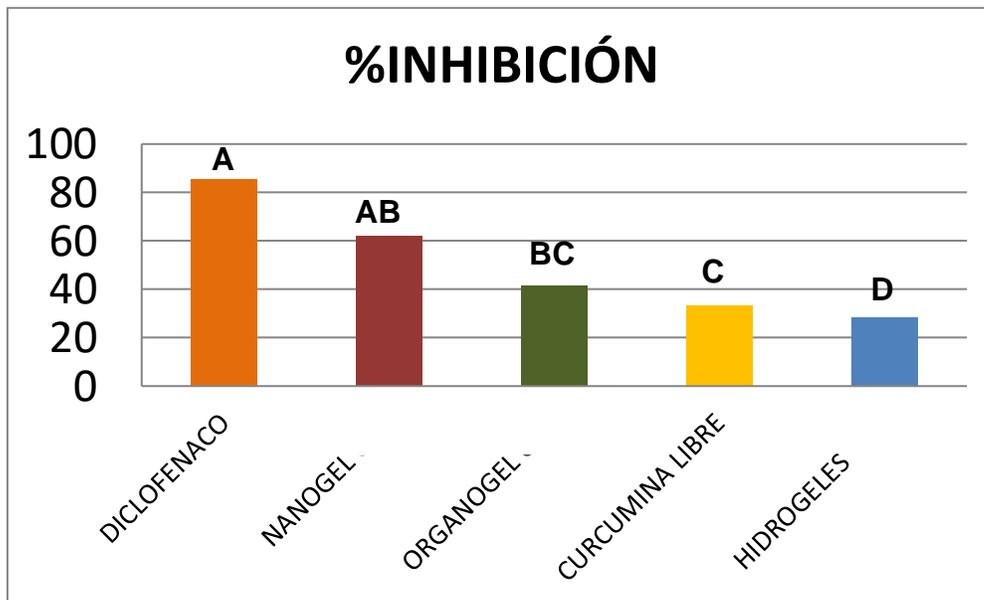


FIGURA 21. Porcentaje de inhibición de edema auricular de los distintos tratamientos aplicados sobre el edema auricular en un modelo murino.

Los resultados obtenidos son comparables con un estudio realizado por Sun, Zhao *et al.* (2015) quienes investigaron el efecto de un gel transdérmico de curcumina en un modelo de edema auricular inducida por TPA en ratones transgénicos K14-VEGF. El aumento del grosor del hueso se usó para indicar la extensión de la

inflamación. Al igual que en nuestro estudio, a los días 2-4 después del inicio del tratamiento con TPA, la piel de la oreja de los ratones comenzó a mostrar signos de engrosamiento y eritema con una gravedad continuamente incrementada que alcanzó su punto máximo los días 6-10.

Los resultados de la tinción de H & E de la piel de las orejas tratadas con TPA mostraron aumento de tejido subcutáneo y espesor epidérmico leve en comparación con el grupo control. Este incremento en el grosor se debió al aumento de las células inflamatorias en el tejido subcutáneo. Los resultados obtenidos son similares a nuestra investigación, donde la curcumina inhibe el aumento del grosor y la inflamación en la piel de la oreja de ratón tratada con TPA. En otro estudio (Sun *et al.*, 2010) se evaluó la actividad antiinflamatoria de la curcumina exómic *in vitro* usando un modelo de choque séptico inducido por LPS. Los exosomas (nanopartículas de 30-100 nm secretadas por células en el entorno extracelular) formaron un complejo con la curcumina.

Los datos obtenidos por Sun *et al* mostraron que la curcumina exosomal potencia la apoptosis de las células CD11b + Gr-1 + y regula la actividad de varios factores de transcripción cruciales en la inflamación, incluidos NF- κ B, STAT3 y Nrf2, por lo tanto sus efectos biológicos sobre la proliferación celular, la apoptosis, la inducción de citoquinas y un efecto antioxidante también pueden contribuir a la prevención del choque séptico inducido por LPS (Sun *et al.*, 2010).

7.4.1 Análisis histopatológico

Para corroborar los datos antes mencionados se realizaron cortes histológicos de las porciones de las orejas mediante la metodología propuesta y se analizaron utilizando un microscopio óptico marca Olympus BX51. Se observaron infiltrados inflamatorios en los grupos nanogel, organogel, curcumina libre, hidrogel y el grupo con edema, el testigo sano y el grupo que se trató con diclofenaco no presentaron alteraciones histológicas significativas.

7.4.1.1 Testigo enfermo

Este grupo mostró una inflamación crónica y aguda moderada ulcerada, es decir, pérdida de la continuidad del epitelio por efecto químico, y este fue el único grupo que mostró un denso infiltrado inflamatorio en el espesor de la dermis (Figura 22). Observando la estructura celular en la microfotografía es posible notar un desarreglo en la estructura celular con presencia de células multinucleadas. El edema que produce una inflamación crónica puede llevar a otras enfermedades (Meng *et al.*, 2015). La inflamación inducida por TPA en el oído del ratón induce la inflamación cutánea en el oído para aplicaciones tópicas, que induce la hiperproliferación celular que se observa en enfermedades de la piel, como la psoriasis y la dermatitis atópica (Ana del Carmen Susunaga-Notario, Salud Pérez-Gutiérrez, Miguel Ángel Zavala-Sánchez, Julio Cesar Almanza-Pérez, Atilano Gutiérrez-Carrillo, Daniel Arrieta-Báez, Ana Laura López-López, Rubén Román-Ramos, 2014).

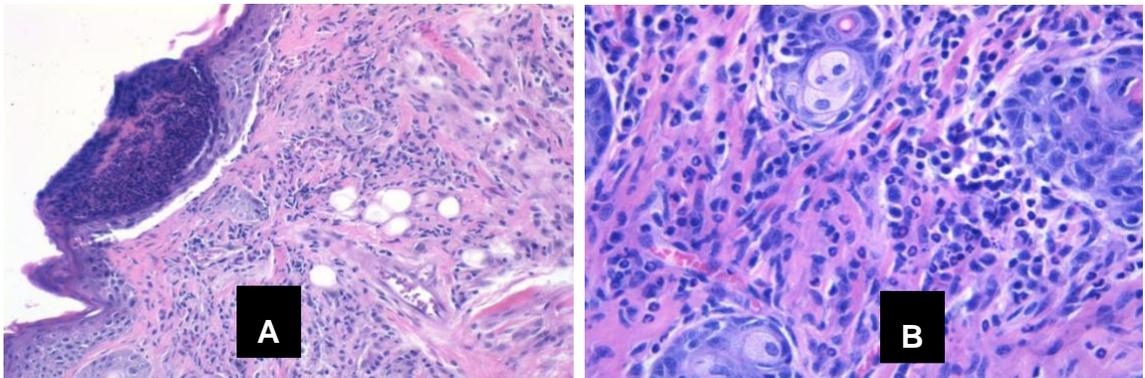


FIGURA 22. Análisis histológico de oreja de ratón del testigo enfermo teñido con H&E en 10x y 40x, visto en microscopio Olympus BX51 al final del modelo de inflamación auricular inducido por aplicación múltiple de TPA durante dos semanas. A) Tejido con denso infiltrado inflamatorio B) Detalle de infiltrado inflamatorio.

7.4.1.2 Testigo sano

Se observan las distintas capas de la piel, epidermis, dermis y tejido subcutáneo sin presentar ninguna alteración histológica significativa (Figura 23). La epidermis de la oreja está constituida por cartílago, el cual aparece en el oído externo, en el conducto auditivo externo, trompa de Eustaquio, epiglotis y en la laringe. Posee poca matriz extracelular, la cual está formada, principalmente, por fibras elásticas muy ramificadas, que contribuyen a las propiedades mecánicas de este tejido. El cartílago elástico no se forma a partir de centros de condricación, sino a partir de tejido mesenquimático. En su periferia se localiza el pericondrio formando una vaina muy delgada de tejido y que es tejido conectivo altamente condensado. También se puede apreciar los anexos y el tejido adiposo sin daño significativo.

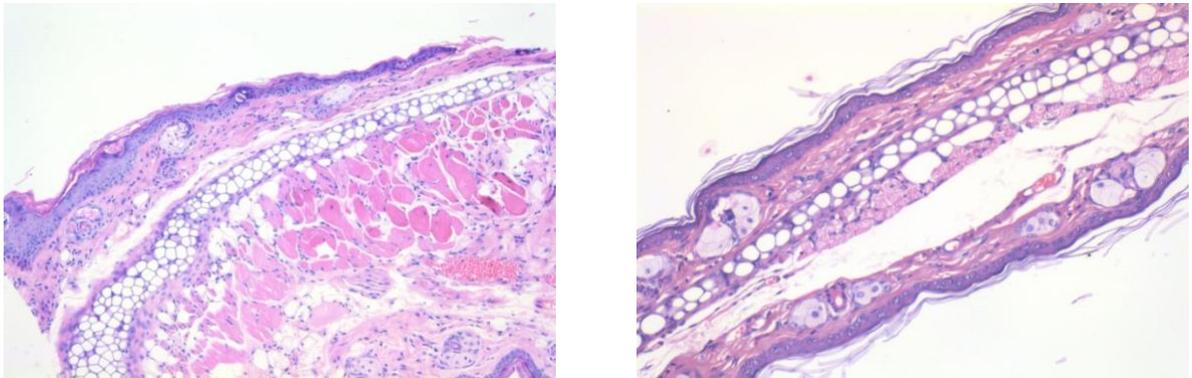


FIGURA 23. Análisis histológico de oreja de ratón del testigo sano teñido con H&E en 10x y 20x, visto en microscopio Olympus BX51 donde se observan las diferentes capas de la piel sin alteraciones histológicas.

7.4.1.3 Gel comercial (diclofenaco)

Durante la segunda semana en la que se llevó a cabo el modelo de edema auricular inducido por TPA, se comenzó a administrar un gel comercial (diclofenaco) dos veces por día en días alternos hasta el día 10 en que se llevó a cabo el sacrificio de los ratones, las porciones de oreja obtenidas de este

tratamiento mostraron una similitud con el grupo testigo sano (Figura 24). Pese a que se observaron mejores resultados que en los demás tratamientos, el 30% de este grupo de estudio falleció antes de concluida la prueba, lo que se podría deber a los efectos adversos del diclofenaco altamente mencionados en la literatura. En un trabajo de meta análisis se concluyó que el diclofenaco aumentó el riesgo de eventos cardiovasculares cuando fue comparado con un placebo. En vista de los daños bien establecidos y la duración del tratamiento, se recomendó el uso intermitente, a corto plazo y menor de 75 mg/día. El diclofenaco se asoció con un aumento estadísticamente significativo del 22% en el riesgo a dosis bajas. La mayoría de los estudios utilizaron 100 mg/d como el punto de corte para el análisis, por encima del cual el fármaco duplicó el riesgo de eventos cardiovasculares (Mcgettigan & Henry, 2011)

En otro estudio, se mostró que el diclofenaco es uno de los tratamientos más recomendados y utilizados para la inflamación en alrededor de 74 países, sin embargo, ha quedado claro que debido a sus efectos adversos y dada la disponibilidad de alternativas más seguras, se debería retirar del mercado a nivel mundial. (Mcgettigan & Henry, 2013)

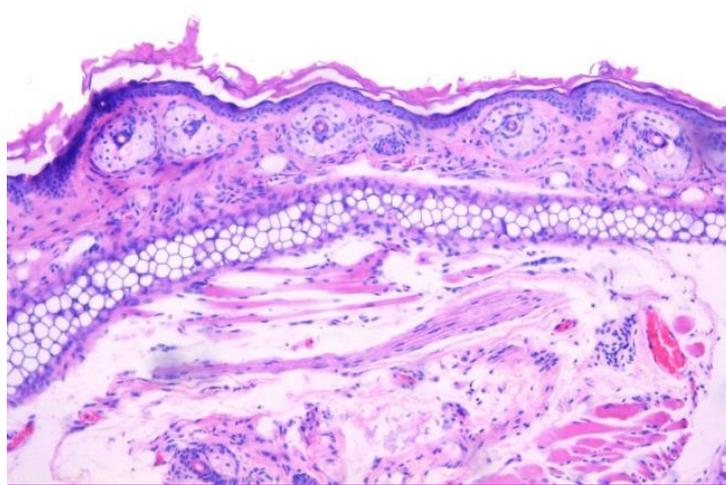


FIGURA 24. Análisis histológico de oreja de ratón del testigo tratado con diclofenaco teñido con H&E en 10x, observado en un microscopio Olympus BX51, donde se observan las diferentes capas de la piel sin alteraciones histológicas.

7.4.1.4 Nanogeles

Este fue el mejor de los tratamientos al solo ser visible una inflamación aguda incipiente en la dermis (Figura 25), dicho resultado puede ser debido a que el nanogel es una opción viable para aumentar la liberación de la curcumina, estos datos son similares a los de Al-Rohaimi, (2015) quien evaluó los efectos antiinflamatorios de la curcumina en un nanogel, comparándolo con un gel comercial de diclofenaco en un edema plantar inducido por carragenina en ratas. Después de la aplicación, el porcentaje de inhibición del nanogel no presentó diferencia significativa con el gel comercial (78.54% y 81.13%, respectivamente). En dicho estudio también quedó comprobado que la curcumina tiene problemas de permeabilidad si sus partículas poseen un tamaño molecular mayor, por lo que el nanogel aumenta la permeabilidad y eficacia del compuesto bioactivo. Así mismo, en nuestro estudio se pudo apreciar que la bioactividad antiinflamatoria del nanogel acarreador de curcumina es significativamente diferente del testigo enfermo y fue el único tratamiento que no presento diferencias con el diclofenaco. En las microfotografías se pueden apreciar las capas de la piel, epidermis, dermis y tejido subcutáneo con sus folículos y glándulas sebáceas sin presentar alteraciones graves. El diagnóstico que tuvo este grupo fue una inflamación crónica leve (Figura 25). Aunque el porcentaje de inhibición fue del 61%, está por debajo de lo obtenido en el trabajo de Wang *et al.* (2008), en el que se administró curcumina a través de una nanoemulsión y se probó su efecto en un edema auricular inducido mediante TPA, obteniendo como resultado una disminución del 85% en el peso de la oreja.

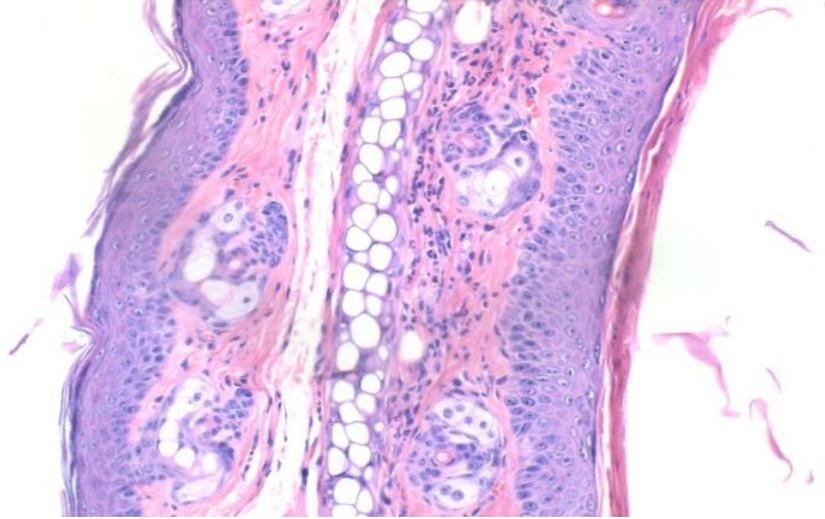


FIGURA 25. Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con nanogeles teñido con H&E en 10x, observado en un microscopio Olympus BX51.

7.4.1.5 Organogeles

Los organogeles lograron una ligera desinflamación pues al analizar el corte histológico aún se podía apreciar una inflamación crónica y aguda severa, con un incremento en la celularidad en el estroma secundada a la presencia de infiltrado inflamatorio y focos, donde incrementa el infiltrado inflamatorio sub-epitelial (Figura 26). El 45% de inhibición de edema auricular obtenido en este estudio contrasta con los resultados obtenidos por Esposito *et al.* (2014), quienes compararon el efecto preventivo de aplicar un organogel de curcumina y una dispersión acuosa de monooleina en la piel para posteriormente aplicar radiación UV y medir el grado de eritema, los resultados mostraron que el organogel inhibió el 50% del daño en la piel en la comparación con la dispersión acuosa de monooleina (10%).

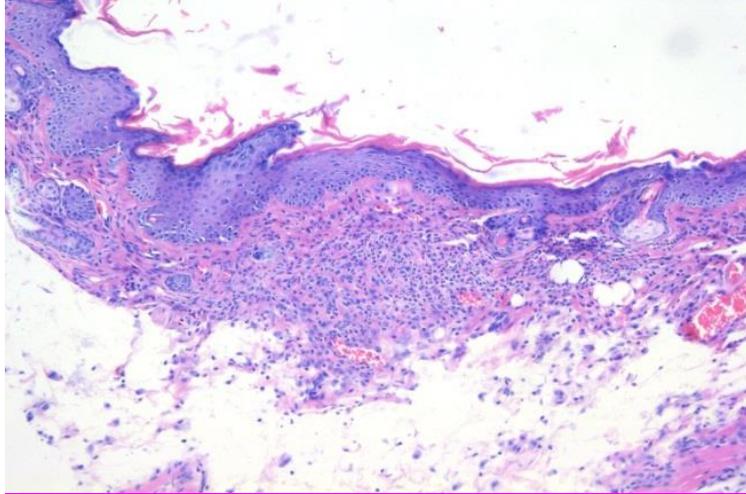


FIGURA 26 Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con organogeles teñido con H&E en 10x, observado en un microscopio Olympus BX51.

7.4.1.6 Tratamiento con curcumina libre

Al igual que en el estudio realizado por Huang *et al.* (1992), donde se aplicaron 1 μ L de curcumina antes de una sola aplicación de TPA e inhibió la inducción del edema en 99%, o el llevado a cabo por Yadav *et al.* (2014), donde la aplicación tópica de curcumina inhibió significativamente la inflamación inducida por TPA, y dio lugar a reducciones en el enrojecimiento del oído, la orejas tratadas con la curcumina libre tuvieron una reducción en el edema auricular, la cual mostró diferencias significativas con el grupo con edema. Sin embargo, se observó una inflamación crónica y aguda, así como microabcesos como se distingue en la Figura 27.

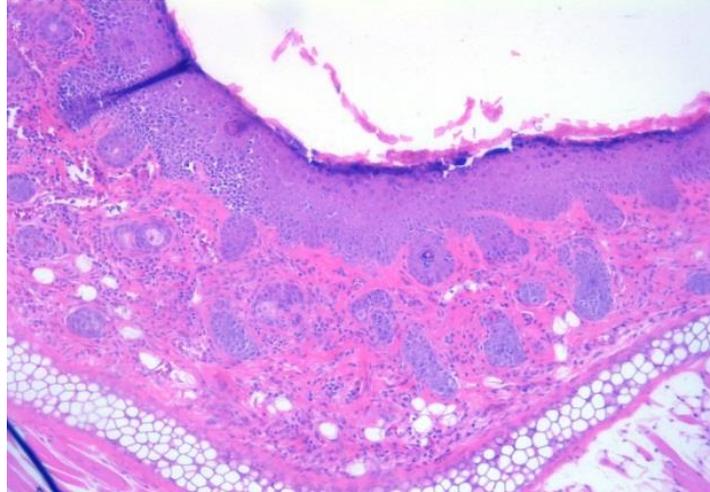


FIGURA 27 Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con curcumina libre teñido con H&E en 10x, observado en un microscopio Olympus BX51.

7.1.4.7 Tratamiento con hidrogeles

Estas muestras presentaron una inflamación crónica y aguda severa, se distinguen abscesos en epidermis y capa cornea (Figura 28) se identifica un infiltrado inflamatorio predominante agudo en el espesor de la dermis, el cual se extendió hasta la capa muscular. Este grupo no mostró diferencias significativas con el grupo tratado únicamente con TPA, debido a que el sistema mostró una alta viscosidad y no logró permanecer en el sitio dañado y lograr un efecto notable. Este resultado es menor al obtenido por Al-rohaimi (2015), quien usó un hidrogel en un edema plantar inducido por carragenina y logró una inhibición de la inflamación del 40%; sin embargo, este trabajo fue preventivo y nuestro modelo de aplicación múltiple de TPA buscaba uno curativo.

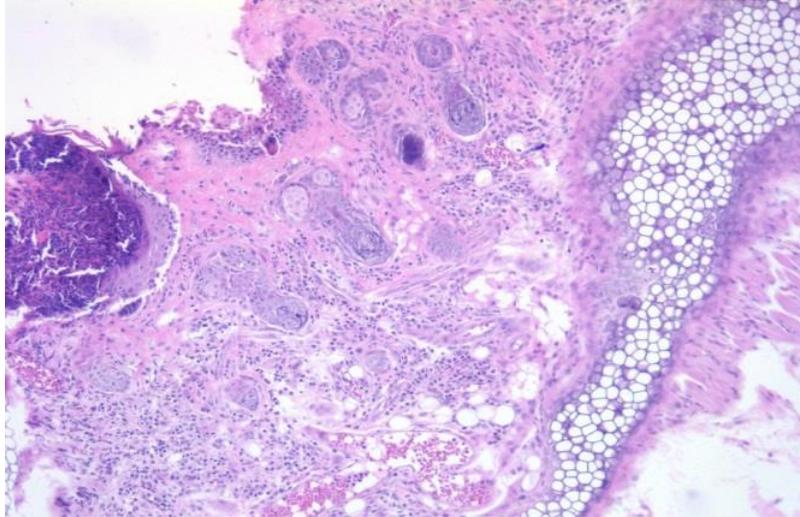


FIGURA 28 Análisis histológico de oreja de ratón del grupo tratado con hidrogeles teñido con H&E en 10x, observado en un microscopio Olympus BX51.

8. CONCLUSIONES

Fue posible obtener un organogel y un nanogel como vehículos acarreadores de curcumina para aplicación tópica.

Los termogramas mostraron que la entalpia tuvo un crecimiento lineal respecto a la concentración del gelificante usado en los organogeles acarreadores de curcumina.

Mediante los barridos de deformación se confirmó un comportamiento tanto viscoso como elástico en ambos sistemas.

El nanogel tuvo una mayor actividad antiinflamatoria (61.8%) respecto al organogel (45.9%), la curcumina libre (33.2%) y el hidrogel (28.1%). El diclofenaco logró la mayor inhibición (85.4%); sin embargo, causó la muerte del 30% de los sujetos de estudio.

9. BIBLIOGRAFIA

- Aboofazeli, R., Zia, H., & Needham, T. E. (2002). Transdermal delivery of nicardipine: an approach to in vitro permeation enhancement. *Drug Delivery*, 9(4), 239–247.
- Aggarwal, B., Sundaram, C., Malani, N., & Ichikawa, H. (2007). Curcumin: The Indian solid gold. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595, (1) 75.
- Al-rohaimi, A. (2015). Comparative Anti-inflammatory Potential of Crystalline and Amorphous Nano Curcumin in Topical Drug Delivery. *Journal of Oleo Science*, 40(1), 27–40.
- Alfonso, L., Santos, J., Calero, N., Carmen, M., & Muñoz, J. (2013). Caracterización reológica de una suspoemulsión comercial para uso agroquímico. *AfinidAd 70*, (561), 54–59.
- Altunbas, A., Lee, S. J., Rajasekaran, S., Schneider, J., & Pochan, D. (2011). Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable drug delivery vehicles. *Biomaterials*, 32(25), 5906–5914.
- Alvarez-Mitre, F., Morales-Rueda, J., Dibildox-Alvarado, E., Charó-Alonso, M. & Toro-Vazquez, J. (2012). Shearing as a variable to engineer the rheology of candelilla wax organogels. *Food Research International*, 49(1), 580–587.
- Alves, P., Pohlmann, A. & Guterres, S. (2005). Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie*, 60 (12): 900-904.
- Balasubramanian, R., Sughir, A., & Damodar, G. (2012). Oleogel: A promising base for transdermal formulations. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 6(3), 1-9.
- Bhatia, A., Singh, B., Raza, K., Wadhwa, S., & Katare, O. (2013). Tamoxifen-loaded lecithin organogel (LO) for topical application: Development, optimization and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 444(1–2), 47–59.
- Borkar, C., John, S., & College, F. (2015). Preparation and Evaluation of Phospholipid- Based Complex of Standardized Centella Extract (SCE) for the

- Enhanced Delivery of Phytoconstituents *The AAPS Journal*, 18 (1), 102-114.
- Buwalda, S., Vermonden, T., & Hennink, W. (2017). Hydrogels for Therapeutic Delivery: Current Developments and Future Directions. *Biomacromolecules*, 18 (2), 316–330.
- Celia, C., Trapasso, E., Cosco, D., Paolino, D., & Fresta, M. (2009). Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72, 155–160.
- Chaudhary, H., Kohli, K., Amin, S., Rathee, P., & Kumar, V. (2011). Optimization and Formulation Design of Gels of Diclofenac and Curcumin for Transdermal Drug Delivery by Box-Behnken, *100(2)*, 580–593.
- Chavez Zamudio, R. (2015). Biodisponibilidad de Ácido Betulinico y Curcumina en nanoemulsiones estabilizadas con lisofosfatidilcolina en un modelo murino. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- Chen, S., Li, Y., Chen, S., Tan, J., Ou, T., & Huang, Z (2011). Design, synthesis, and biological evaluation of curcumin analogues as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(18), 5596–5604.
- De Vargas, B., Bidone, J., Oliveira, L., Koester, L. S., Bassani, V. L., & Teixeira, H. F. (2012). Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 8(2), 330–336.
- Debnath, S., Vanitha, G., Bindu, H. & Babu, N. (2014). Applications of organogels in drug delivery. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 5674(2), 976–981.
- Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E. & Diederich, M. (2005). Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Letters*, 223(2), 181–190.
- Epstein, J., Sanderson, I. R., & MacDonald, T (2010). Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *British Journal of Nutrition*, 103(11), 1545–1557.

- Esposito, E., Ravani, L., Mariani, P., Huang, N., Boldrini, P., Drechsler, M. & Puglia, C. (2014). Effect of nanostructured lipid vehicles on percutaneous absorption of curcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(2), 121–32.
- Fontana, M., Rezer, J., Coradini, K., Leal, D. & Beck, R. (2011). Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79(2), 241–9.
- Gersey, Z., Rodriguez, G., Barbarite, E., Sanchez, A., Walters, W., Ohaeto, K & Graham, R. M. (2017). Curcumin decreases malignant characteristics of glioblastoma stem cells via induction of reactive oxygen species. *BMC Cancer*, (17) 1–11.
- Gupta, V., Nagpal, M., Khan, I., Aggarwal, G., & Kaur, R. (2014). a Review on Non-Ionic Surfactant Based Organogel for Transdermal Delivery. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(9), 150–163.
- Hoare, T., & Kohane, D. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993–2007.
- Huang, M., Robertson, F. M., Lysz, T., Ferraro, T., Wang, Z. Y., Georgiadis, C. & Conney, A. (1992). Inhibitory Effects of Curcumin on in vitro lox y cox activities in mouse epidermis. *Cancer Research*, 507, 338–349.
- Hussain, Z., Thu, H. E., Ng, S., Khan, S., & Katas, H. (2017). Nanoencapsulation , an efficient and promising approach to maximize wound healing efficacy of curcumin : A review of new trends and. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 223–241.
- Islam, M., Ciotti, S., & Ackermann, C. (2004). Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH. *Pharmaceutical Research*, 21(7), 1192–1199.
- Joe, B., Vijaykumar, M., & Lokesh, B. (2004). Biological Properties of Curcumin- Cellular and Molecular Mechanisms of Action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(June 2013), 97–111.
- Kaur, D., & Singh, R. (2015). A Novel Approach : Transdermal Gel, 4(10), 41–50.

- Klang, V., & Valenta, C. (2011). Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), 55–76.
- Klang, V., Valenta, C., & Matsko, N. (2013). *Electron microscopy of pharmaceutical systems*. *Micron* (44):45-74.
- Kumar, R., & Katare, O. (2005). Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review. *AAPS PharmSciTech*, 6(2), 298–310.
- Kumar, S., Talegaonkar, S., Negi, L., & Khan, Z. (2012). Design and Development of Ciclopirox Topical Nanoemulsion Gel for the Treatment of Subungual Onychomycosis. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 46(4), 303–311.
- Lelli, D., Pedone, C., & Sahebkar, A. (2017). Curcumin and treatment of melanoma: The potential role of microRNAs. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 88, 832–834.
- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2014). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81–98.
- Lohan, S., Icken, N., Teutloff, C., Saeidpour, S., Bittl, R., Lademann, J., Meinke, M. (2016). Investigation of cutaneous penetration properties of stearic acid loaded to dendritic core-multi-shell (CMS) nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*. 501(1-2) :271-277
- Mcgettigan, P., & Henry, D. (2006). Cardiovascular Risk and Inhibition of Cyclooxygenase. *JAMA*, 296, 1–12.
- Mcgettigan, P., & Henry, D. (2013). Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High-Income Countries. *PLoS Medicine*, 10 e1001388.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435.
- Meng, H., Liu, Y., & Lai, L. (2015). Diverse ways of perturbing the human arachidonic acid metabolic network to control inflammation. *Accounts of*

- Chemical Research*, 48(8), 2242–50.
- Mengual, O., Cayre, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the Turbiscan MA 1000, 152, 111–123.
- Mengual, O., Meunier, G., & Cayre, I. (2000). Turbiscan MA 2000 : multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis, 50(1999), 445–456.
- Modi, J. D., & Patel, J. K. (2011). Nanoemulsion-Based Gel Formulation of Aceclofenac for Topical Delivery. *International Journal*, 1(1), 6–12.
- Mohamadi, A., Sahebkar, A. H., Iranshahi, M., Akhlaghi, S., & Ghayour Mobarhan, M. (2011). Curcumin effects on blood lipid profile in obese individuals. *Clinical Biochemistry*, 44(13), S239.
- Mou, D., Chen, H., Du, D., Mao, C., Wan, J., Xu, H., & Yang, X. (2008). Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 353(1–2), 270–276.
- Murashova, N., & Yurtov, E. (2015). Lecithin organogels as prospective functional nanomaterial. *Nanotechnologies in Russia*, 10(7–8), 511–522.
- Naksuriya, O., Okonogi, S., Schiffelers, R., & Hennink, W. (2014). Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*, 35(10), 3365–3383.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846–852.
- Nazari-Vanani, R., Moezi, L., & Heli, H. (2017). In vivo evaluation of a self-nanoemulsifying drug delivery system for curcumin. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 88, 715–720.
- Ochoa, A., Hernandez, J., Cavazos, A., Garcia, H. & Vernon, E. (2013). Phosphatidylcholine enrichment with medium chain fatty acids by immobilized phospholipase A(1) -catalyzed acidolysis. *Biotechnology Progress*, 29(1), 230–236.
- OClemente M. (2013). *Synthesis, characterization and study of supramolecular gel materials based on glycoamphiphiles*. Tesis de Doctorado de la

Universidad de Zaragoza.

- Oliveira, J., Aguiar, T., Mezadri, H., & Henrique dos Santos, O. (2011). Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 13014–13018.
- Oteo, M. (2013). *Synthesis, characterization and study of supramolecular gel materials based on glycoamphiphiles*. Tesis de Doctorado en Química Orgánica, Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza.
- Peng, J., Qi, T., Liao, J., Fan, M., Luo, F., & Qian, Z. (2012). Nanoscale Synthesis and characterization of novel dual-responsive nanogels and their. *The Royal Society of Chemistry 2012*, 4, 2694–2704.
- Phatak, & Praveen, D. (2012). Development and Evaluation of Nanogel as a Carrier for Transdermal Delivery of Aceclofenac. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*, 2(4), 125–132.
- Raemdonck, K., Demeester, J., & Smedt, S. (2009). Advanced nanogel engineering for drug delivery. *The Royal Society of Chemistry*, 5, 707–715.
- Ramirez, A., & Astudillo, L. (2016). Materiales polimeros de tipo hidrogeles : revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb, met *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 36(2), 108-130.
- Rapaport, M., Nierenberg, A, Schettler, P., Kinkead, B., Cardoos, A, Walker, R., & Mischoulon, D. (2015). Inflammation as a predictive biomarker for response to omega-3 fatty acids in major depressive disorder: a proof-of-concept study. *Molecular Psychiatry*, (1), 1–9.
- Raut, S., Bhadoriya, S., Uplanchiwar, V., Mishra, V., Gahane, A., & Jain, S. (2012). Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(1), 8–15.
- Reddy, J., Vijeeta, T., Karuna, M., Rao, B. & Prasad, R. (2005). Lipase-catalyzed preparation of palmitic and stearic acid-rich phosphatidylcholine. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(10), 727–730.
- Restrepo M. (2016). Evaluación técnica de microencapsulación de compuestos bioactivos empleando los métodos de coacervación y gelificación. *Tesis de*

Maestría En Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia

- Reyes, A. (2008). Geles moleculares y organogelantes. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 11(2), 101–104.
- Rikita, A., Gaeta, A., & Kirandeep. K., (2014). Nanoemulsion based hydrogel for enhanced transdermal delivery of ketoprofen. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 1–12.
- Sabitha, M., Rejinold, N., Nair, A., Lakshmanan, V., Nair, S. & Jayakumar, R. (2013). Development and evaluation of 5-fluorouracil loaded chitin nanogels for treatment of skin cancer. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 48–57.
- Sagiri, S., Behera, B., Rafanan, R., Bhattacharya, C., Pal, K., Banerjee, I., & Rousseau, D. (2014). Organogels as Matrices for Controlled Drug Delivery: A Review on the Current State. *Soft Materials*, 12(1), 47–72.
- Sagiri, S., Behera, B., Sudheep, T., & Pal, K. (2012). Effect of Composition on the Properties of Tween-80–Span-80-Based Organogels. *Designed Monomers & Polymers*, 15(3), 253–273.
- Samuditha, D. (2009). Physical Properties of Rice Bran Wax in Bulk and Organogels. *J Am Oil Chem Soc* (2009), 86, 1163–1173.
- Septiembre, J., Sánchez, B., Franco, J., Delgado, M., Valencia, C., & Gallegos, C. (2011). Rheology of oleogels based on sorbitan and glyceryl monostearates and vegetable oils for lubricating applications. *Grasas y Aceites*, 62(3).
- Serri, C., Argirò, M., Piras, L., Gustavo, D., Saija, A., Mita, L., Mayol, L. (2017). Nano-precipitated curcumin loaded particles : effect of carrier size and drug complexation with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin on their biological performances. *International Journal of Pharmaceutics*, 520(1–2), 21–28.
- Shah, P., Desai, P. Patel, A., & Singh, M. (2012). Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. *Biomaterials*, 33(5), 1607–1617.
- Shanmugam, M., Rane, G., Kanchi, M., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M., Sethi, G. (2015). *The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment*. *Molecules* (Vol. 20).
- Shchipunov, Y. (2001). Lecithin organogel A micellar system with unique

- properties. *Colloids and Surfaces*, 185, 541–554.
- Shen, C., Xu, P., Shen, B., Min, H., Li, X., Shen, C., Yuan, H. (2016). Nanogel for dermal application of the triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum* (GLT) for frostbite treatment. *Drug Delivery*, 7544(11) 23, 610-618.
- Shi, R., Zhang, Q., Vriesekoop, F., Yuan, Q., & Liang, H. (2014). Preparation of Organogel with Tea Polyphenols Complex for Enhancing the Antioxidation Properties of Edible Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:8379–8384.
- Singh, V., Pandey, P., Agarwal, T., Kumar, D., Banerjee, I., Anis, A., & Pal, K. (2015). Development of soy lecithin based novel self-assembled emulsion hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 55, 250–263.
- Siti, H., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, 71, 40–56.
- Skilling, K., Citossi, F., Bradshaw, T., Ashford, M., Kellam, B., & Marlow, M. (2014). Insights into low molecular mass organic gelators: a focus on drug delivery and tissue engineering applications. *Soft Matter*, 10(2), 237–56.
- Sordillo, P., Helson, L., & Pharma, S. (2015). Curcumin and Cancer Stem Cells : Curcumin Has Asymmetrical Effects on Cancer and Normal Stem Cells. *Anticancer Research*, 614, 599–614.
- Soudamini, K., Unnikrishnan, M., Soni, K., & Kuttan, R. (1992). Inhibition of lipid peroxidation and cholesterol levels in mice by curcumin. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 36(4), 239–243.
- Sreedevi.T. (2012). An Emerging Era in Topical Delivery: Organogels. *International Journal of Drug Development & Research*, 4(2), 315–321.
- Sullivan, C., Barbut, S., & Marangoni, A. (2016). Edible oleogels for the oral delivery of lipid soluble molecules: composition and structural design considerations *Trends in Food Science & Technology*. 2016, 57A, 59–73
- Sun, D., Zhuang, X., Xiang, X., Liu, Y., Zhang, S., Liu, C., Zhang, H. (2010). A Novel Nanoparticle Drug Delivery System : The Anti-inflammatory Activity of

- Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes. *Molecular Therapy*, 18(9), 1606–1614.
- Sun, J., Zhao, Y., Jin, H., & Hu, J. (2015). Curcumin relieves TPA-induced Th1 in inflammation in K14-VEGF transgenic mice. *International Immunopharmacology*, 25(2), 235–241.
- Sung, M., Xiao, H., Decker, E., & McClements, D. (2015). Fabrication, characterization and properties of filled hydrogel particles formed by the emulsion-template method. *Journal of Food Engineering*, 155, 16–21.
- Susunaga-Notario A. C., Pérez-Gutiérrez S., Zavala-Sánchez M. Á., et al. Bioassay-guided chemical study of the anti-inflammatory effect of *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae) in TPA-induced ear edema. *Molecules*. 2014;19(7):10261–10278
- Tiwari, B., Pahuja, R., Kumar, P., & Rath, K. (2017). Nanotized Curcumin and Miltefosine , a Potential Combination for Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3), 1–13.
- Trelle, S., Reichenbach, S., Wandel, S., Hildebrand, P., Tschannen, B. & Villiger, P.(2010). Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ*, 201;(342), 1–11.
- Tuttle, S., Hertan, L., & Katz, J. S. (2014). Indian gold treating cancer in the age of nano. *Cancer Biology & Therapy*, 11(5), 474–476.
- Vintiloiu, A., & Leroux, J (2008). Organogels and their use in drug delivery--a review. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 125(3), 179–192.
- Wallace, T., Blumberg, J., Johnson, E., & Shao, A. (2015). Dietary Bioactives : Establishing a Scientific Framework for Recommended Intakes. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 1–4.
- Xu, X. (2014). *Improve bioaccessibility of quercetin using pseudo-organogel base nanoemulsion*. Rutgers, New Brunswick, New Jersey
- Yadav, H., Anwar, N., Halabi, A., & Alsalloum, G. (2017). Nanogels as Novel Drug Delivery Systems - A Review. *Insights in Pharma Research*, 1, 1–8.
- Yadav, K., Maan, P., Bhatia, S., & Yadav, N. (2014). Exploration of

- antiinflammatory activity of turmeric and onion combination on phorbol ester induced ear inflammation in mice. *Annals of Phytomedicine*, 3(2), 50–54.
- Zequan, L., Xue, Y., & Qiang, Z. (2014). Turbiscan: History , Development , Application to Colloids and Dispersions. *Advanced Materials Research*, 936, 1592–1596.
- Zhang, X., Malhotra, S., Molina, M., & Haag, R. (2015). Micro- and nanogels with labile crosslinks – from synthesis to biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 44, 1948–1973.