CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN QUÍMICA APLICADA

Saltillo, Coahuila a 27 de noviembre de 2020

Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

Coordinación de Posgrado
Presente

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **ELIZABETH REYES DE LA CRUZ** titulado Preparación de Nanopartículas Poliméricas Biocompatibles y Biodesechables Cargadas con Curcumina, el cual fue presentado el día 24 de noviembre de 2020, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

Sinodales

Dr. Jorge Romero García
Presidente

Dra. Abril Fonseca García
Secretario

M.C. Hened Saade Caballero
Vocal

Vo. Bo. de los Asesores

Dra. María Esther Treviño Martínez

Dr. Francisco Javier Enríquez Medrano

CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: ELIZABETH REYES DE LA CRUZ **FIRMA** _____

TITULO: Preparación de Nanopartículas Poliméricas Biocompatibles y Biodesechables Cargadas con Curcumina.

ASESORES: Dra. María Esther Treviño Martínez **FIRMA** _____

Dr. Francisco Javier Enríquez Medrano **FIRMA** _____

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 24 de Noviembre de 2020

Sello de la Institución

Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA

CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

Preparación de Nanopartículas Poliméricas Biocompatibles y Biodesechables Cargadas con Curcumina

Presentada por:

ELIZABETH REYES DE LA CRUZ

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dra. María Esther Treviño Martínez
Francisco Javier Enríquez Medrano

SINODALES

Dr. Jorge Romero García
Presidente

Dra. Abril Fonseca García
Secretario

M.C. Hened Saade Caballero
Vocal

Saltillo, Coahuila. México. **Noviembre, 2020**

CENTRO DE INVESTIGACION
EN QUIMICA APLICADA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

Preparación de Nanopartículas Poliméricas Biocompatibles y Biodesechables Cargadas con Curcumina

Presentada por:

ELIZABETH REYES DE LA CRUZ

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dra. María Esther Treviño Martínez
Dr. Francisco Javier Enríquez Medrano

Saltillo, Coahuila. México. **Noviembre, 2020**

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 24 de noviembre de 2020

ELIZABETH REYES DE LA CRUZ

Nombre y Firma

CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

TESIS

"PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIOCOMPATIBLES Y BIODESECHABLES CARGADAS CON CURCUMINA"

Para obtener el grado en:

MAESTRO EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

PRESENTA:

ELIZABETH REYES DE LA CRUZ

ASESORES:

Dra. María Esther Treviño Martínez

Dr. Francisco Javier Enríquez Medrano

Noviembre 2020

Nunca consideres el estudio como una obligación

sino como una oportunidad para penetrar

en el bello y maravilloso mundo del saber

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a las Instituciones que han hecho posible la realización de mis estudios de maestría. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca académica y al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), por brindarme las facilidades en el uso de sus instalaciones para el desarrollo del presente trabajo de investigación, mi más sincero agradecimiento.

Al proyecto Ciencia Básica de Conacyt número A1-S-29092 por el apoyo financiero para la realización de este trabajo.

A mis asesores de tesis, la Dra. María Esther Treviño Martínez y el Dr. Francisco Javier Enríquez Medrano, por su enseñanza, orientación, especialmente su paciencia y sus adecuadas sugerencias en la elaboración del documento, permitiéndome aprovechar este trabajo al máximo. Les agradezco enormemente por su apoyo para la culminación del presente trabajo de tesis.

Al comité de sinodales, integrado por el Dr. Jorge Romero García, la Dra. Abril Fonseca García y la M.C. Hened Saade Caballero, por sus consejos, por sus acertadas observaciones y sugerencias en la mejora del documento de tesis, los cuales me fueron siempre de gran apoyo. Especialmente a la M.C Hened, por su apoyo y colaboración durante todo el proyecto de tesis el cual siempre siguió de cerca y estuvo al pendiente hasta su terminación, así como a la Dra. Abril, por el apoyo brindado durante la etapa de caracterización final y algunos experimentos.

A la I.Q. Beatriz Elvira Reyes Vielma por su apoyo durante la realización de pruebas de polimerización y preparación de muestras para su caracterización.

A la Lic. Maricela García Zamora por su apoyo durante el último periodo de caracterización de muestras.

A la Q.F.B. Carmen Natividad Alvarado Canché por su apoyo en la caracterización de muestras por espectrometría de UV-vis. A la L.C.Q. Judith Nazareth Caballero Romero por la caracterización de ^{1}H-NMR, así como a la M.C. Anabel Ochoa Córdoba por llevar a cabo la caracterización de DSC y al Dr. Enrique Díaz Barriga por los análisis de TEM. Y por último al M.C. José Díaz Elizondo por su apoyo técnico en algunos requerimientos del Laboratorio.

A todo el personal de la Dirección de Posgrado, en especial a la Dra. Leticia Larios López, por el apoyo brindado durante mi estancia en CIQA. Así como Nancy G. Espinosa Pinales, por toda la ayuda brindada durante los trámites y documentación en CIQA.

A todos los profesores del Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros que contribuyeron en mi formación académica, mis sinceros agradecimientos.

A mis estimados amigos, quienes siempre me han alentado para seguir adelante, Karen, Katiana, Aldair y Adrián con los cuales no podría estar sin su convivencia, especialmente a mi amiga Yamileth Simbron, gracias por todos estos años de amistad y apoyo incondicional.

A mis colegas y grandes amigos de CIQA, Carmen, Edith, Carolina, Alan y Osvaldo, por todos los momentos vividos, experiencias y consejos que me brindaron durante nuestra formación académica. Especialmente a mí querido amigo Alan Hernández, por su amistad y apoyo brindado durante todo este tiempo.

DEDICATORIA

La presente Tesis está dedicada a Dios, que me ha dado todo cuanto poseo y quien me ha acompañado durante este largo camino.

Mi padre Librado Reyes y mi madre Agustina de la Cruz quienes siempre han estado a mi lado apoyándome para culminar cada una de mis metas. A quienes sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida, fomentando con ello el deseo de superación y triunfo en mí, siendo ellos mí más grande ejemplo, orgullo y motivación para alcanzar mis anhelos.

A mi hermano Librado Reyes, quien siempre me ha alentado en cada uno de mis sueños para convertirlos en metas y a su vez convertirlos en triunfos. Gracias porque tus consejos y apoyo incondicional me han ayudado a alcanzar muchos de mis logros, entre los cuales se incluye este.

A mi hermana Jael, a mi cuñado Rafael y a mi abuelita María, por todos sus consejos los cuales me han hecho una mejor persona, así como a mis pequeños sobrinos que alegran mi vida Jibsam y Amiel.

A mi apreciado amigo Carlos Pino, tu ayuda ha sido importante, has estado conmigo en todo el trayecto de esta etapa e incluso en los momentos más difíciles. Te has convertido en un hermano más para mí y no me queda más que agradecerte por todo lo que has hecho por mí.

A mi estimado César A. Ramírez, desde el momento en que te conoci supe que había encontrado a mi mejor amigo, mi cómplice y sobre todo a quien sostendría mi mano cuando no pudiera más, sé que este proyecto no fue fácil de culminar, sin embargo, siempre me has motivado y ayudado para dar lo mejor de mí, siempre me decías que lo lograría, hoy no me queda nada más que decir gracias por confiar en mí.

RESUMEN

Las nanoestructuras poliméricas como sistemas de estudio para el acarreo y liberación de fármacos han ido ganando alta notoriedad en la investigación. En este contexto las nanopartículas poliméricas (NPPs) son de gran interés por características tales como la posibilidad de ser obtenidas por diferentes metodologías, con diversos tamaños y funcionalidades; sin embargo, una de las principales limitantes sobre este tipo de nanoestructuras es la dificultad para controlar tamaños por debajo de los 50 nm durante su obtención, siendo que esta peculiaridad aumentaría su permanencia en el torrente sanguíneo. Pocos estudios se han reportado en la literatura sobre NPPs base copolímeros metacrílicos para la aplicación antes mencionada, siendo esta familia de copolímeros atractivos porque dependiendo de su composición y peso molecular pueden presentar solubilidad dependiendo del pH del medio en que se encuentren. Por otro lado, la encapsulación de curcumina (a la que se le atribuyen numerosas propiedades medicinales) en sistemas poliméricos si ha sido ampliamente reportada, pero difícilmente en sistemas con tamaños de partícula por debajo de los 20 nm.

En esta investigación se reporta la síntesis del copolímero poli(metacrilato de metilo-*co*-ácido metacrílico) en presencia de 3 diferentes concentraciones de curcumina, empleando la técnica de Polimerización en Heterofase en Semicontinuo, dando como resultado diversos látex constituidos de NPPs del copolímero metacrílico antes mencionado cargadas con la curcumina, con tamaños de partícula por debajo de los 15 nm y con una composición homologa (MMA:MAA = 2:1) al copolímero comercial conocido como Eudragit S100, que comúnmente es utilizado como excipiente para liberación de fármacos en el tracto gastrointestinal.

Un segundo método de cargado de curcumina en las NPPs metacrílicas se llevó a cabo a partir de fenómenos de difusión-fisisorción, en el cual las NPPs, previamente obtenidas por SHP, fueron tratadas con una solución orgánica de la curcumina en diclorometano (metodología con solicitud de patente de nuestro

grupo de trabajo) para la incorporación del principio activo sobre la superficie de las NPPs. En ambas metodologías se estudió el efecto de cargado sobre el diámetro de partícula, contenido de sólidos y estabilidad coloidal del látex, así como eficiencia de cargado a diferentes concentraciones de curcumina.

Para el método del cargado *in situ* durante la polimerización se encontró que la presencia de la curcumina ocasionó un retraso de la velocidad de polimerización, sin embargo, se observó que la curcumina no afecta la nucleación y el crecimiento de partículas.

De acuerdo a la caracterización por espectroscopia de UV-vis, se demostró que ambos métodos funcionaron para el cargado de la curcumina; siendo el método donde el cargado se hace después de haber formado las NPPs el que permitió una mayor relación curcumina/polímero, pues la concentración de este compuesto fue de 450 mg/L; valor que supera por mucho el valor de solubilidad de la curcumina en agua en soluciones ácidas (≈3 mg/L), lo cual augura diversas ventajas como una mayor biodisponibilidad. La caracterización de los sistemas cargados con la curcumina incluyó análisis por DSC, ^{1}H NMR y TEM.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN 1
2. ANTECEDENTES 3
   2.1 Curcumina 3
   2.1.1 Aspectos generales 3
   2.1.2 Propiedades fisicoquímicas 4
   2.1.3 Propiedades terapéuticas 5
   2.1.4 Biodisponibilidad oral 7
   2.2 Nanotrasportadores para la liberación de fármacos 9
   2.2.1 NPPs para la liberación controlada de fármacos 11
   2.3 Polímeros utilizados para la liberación controlada de fármacos 12
   2.3.1 Eudragit S100 13
   2.4 Polimerización por radicales libres 15
   2.4.1 Etapas de la polimerización por radicales libres 15
   2.5 Copolimerización por radicales libres 17
   2.5.1 Tipos de copolímeros 19
   2.6 Polimerización en emulsión en semicontinuo 20
   2.7 Polimerización en heterofase en semicontinuo 22
3. OBJETIVOS 24
   3.1 Objetivo general 24
   3.2 Objetivos específicos 24
4. HIPÓTESIS 25
5. PARTE EXPERIMENTAL 26
   5.1 Reactivos 26
   5.2 Equipo. 26
   5.2.1 Cargado *in situ* de curcumina durante la polimerización 26
   5.2.2 Cargado de curcumina por el método de difusión-fisisorción 28
   5.2.3 Equipos utilizados para preparación de muestras y caracterización 28
   5.3 Metodología 29
   5.3.1 Dispersión de la curcumina en la mezcla de monómeros 29

5.3.2 Preparación de NPPs cargadas con curcumina mediante el método de cargado *in situ*.. 30
5.3.3 Diálisis de los látex para eliminación de surfactante 31
5.3.4 Cargado de NPPs con curcumina por el método de difusión-fisisorción..... 32
5.4 Caracterización. 33
5.4.1 Determinación del tamaño de partícula 33
5.4.2 Cuantificación de contenido de curcumina en el látex 33
5.4.3 Determinación de la composición de los copolímeros en las NPPs cargadas..... 34
5.4.4 Determinación de las propiedades térmicas de las NPPs cargadas con curcumina 34
5.4.5 Determinación del tamaño y morfología de las NPPs cargadas con curcumina.. 34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 36
6.1 Preparación de NPPs de poli(MMA-*co*-MAA) cargadas con curcumina mediante el método de cargado *in situ*..... 36
6.2 Preparación de NPPs de poli(MMA-*co*-MAA) cargadas con curcumina mediante el método de difusión-fisisorción..... 51
7. CONCLUSIONES..... 59
8. TRABAJO FUTURO..... 61
9. BIBLIOGRAFÍA..... 62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Rizoma de Cúrcuma Longa (Koehlers medical–Plants). 3
Figura 2.2 Estructura química de la curcuminal [26,29]. 5
Figura 2.3 Propiedades terapéuticas de la curcumina [25,31,32]. 6
Figura 2.4 Representación esquemática de las nanocápsulas y nanoesferas utilizadas para el transporte de fármacos [21]. 11
Figura 2.5 Tipos de copolímeros. 20
Figura 5.1 Sistema utilizado para llevar a cabo las copolimerizaciones. ..... ……27
Figura 5.2 Sistema utilizado para el cargado por el método de difusíon-fisisorción..... 28
Figura 5.3 Curva de calibración UV-vis para la determinación de contenido de curcumina. 32
Figura 6.1 Perfil de adición de curcumina para mezclas de monómeros preparadas con diferentes concentraciones de curcumina y diferentes tiempos de sonicación..…….. ……37
Figura 6.2 Efecto de la concentración de curcumina sobre la cinética de la polimerización 41
Figura 6.3 Termograma de DSC para las muestras R1 (polimerización en ausencia de curcumina) y R6 (experimento con el mayor porcentaje de curcumina en la formulación inicial). 43
Figura 6.4 Espectros de 1H NMR de las muestras R1, R2, R3, R4, R5 y R6. 45
Figura 6.5 Espectros de 1H NMR de las muestras R1 y R6. 45
Figura 6.6 Efectos de la concentración de curcumina sobre el D_p con el avance de la polimerización. 46
Figura 6.7 Látex obtenidos de las pólimerizaciones en presencia de curcumina 47
Figura 6.8 Concentración de curcumina con respecto al polímero en el látex obtenidos mediente el método de cargado *in situ*. 48
Figura 6.9 Concentración de la curcumina con respecto al los látex obtenidos mediente el método de cargado *in situ*. 49
Figura 6.10 Disminución de la concentración de curcumina en el látex despúes del proceso de dialísis. 50
Figura 6.11 Micrografía de TEM de la muestra R5. 51
Figura 6.12 Curvas de absorbancia determinadas por espectroscopía de UV-vis para las pruebas de cargado por el método de difusión-fisisorción. 53

Figura 6.13 Látex obtenidos despúes del cargado por el método de difusión-fisisorción . 54
Figura 6.14 Concentración de curcumina con respecto a las NPPs en los látex obtenidos mediente el método de difusión-fisisorción…..…….....54
Figura 6.15 Concentración de la curcumina en látex (cargado por difusión- fisisorción)…55
Figura 6.16 Termogramas de DSC para las NPPs cargadas con curcumina por el método de difusión-fisisorción. 56
Figura 6.17 Espectros de H^1 NRM para las NPPs cargadas con curcumina por el método de difusión-fisisorción, comparación con las NPPs antes del cargado.. 57
Figura 6.18 Micrografía de TEM para las NPPs cargadas con curcumina por el método de difusión-fisisorción. 58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Técnicas empleadas en la elaboración de nanotrasportadores. 10
Tabla 2.2 Aplicaciones del Eudragit S100……. 14
Tabla 5.1 Formulaciones empleadas en la síntesis de NPPs cargadas con curcumina mediante el método de cargado *in situ*. 31
Tabla 6.1 Efecto de las condiciones de sonicación sobre la cantidad de curcumina realmente adicionada al reactor……...38
Tabla 6.2 Polimerizaciones SHP para preparar NPPs del copolímero poli(MMA-co-MAA) cargadas con curcumina mediente el método de cargado *in situ*. 39
Tabla 6.3 Temperatura de transición vítrea para las NPPs del copolímero poli(MMA-co-MAA) cargadas con curcumina mediente el método de cargado *in situ*. 52
Tabla 6.4 Composición de copolimeros y porcentaje de curcumina para las NPPs obtenidas mediente el método de cargado *in situ*. 52
Tabla 6.5 resultados de las diferentes etapas de cargado por el método de difusión-fisisorción..... 52

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los requerimientos en el área médica han llevado consigo la búsqueda de nuevos medicamentos para la cura de un sinfín de padecimientos. Entre los principios activos que han llamado la atención de un gran número de científicos se encuentra la curcumina; uno de los polifenoles presente en la cúrcuma [(1)].

A este compuesto se le atribuyen múltiples propiedades terapéuticas como anticancerígeno, antioxidante, anticoagulante, antidiabético, antiinflamatorio y antiviral, entre otras [(1),(2),(3)]. Hoy en día, se cuenta con numerosos estudios y ensayos clínicos (fases I y II) donde que demuestra la amplia variedad de posibles aplicaciones para el tratamiento de enfermedades en humanos. En estos estudios destaca su empleo en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer; solo o al ser combinado con otros fármacos [(4),(5),(6),(7)]. Es importante mencionar además, que incluso a altas dosis, no se ha reportado un efecto de toxicidad con el uso de la curcumina.

No obstante, así como existen numerosas publicaciones sobre sus propiedades terapéuticas, también las hay donde se revelan sus pobres propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas. Estas desventajas, que se atribuyen principalmente a su inestabilidad química y su baja solubilidad en agua, limitan su bioactividad en el cuerpo humano [(4),(8)]. De esta manera, debido a su baja biodisponibilidad oral, baja absorción y rápido metabolismo, las propiedades terapéuticas de la curcumina se ven limitados en los ensayos *in vivo* [(9),(10),(11)].

Para mejorar el grado de aprovechamiento y asimilación de la curcumina se han desarrollado una serie de investigaciones que buscan generar estrategias de cargado y liberación del compuesto; específicamente para ser dirigida hacia un órgano de interés [(8),(12)].

La nanotecnología farmacéutica es una disciplina que ha revolucionado la medicina moderna mediante el uso de nanoestructuras cargadas con principios

activos. Debido a su fácil transporte a través del torrente sanguíneo, las nanopartículas poliméricas (NPPs) destacan entre las nanoestructuras hasta ahora desarrolladas. Además, brindan mayor protección del principio activo y permiten su liberación controlada, aumentando sensiblemente su biodisponibilidad en el cuerpo humano [(13),(14),(15)].

Entre los materiales utilizados para preparar las NPPs destacan los polímeros biocompatibles y biodegradables [(16)]. En el CIQA se ha desarrollado un método para la preparación de NPPs de un copolímero sintetizado a partir de metacrilato de metilo y ácido metacrílico, en una relación mol de 2:1 (MMA:MAA), cargadas con ibuprofeno mediante la técnica de polimerización en heterofase en semicontinuo llevada a cabo en presencia del principio activo [(17)]. Asimismo, se ha desarrollado un método para preparar NPPs del mismo copolímero con diámetro promedio de 10 nm [(18)], para posteriormente cargarlas con diferentes principios activos por un método de difusión-fisisorción en un medio heterogéneo [(19)].

En el presente proyecto de tesis se hizo una adecuación de ambas tecnologías para la preparación de NPPs, del mismo copolímero, cargadas con curcumina. De acuerdo a la caracterización por espectroscopia de UV-vis, se encontró que ambos métodos funcionaron para el cargado de la curcumina en las NPPs; siendo el método donde el cargado se hace después de haber formado las NPPs el que permite una mayor relación curcumina/polímero. Esto se explica porque la curcumina se encontraría localizada en la coraza de las NPPs con una incorporación de la curcumina libre de algún impedimento espacial, a diferencia de la primera metodología que produciría NPPs con la curcumina distribuida al interior de las mismas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Curcumina

2.1.1 Aspectos generales

Actualmente, existe una gran variedad de plantas a las que se atribuyen propiedades curativas o preventivas. Entre estas plantas se encuentra la cúrcuma, la cual pertenece a la familia de las zingiberáceas (Cúrcuma Longa), uno de los derivados del rizoma de la planta es la curcumina, una especie amarilla vibrante, (figura 2.1) [20].

Figura 2.1 - "Rizoma de Cúrcuma Longa" (Koehlers Medicinal-Plants).

La curcumina es el principal componente activo de la cúrcuma y fue aislado por primera vez en 1815 por dos científicos alemanes, Vogel y Pelletier [21], aunque su estructura química fue determinada por Roughley y Whiting en 1973 [22]. No obstante que se encuentra presente junto con la desmetoxicurcumina, la bisdesmetoxicurcumina y, la más recientemente descubierta, ciclocurcumina, la curcumina es el responsable de las propiedades medicinales y farmacológicas de la cúrcuma. La curcumina comercial es en realidad una mezcla de curcuminoides

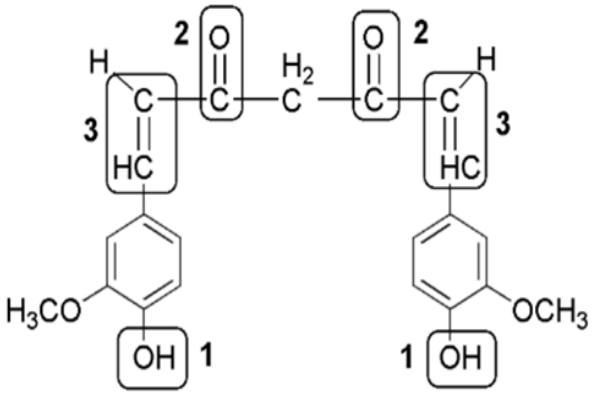
que contiene aproximadamente 77% de curcumina, 18% de demetoxicurcumina y 3% de bisdemetoxicurcumina [23],[24].

Entre las aplicaciones que tradicionalmente se le han dado a la curcumina se puede mencionar su empleo como especia en el curry (comida asiática), como pigmento para telas y como remedio casero para diversos trastornos de la salud [25].

2.1.2 Propiedades fisicoquímicas

La curcumina es una molécula fotosensible, prácticamente insoluble en agua, sin embargo, es muy soluble en disolventes orgánicos (etanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida) [5]. Es altamente inestable y sufre una rápida degradación hidrolítica en condiciones neutras o alcalinas a feruloil metano y ácido ferúlico, la degradación química se produce por oxidación mediante peróxidos, radicales libres e iones [26],[27]. Es estable cuando se encuentra a temperaturas entre $<$ 80 a 100 °C [28].

Al igual que los curcuminoides, la curcumina posee un esqueleto hidroxicarbonado dicetónico con varios grupos funcionales, los cuales proveen a la molécula de un comportamiento químico característico, es decir, sensible tanto al entorno químico adyacente, como a la reactividad propia de dichos grupos funcionales [26],[28]. Tiene un punto de fusión 176 - 183°C. Su fórmula molecular es ($C_{21}H_{20}O_6$) y su peso molecular es de 368.38 g/mol. En la Figura 2.2 se representa la estructura química de la curcumina, así como las propiedades terapéuticas de los diferentes fragmentos de los grupos funcionales [26],[29].



1.- Grupos hidroxilo: actividad antioxidante

2.- Grupos cetónicos: actividad antiinflamatoria y anticancerígena

3.- Dobles enlaces C=C: actividad antiinflamatoria y anticancerígena

Figura 2. 2 Estructura química de la curcumina [26],[29]**.**

2.1.3 Propiedades terapéuticas

Desde la antigüedad la curcumina se ha empleado en la medicina tradicional china como un remedio casero para una amplia variedad de enfermedades como: anorexia, tos, trastornos hepáticos, hemorragias, problemas menstruales, infecciones, fiebre, congestión y sinusitis [28].

Desde su descubrimiento se empleó para tratar infeccione oculares, curar heridas, quemaduras y acné. Por ejemplo, la compañía farmacéutica estadounidense Johnson&Johnson fabrica curitas con cúrcuma para el mercado indio. En 1994, se probó la actividad bacteriana de la curcumina contra cepas de salmonela, hepatitis y tuberculosis, entre otras [23].

Debido al interés científico y comercial que representa, por la gran cantidad las propiedades que se le atribuyen, se han realizado numerosos estudios durante los últimos 30 años para establecer las acciones biológicas y farmacológicas de la cúrcuma y sus extractos [24],[25],[30].

Gracias a estos estudios se ha podido demostrar que la curcumina tiene una amplia gama de actividades farmacológicas y, por lo tanto, desempeña un papel importante en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades (Figura 2.3) [(25),(31),(32)]. Por ejemplo, se ha encontrado que un grupo funcional hidroxilo de diferuloil metano reduce las reacciones alérgicas, aumenta la resistencia a la oxidación y desinflama las vías respiratorias de personas que padecen asma [(33)].

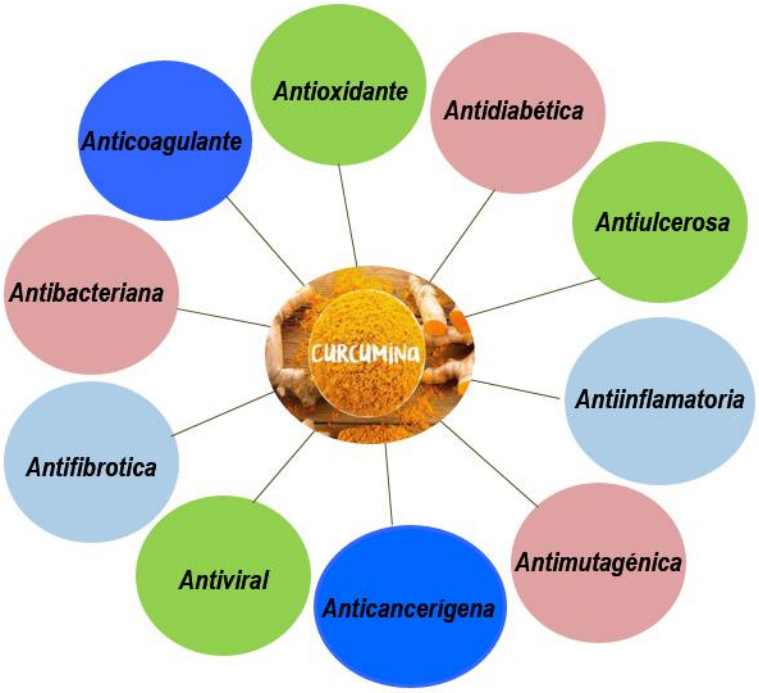


Figura 2.3 Propiedades terapéuticas de la curcumina [(25),(31),(32)].

Hoy en día, la evidencia reunida a través de los estudios realizados confirma que la curcumina, combinada con otros fármacos o agentes anticancerígenos, muestra actividad quimiopreventiva e inhibidora del crecimiento de varias líneas celulares tumorales debido a su actividad antioxidante y antiinflamatoria. Además, es efectiva para el tratamiento del cáncer al suprimir las tres etapas de la carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión [(7),(34),(35)].

En estudios recientes, realizados en ratones, se ha encontrado que la curcumina tiene un efecto potencial como agente quimiopreventivo de baja toxicidad y resistencia; además de ser un sensibilizador de la quimioterapia para las células tumorales al proteger los tejidos [35]. También se ha encontrado que el uso de curcumina durante la radioterapia, en dosis de 6 g/día, reduce la gravedad de la dermatitis por radiación en pacientes con cáncer de mama [10].

2.1.4 Biodisponibilidad oral

Con base en lo anteriormente dicho, la curcumina es un compuesto con gran potencial para el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades. Varios estudios farmacológicos han revelado ya su eficacia y baja toxicidad; motivo por el cual se han realizado una variedad de estudios y ensayos clínicos para determinar su biodisponibilidad oral [1],[4],[25].

En estos estudios se ha demostrado que la curcumina tiene limitadas propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas, las cuales están principalmente relacionas con su inestabilidad química, baja solubilidad en agua y rápida metabolización en el sistema digestivo [33],[36]. Los estudios llevados a cabo sobre el tema son muy numerosos por lo que a continuación solo se mencionarán los más relevantes.

En 1978 Wahlstrom y Blennow, realizaron un estudio donde utilizaron ratas Sprague-Dawley para examinar la absorción, distribución y excreción de la curcumina en el organismo. Se les administró por vía oral 1 g/kg de curcumina encontrándose que casi el 75% se eliminaba inalterada en las heces y orina de las ratas, mientras que solo se encontraron cantidades insignificantes en la sangre. En este estudio se demostró que la curcumina es pobremente absorbida por el intestino [37].

En un estudio posterior Ravindranath y Chandrasekhara, demostraron que después de 30 min de la administración oral de 0.4 g de curcumina en ratas, el

90% de la misma se encontraba presente en el estómago y el intestino delgado. Sin embargo, después de 24 h solo el 1% se encontraba en la sangre [38].

Se ha reportado que la ingesta promedio de cúrcuma por parte de los asiáticos varía de 0.5 a 1.5 g / día / persona, sin reportar efectos tóxicos, por lo que se realizó un estudio en ratas Wistar, cobayas y monos donde se administró una dosis más alta a las consumida por humanos (2.5 g/kg) y no se observaron cambios en la apariencia y peso del riñón, hígado y corazón. Asimismo, no se mostraron efectos adversos como alteraciones patológicas o de comportamiento, ni se registraron decesos en los animales empleados en este estudio [1].

En 2001 dio inicio la primera fase de los ensayos clínicos llevados a cabo en humanos por Cheng *et al* [39]., y de manera simultánea por Sharma *et al* [40]. El primer ensayo se llevó a cabo en pacientes con lesiones premalignas y el segundo en individuos con cáncer colorrectal; ambos estudios consistieron en ingestas orales de curcumina con dosis de 0.5 a 0.8 g durante 3 días y 0.036 a 0.18 g por un periodo de 4 meses, respectivamente. Los dos estudios concluyeron que los pacientes tratados no mostraron signos de toxicidad. Además, se demostró que el uso de la curcumina con dosis de hasta 1.2 g/día no causa toxicidad significativa a corto plazo [40].

Actualmente, se cuenta con numerosos estudios clínicos y preclínicos que comprueban la eficacia de la curcumina contra varios tipos de células cancerígenas. No obstante, su actividad terapéutica se ve limitada porque, incluso a altas dosis, tiene baja biodisponibilidad tanto en plasma como en tejidos. Durante las pruebas *in vivo* se encontraron cantidades muy bajas de curcumina en plasma. Por ejemplo, un análisis donde se administraron 2 g/kg de curcumina vía oral en humanos, dio como resultado una concentración sérica extremadamente baja oscilando entre 0.006-0.005 g/L [25].

Estas investigaciones sobre la biodisponibilidad oral de la curcumina revelan claramente la seguridad citotóxica de su empleo, no obstante confirman también su escasa solubilidad en agua, baja biodisponibilidad oral y rápido metabolismo, lo que dificulta la entrega a los órganos objetivo. Una estrategia para superar estos

problemas es el uso de transportadores de tamaño nanométrico como sistemas de administración del principio activo [19].

2.2 Nanotrasportadores para la liberación de fármacos

En los últimos años, el avance en las ciencias de los materiales, ingeniería de polímeros y nanotecnología han permitido que la investigación multidisciplinaria formule y evalúe el desarrollo de sistemas de trasporte y liberación controlada de fármacos. Estos transportadores deben tener un tamaño que les permita viajar fácilmente a través del torrente sanguíneo y llevar la sustancia terapéutica al sitio de interés en el cuerpo humano (para ser absorbido por el órgano, tejido, célula, etc.) [41],[42]. Gracias a esto, se han desarrollado sistemas de liberación, a escala micro o nano, que brindan mayor solubilidad, disponibilidad y retención de fármacos en un sitio objetivo del cuerpo humano [43].

Además de administrar medicamentos, los nanotrasportadores pueden tener otras funciones como: a) proteger a los principios activos sensibles de factores como pH, enzimas, proteínas, etc., b) aumentar su biodisponibilidad, actividad terapéutica y estabilidad química y c) minimizar su toxicidad y efectos secundarios [41],[44]. Dentro del tiempo necesario para que el principio activo tenga su efecto, todos los materiales empleados en la elaboración de los nanotrasportadores deben ser biocompatibles, no tóxicos y preferiblemente biodegradables (o biodesechables) [45].

En la actualidad, se han desarrollado diversas nano-preparaciones de curcumina para la terapia contra el cáncer, las nanopartículas (NPs) de lípidos sólidos, liposomas, glicoles, celulosa, dendrímeros, nanodiscos y nanofibras [8], [46]. En la Tabla 2.1 se presentan algunos de los resultados más importantes obtenidos en diferentes estudios al emplear nanotrasportadores, así como las técnicas de preparación [25],[47],[48].

Las NPs son generalmente dispositivos esféricos y se encuentran en formas muy variadas. Así, es posible encontrar NPs a base de lípidos, NPs mesoporosas,

NPs recubiertas de metales (oro, hierro y plata), NPs inorgánicas, nanotubos de carbono, dendrímeros y NPs magnéticas y poliméricas [49].

En comparación con el uso de curcumina en polvo, con el uso nanotrasportadores generalmente se reportan mejores resultados para la biodisponibilidad de la curcumina. Por ejemplo el uso de NPs coloidales (theracurmin) ocasionó un incremento de la concentración de curcumina en plasma tanto en ratas (40 veces) como en humanos (27 veces) [25],[50],[51].

Tabla 2.1 Técnicas empleadas en la elaboración de nanotrasportadores [25].

	Materiales	Método de preparación	Resultados
Nanopartículas	PLGA	Evaporación por emulsión-difusión	9 veces más biodisponibilidad oral en comparación con la curcumina con piperina.
	Quitosano-poli (cianoacrilato de butilo)	Polimerización en emulsión	Inhibe el crecimiento del carcinoma hepatocelular y la angiogénesis tumoral.
	Etilcelulosa	Diálisis	Se adjunta bien a la mucosa gástrica.
Micelas	MPEG-PCL	Diálisis	Mayor solubilidad y estabilidad.
	MPEG-P(CL-*co*-PDO)	Dispersiones sólidas	Liberación lenta y buena estabilidad a la liofilización.
	MPEG-PA	Hidratación de la película	La degradación y liberación mediada por enzimas con lipasa y lisado de células HeLa.
Emulsiones	Aceite de linaza, Lecitina, DSPE-PEG 2000	Ultrasonido de alta energía	Citotoxicidad mejorada en células resistentes mediante la administración simultánea de paclitaxel y nanoemulsiones de curcumina.

2.2.1 NPPs para la liberación controlada de fármacos

Las NPPs pueden obtenerse principalmente mediante dos procesos: reacciones de polimerización en medios dispersos y uso de polímeros preformados [52]. Para el primer caso se pueden utilizar técnicas como la polimerización en emulsión, miniemulsión y microemulsión, polimerización interfacial y polimerización en heterofase. Para el segundo caso se pueden preparar NPPs por medio de la evaporación de solventes, nanoprecipitación, salado, gelificación ionotrópica y tecnologías de fluido supercrítico [9],[41],[53].

Dependiendo del método de preparación de las NPPs, se obtienen nanocápsulas y nanoesferas (ver Figura 2.4). Las nanocápsulas tienen una estructura de núcleo-coraza, donde el principio activo está atrapado en una cavidad (núcleo) rodeada por una capa de polímero (coraza). Mientras que las nanoesferas son matrices poliméricas en las que el principio activo se encuentra uniformemente disperso. En ambos casos el medicamento es protegido de la degradación química y enzimática [44],[45].

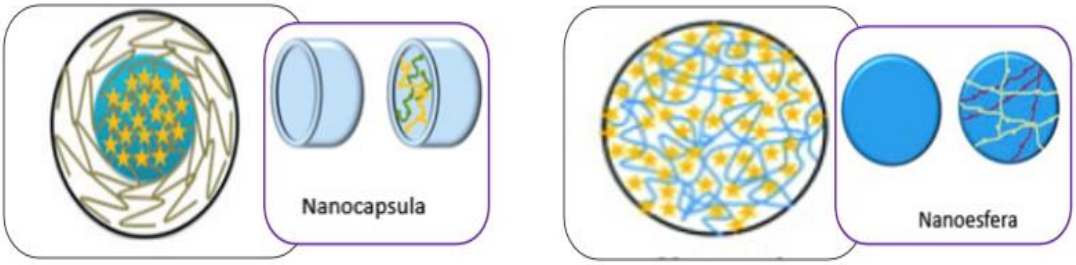


Figura 2. 4 Representación esquemática de las nanocápsulas y nanoesferas utilizadas para el transporte de fármacos [21].

El cargado de NPPs con un principio activo se puede hacer por dos métodos: a) obtención de las NPPs en presencia del principio activo y b) adsorción del principio activo sobre las NPPs previamente obtenidas [52].

Para el primer caso, donde el principio activo queda encapsulado por la NPP, la eficiencia del cargado depende de la solubilidad del fármaco en el monómero y en el polímero. Para el segundo caso, la eficiencia del cargado depende de las interacciones entre los grupos funcionales de las moléculas del fármaco con los grupos funcionales presentes en la superficie de la NPPs [(16),(52)].

Existen numerosas publicaciones sobre cargado de NPPs donde la regla general, para lograr una alta eficiencia de cargado, es que el principio activo se encuentre disuelto molecularmente. Por lo tanto, es difícil lograr el cargado de NPPs dispersas en agua con un principio activo hidrófobo. Un método comúnmente utilizado para lograr la coexistencia de las nanopartículas dispersas en agua con el principio activo hidrófobo es la formación de un sistema cosolubilizado donde se mezclan: a) una solución orgánica del principio activo; b) una dispersión acuosa de las partículas poliméricas y c) un alcohol. De esta manera, se logra la interacción del principio activo con las NPPs para que pueda llevarse a cabo el cargado de las mismas. Este método tiene como desventaja la necesidad de incluir varias etapas posteriores al cargado, para la eliminación del solvente orgánico [(19)].

La opción de preparar las NPPs para su posterior cargado, podría parecer más complicada que la opción del cargado *in situ*. Sin embargo, ofrece la posibilidad de lograr una mayor cantidad de productos diferentes porque un mismo tipo de partícula puede ser utilizado para el cargado con diferentes fármacos [(19)].

2.3 Polímeros utilizados para la liberación controlada de fármacos

La elección del polímero adecuado que será utilizado para el desarrollo de un sistema para la administración de un fármaco es de gran importancia, ya que se busca optimizar la dosis empleada para el tratamiento del paciente, logrando que llegue al sitio de acción con un mínimo de efectos secundarios [(54)]. Actualmente, se puede escoger entre polímeros y copolímeros biocompatibles aceptados por la

Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y el poli(MMA-*co*-MAA) (Eugragit S100), entre otros [9],[55].

2.3.1 Eudragit S100

La marca comercial EUDRAGIT® (GmbH & Co.KG) está aprobada por la FDA, para su empleo en la administración de medicamentos. Los productos bajo esta marca son copolímeros que contienen distintas relaciones molares de las unidades monoméricas de ácido metacrílico, ésteres de ácido metacrílico y metacrilato de dimetilaminoetilo. De acuerdo con la composición del copolímero, se tienen materiales con propiedades que permiten la liberación del fármaco en el lugar correcto y momento adecuado; además, si es necesario, durante un período de tiempo y pH determinado [56],[57].

Como se mencionó anteriormente, en el CIQA se ha desarrollado un copolímero de composición similar al Eudragit S100 (ES-100), copolímero utilizado como vehículo para obtener dispersiones sólidas y sistemas amorfos, como microesferas, micropartículas y nanopartículas [17],[18]. El ES-100 tiene una solubilidad en agua a un pH > 7, ha sido empleado en la elaboración de píldoras para la liberación controlada de medicamentos en el colon y parches transdérmicos [56]. En una revisión bibliográfica sobre este compuesto se pueden encontrar numerosos informes sobre la preparación de partículas de ES-100 cargadas con medicamentos (Tabla 2.2) [25].

Tabla 2.2 Aplicaciones del Eudragit S100 [54],[56].

Nombre del fármaco	Sistema de administración	Método de preparación	Observaciones
Eudragit S100			
Donepezil	Parches transdérmicos	Colada por solvente	La liberación prolongada, y la biodisponibilidad mejorada, evita el efecto de primer paso.
5-fluourouacil y leucovorina	NPPs microencapsuladas con polímeros entéricos	Gelación iónica seguida de un método de evaporación por solvente	Dirigir selectivamente los medicamentos al colon en la quimioterapia para cáncer de colon.
Clorhidrato de raloxifeno	Nanocápsulas	Deposición interfacial de polímero preformado.	La mejor actividad se observó para las nanocápsulas Eudragit S100 cargadas con RH después de 72 h.
Indometacina	Sistema multipartículas en forma de microesferas.	Difusión de disolventes en cuas-emulsión	La combinación de EC y Eudragit S100 entregó la cantidad máxima de medicamento al colon.
Dextrometorfano	Dispersión sólida (formulaciones de alginato gelificante in situ modificado).	Evaporación del solvente	Dispersión sólida del fármaco Eudragit S100 para superar los problemas de descarga de dosis después de la ruptura de los geles de alginato dependientes del pH.
Péptido Val-Leu-Pro-Val-Pro-Arg (VLPVPR)	NPPs con recubrimiento entérico	Emulsión seguida de liofilización	NPPs casi completamente liberadas a pH 7.4 después de 8 h redujeron la presión arterial durante más de 30 h.
Flurbiprofeno	Microesferas	Emulsificación aceite/ aceite	Administración de medicamentos específicos para el colon.
Mebendazol	Cristales esféricos	Cambio de solvente	Cristales esféricos con propiedades micromeríticas mejoradas.

2.4 Polimerización por radicales libres

Una gran cantidad de polímeros son sintetizados a partir de la polimerización por radicales libres, entre los que destacan: el poliestireno, el poli(metacrilato de metilo), el poli(acetato de vinilo) y el polietileno ramificado. Esta técnica de polimerización involucra el uso de iniciadores, agentes de transferencia y catalizadores dependiendo de las características del producto que se deseen alcanzar. Debido a que se trata de reacciones altamente exotérmicas es muy importante tener un buen control de la disipación de calor [58].

La polimerización por radicales libres involucra 3 etapas características: iniciación, propagación y terminación. Mediante esta técnica se pueden alcanzar altos pesos moleculares, aún a porcentajes de conversión relativamente bajos [58],[59].

2.4.1 Etapas de la polimerización por radicales libres

1. <u>Iniciación</u>

La etapa de iniciación implica dos reacciones: en la primera se generan los radicales libres, por la ruptura homolítica de la molécula del iniciador utilizado (2.4-1) para dar lugar a la formación de los radicales primarios, mientras la segunda implica la adición de este radical a la primera molécula de monómero para producir el radical monomérico que estará al inicio de la cadena P^*_1 (2.4-2). La formación de los radicales primarios puede producirse por acción del calor o por acción fotoquímica [58],[59].

$$\text{INICIADOR} \xrightarrow{k_d} 2R^* \quad \text{- - - - - - - - - - - - - - - - -} \quad (2.4\text{-}1)$$

$$R^* + M \xrightarrow{k_i} MP^*_1 \quad \text{- - - - - - - - - - - - - - - - -} \quad (2.4\text{-}2)$$

Donde las constantes de velocidad k_d y k_i son constantes de descomposición e iniciación, respectivamente.

La velocidad de descomposición del iniciador normalmente sigue una cinética de primer orden y depende del disolvente y de la temperatura.

2. Propagación

La etapa de propagación consiste en el crecimiento de la cadena de polímero P^*_1 mediante reacciones de adición del radical monomérico (P^*_1) a otra molécula de monómero para formar un nuevo radical, P^*_2 (2.4-3); seguido por la adición sucesiva de moléculas de monómero disponibles en el medio de reacción hasta llegar a P^*_n [58],[59].

$$P^*_1 + M \xrightarrow{k_p} P^*_2 \quad \text{- - - - - - - - - - - - - - - - -} \quad (2.4\text{-}3)$$

$$P^*_2 + M \xrightarrow{k_p} p^*_3 \quad \text{- - - - - - - - - - - - - - - - - -} \quad (2.4\text{-}4)$$

$$P^*_3 + nM \xrightarrow{k_p} p^*_n \quad \text{- - - - - - - - - - - - - - - - -} \quad (2.4\text{-}5)$$

Donde k_p es la constante de velocidad de las reacciones de propagación.

En esta etapa existen dos modos posibles de propagación: en la primera predomina la orientación cabeza-cola por cada adición de monómero, mientras que en la segunda predomina la orientación cabeza-cabeza y se presenta en ciertos polímeros que contienen principalmente flúor [59].

3. Terminación

La propagación continúa hasta que ocurre alguna reacción de terminación. Esta última etapa implica la desactivación de los radicales poliméricos, la cual ocurre por reacción biomolecular entre dichos radicales. Las dos principales formas de terminación son: por acoplamiento o combinación de radicales (2.4-6) y por desproporción (2.4-7), esta última involucra la transferencia de un átomo, generalmente hidrogeno, de la cola de una cadena a otra [59].

$$P^*_m + P^*_n \xrightarrow{k_{tc}} P_{m+n} \quad \text{- - - - - - - - - - - -} \quad (2.4\text{-}6)$$

$$P^*_m + P^*_n \xrightarrow{K_{td}} P_m + P_n \text{ - - - - - - - - - - - } (2.4\text{-}7)$$

Donde k_{tc} y k_{td} son las constantes de velocidad para cada reacción.

En la terminación por combinación o acoplamiento se obtiene una cadena de polímero con fragmentos de iniciador en ambos extremos, mientras que en la reacción de terminación por desproporción se obtienen dos cadenas de polímero. En este caso solo cuentan con el fragmento de iniciador en uno de los extremos y una de ellas queda con un doble enlace terminal en el otro extremo. Durante una polimerización se pueden dar los dos mecanismos de terminación juntos o solo uno de ellos [59].

2.5 Copolimerización por radicales libres

La polimerización simultánea de dos o más diferentes monómeros se denomina copolimerización y la cadena polimérica que contiene unidades de los diferentes tipos de monómeros se conoce como copolímero [58]. La determinación de la composición de copolimerización depende de la reactividad de los monómeros y esta misma determina la forma de adición y cantidad que se adiciona de cada monómero [59], [60].

El modelo cinético de copolimerización terminal o modelo de Markov de primer orden determina la composición de los copolímeros mediante una ecuación que involucra a dos tipos de especies en la etapa de propagación (M^*_1 y M^*_2). Suponiendo que la reactividad química de la especie en propagación depende únicamente del tipo de unidad monomérica al final de la cadena, se presentan cuatro posibilidades de la reacción de propagación [59],[60].

$$M^*_1 + M_1 \xrightarrow{k_{11}} M^*_1 \text{ ---------- (1)}$$

$$M^*_1 + M_2 \xrightarrow{k_{12}} M^*_2 \text{ ---------- (2)}$$

$$M^*_2 + M_1 \xrightarrow{k_{21}} M^*_1 \text{ ---------- (3)}$$

$$M^*_2 + M_2 \xrightarrow{k_{22}} M^*_2 \text{ ---------- (4)}$$

Donde k_{11} es la constante de velocidad de propagación para una cadena de polímero terminado en M_1 a la que se adiciona una unidad M_1; k_{12} es la cadena de propagación que termina en M_1 a la que se le adiciona una unidad de M_2 y así sucesivamente.

La propagación de un centro reactivo mediante la adición del mismo monómero, se denomina normalmente homopropagación (2.5-1) o autopropagación (2.5-3), mientras que la propagación de un centro reactivo mediante la adición de otro monómero se conoce como propagación cruzada (2.5-2 y 2.5-4). Las velocidades de desaparición de los dos monómeros, son sinónimo de sus velocidades de adición en el copolímero [59],[60].

La ecuación 2.5-5 se conoce como ecuación de composición del copolímero, donde $\mathrm{d[M_1]}$ /$\mathrm{d[M_2]}$, es la relación molar de las dos unidades monoméricas en el copolímero, en función de las concentraciones de ambos monómeros en la alimentación y de las razones de reactividad de los monómeros (r_1 y r_2) [59],[60].

$$\frac{\mathrm{d[M_1]}}{\mathrm{d[M_2]}} = \frac{[M_1]}{[\mathrm{M_2}]}\left(\frac{\mathrm{r_1[M_2][M_1]}}{\mathrm{[M_1]+r_2[M_2]}}\right) \text{ ---------(5)}$$

La ecuación 2.5-5 puede expresarse en términos de fracciones mol en lugar de concentraciones, dando lugar a la ecuación 2.5-6.

$$F_1 = \frac{r_1 f_1^2 + f_1 f_2}{r_1 f_1^2 + 2 f_1 f_2 + r_2 f_2^2} \text{ --------- (6)}$$

Donde $\mathrm{f_1}$ y $\mathrm{f_2}$ son las fracciones molares de los monómeros M_1 y M_2 en la alimentación, respectivamente, y F_1 es la fracción mol de M_1 en el copolímero [59],[60].

Para un determinado tipo de iniciación, las razones de reactividad de los monómeros y, por lo tanto, la ecuación de composición, son independientes de muchos de los parámetros de reacción [60].

2.5.1 Tipos de copolímeros

Dependiendo de los valores de las relaciones de reactividad r_1 y r_2 se pueden obtener distintos tipos de copolímeros [59],[61].

a) Copolimerización ideal, ocurre cuando $r_1r_2 = 1$, las dos especies propagantes, $M_1^{\cdot}$ y $M_2^{\cdot}$, muestran la misma preferencia para adicionarse a cualquiera de los monómeros, sin embargo r_1r_2 usualmente es menor que 1. La copolimerización al azar ocurre cuando $r_1 = r_2 = 1$, los dos monómeros muestran la misma reactividad hacia ambas especies $M_1^{\cdot}$ y $M_2^{\cdot}$.

b) Copolimerización alternada. Se presenta cuando $r_1 = r_2 = 0$, ambos monómeros se adicionan a la cadena en cantidades equimolares, alternando su acomodo a lo largo de la cadena, entonces la especie $M_1^{\cdot}$ sólo reacciona con M_2 y $M_2^{\cdot}$ solo reacciona con M_1.

c) Copolimerización en bloques. Ocurre cuando $r_1 > 1$ y $r_2 > 1$; el monómero M_1 reacciona con un radical M_1 formando bloques de este homopolímero y lo mismo ocurre con el monómero M_2. Posteriormente, ambos homopolímeros reaccionan entre sí, y forman copolímeros.

d) Copolimerización injertada. Tiene lugar cuando uno o más bloques del homopolímero M_1 se injertan como ramificaciones en una cadena principal del homopolímero M_2.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, en la Figura 2.5 se representan los tipos de copolímeros de acuerdo al acomodo de las unidades monoméricas durante la reacción [59],[61].

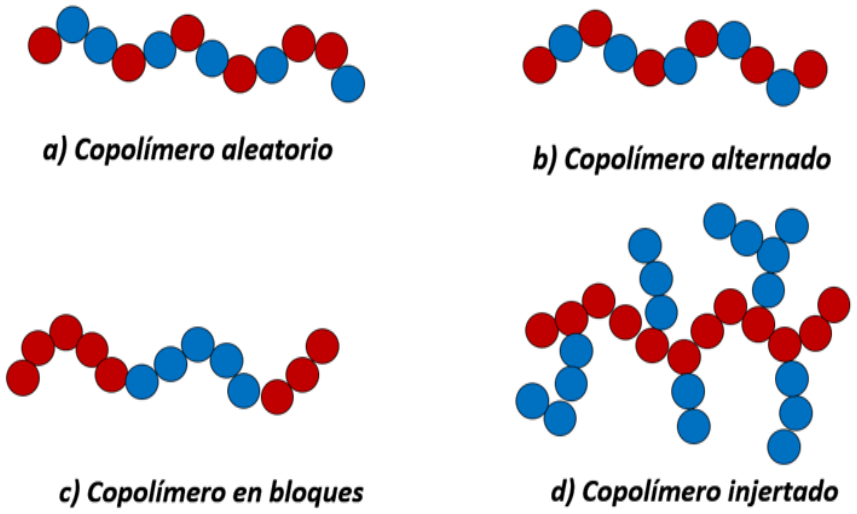


Figura 2.5 Tipos de copolímeros.

2.6 Polimerización en emulsión en semicontinuo

Las principales técnicas que se utilizan en la síntesis de polímeros por radicales libres se clasifican en homogéneas y heterogéneas. En el primer caso se tiene a la polimerización en masa y en solución, mientras que el segundo caso se tiene a la polimerización en suspensión y polimerización en emulsión [(59),(61)].

Entre las técnicas antes mencionadas la polimerización en emulsión es una de las más importantes a nivel industrial. Esta técnica es una de las más rápidas y eficientes para la preparación de NPPs dispersas en un medio continuo (principalmente agua). Además es fácilmente escalable, por lo que es frecuentemente utilizada en la obtención de poli(acetato de vinilo), policloropreno, polimetacrilatos, poli(cloruro de vinilo) y poliacrilamida, así como varios tipos de copolímeros [(59)].

Los principales componentes que este sistema de polimerizaciones son el(los) monómero(s), el medio dispersante, uno o varios surfactantes y un iniciador. El medio dispersante es usualmente agua, en el cual los monómeros son dispersados y estabilizados en forma de gotas y micelas con la ayuda de un surfactante. La acción del surfactante propicia la formación de micelas cuando se

tiene un exceso en la concentración que sobrepasa la concentración micelar critica (CMC). En este punto, el sistema en solución se transforma en un estado coloidal bajo una agitación moderada donde se da la formación de sitios activos de polimerización (micelas) [(58),(59)].

En la polimerización en emulsión en semicontinuo, los componentes de la formulación se agregan en dos corrientes distintas, es decir separadamente, una parte de la formulación se agrega al inicio de la reacción, y mientras que la otra se suministra durante el curso de la polimerización. Aunque existen múltiples formas de adicionar el(los) monómero(s) y surfactante(s) al medio de reacción, se debe tener cuidado con la forma de adición del surfactante, ya que éste nos ayudará a determinar el tamaño de partícula y la estabilidad coloidal del látex final. Por lo general, siempre se debe de adicionar el iniciador en forma continua al reactor [(59),(61)].

Industrialmente, se emplea entre el 5 y el 10 % del total de monómero en la carga inicial (siembra de semilla), esto se hace con la finalidad de controlar el tamaño de partícula y su distribución, mientras que la adición del resto de monómero tiene como objetivo hacer crecer la semilla. Sin embargo, si la concentración de surfactante es muy alta o el número de partículas es muy baja durante la siembra, se pueden generar nuevas partículas (nucleación secundaría) [(61)].

El monómero puede adicionarse esencialmente a dos velocidades diferentes durante la reacción de polimerización en semicontinuo. Krackeler y Naidus [(62)], introdujeron el concepto de condiciones de falta de monómero durante el período de adición de monómero para explicar el aumento de número de partículas (N_p) a medida que disminuye la tasa de adición de monómero, empleando la teoría de Smith y Ewart [(63)]. Según esta teoría, durante el período de nucleación, N_p es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento en volumen de la partícula de polímero. Cuando las partículas se saturan con monómero en las llamadas condiciones de inundación de monómeros, crecen a su velocidad máxima y se produce la nucleación mínima de partículas. Por el contrario, cuando la

concentración de monómero en las partículas está por debajo de la saturación, es decir, en condiciones de falta de monómero, la velocidad de crecimiento de las partículas se ralentiza, lo que conduce a un aumento de N_p, y la velocidad de polimerización es controlada directamente por la velocidad de adición del monómero. Las condiciones de falta de monómero se logran dosificando el monómero a una velocidad menor que la velocidad de polimerización. Por tanto, cuanto menor es la tasa de dosificación de monómero, menor es la concentración de monómero dentro de las partículas y, como consecuencia, el N_p se vuelve mayor [63].

2.7 Polimerización en heterofase en semicontinuo

Actualmente, en el desarrollo NPPs se requieren tamaños más reducidos y distribuciones más angostas que las generalmente obtenidas en el proceso de emulsión, a partir de estas consideraciones, surge la técnica de Polimerización en Heterofase en Semicontinuo, conocida por sus siglas en inglés como SHP (Semicontinuos Heterophase Polymerization) [64]. Esta técnica consiste básicamente en la dosificación constante de un monómero hidrófobo (o mezcla de monómeros) en una solución micelar que contiene uno o varios surfactantes y un iniciador hidrosoluble. Cuando la velocidad de dosificación de monómero es lo suficientemente lenta, permite la formación de nuevas partículas, en vez de difundirse en las ya existentes para seguir reaccionando, obteniéndose de esta manera una distribución de tamaños más homogénea. La técnica SHP permite obtener látex con un alto contenido de polímero y pequeñas concentraciones de surfactante, pero también, la preparación de copolímeros con composición homogénea a lo largo de la reacción [64].

Esquivel *et al.*, reportaron la obtención de NPs porosas de poliestireno con una distribución de tamaño de partícula angosta al emplear la técnica SHP, así mismo, obtuvieron diámetros de partícula de 20 a 30 nm y poros que oscilaban entre los 6

a 8 nm de diámetro, al utilizar dodecilsulfato de sodio (surfactante) y persulfato de amonio (iniciador) [65].

En otro estudio, realizado por Pérez *et al.*, donde se sintetizó poli(metacrilato de metilo) y poli(metacrilato de hexilo), se reportan muestras de látex con un alto contenido de NPPs. Ellos observaron que al disminuir la velocidad de dosificación de monómeros, también disminuían el tamaño de las partículas y el peso molecular de los polímeros. Además, se observó que al incrementar las velocidades de dosificación de monómero se disminuye el grado de conversión instantáneo de la reacción [66].

Más recientemente, H. Saade *et al.*, reportaron la preparación de NPPs de poli(cianoacrilato de etilo) (PECA) con un Dp promedio de 40 mn cargadas con rifampicina. Se obtuvieron partículas con diámetro promedio menor que 40 nm [67]. Posteriormente, como ya se mencionó reportaron la elaboración de NPPs del copolímero poli(MMA-*co*-MAA) cargadas con ibuprofeno, así como un método para preparar NPPs del mismo copolímero con un Dp ultrapequeño de 10 nm [17],[18].

De acuerdo a lo presentado en la sección de antecedentes de este trabajo de investigación ha formulado la siguiente hipótesis: a pesar que la curcumina se conoce desde hace mucho tiempo, así como muchas de sus propiedades terapéuticas, este compuesto natural podría aumentar significativamente su eficiencia curativa si se incrementara su biodisponibilidad. Para ello, la nanotecnología podría aportar varias soluciones para resolver dicha problemática. En el presente trabajo se reporta por dos metodologías diferentes la incorporación de la curcumina en nanopartículas ultrapequeñas de un copolímero metacrílico reportado como biocompatible, tomando como base ambas metodologías la Polimerización en Heterofase en Semicontinuo, técnica reportada por primera vez por investigadores del CIQA.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Preparar nanopartículas del copolímero poli(metacrilato de metilo-*co*-ácido metacrílico) cargadas con curcumina.

3.2 Objetivos específicos

1. Obtención de NPPs cargadas con curcumina mediante la polimerización en heterofase con la adición semicontinua de una mezcla de metacrilato de metilo y ácido metacrílico con diferentes concentraciones de curcumina (cargado *in situ*).

2. Obtención de NPPs mediante la polimerización en heterofase con la adición semicontinua de una mezcla de metacrilato de metilo y ácido metacrílico y su posterior cargado con curcumina por un método de difusión/fisisorción en un sistema heterogéneo.

4. HIPÓTESIS

El cargado de curcumina en NPPs del copolímero poli(metacrilato de metilo-*co*-ácido metacrílico) es factible mediante la técnica de polimerización en heterofase, con la adición del monómero en semicontinuo, llevada a cabo en presencia de la curcumina en el medio de reacción (cargado *in situ*). El cargado de la curcumina en dichas NPPs también es posible en una etapa posterior a la reacción de polimerización, mediante un método de difusión/fisisorción en un sistema heterogéneo.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Reactivos

En las reacciones de polimerización se utilizaron metacrilato de metilo (MMA, 98%) y ácido metacrílico (MAA, 99%) como monómeros; dodecilsulfato de sodio (SDS, 98.5%) y bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT, 96%) como surfactantes; y persulfato de amonio (APS, 99.9%) como iniciador. Para el cargado de las NPPs se empleó curcumina (≥94% contenido de curcuminoides y ≥80% de curcumina). Todas las sustancias fueron adquiridas de Sigma-Aldrich. A excepción de los monómeros, a los que les fue retirado el inhibidor por medio de una columna empacada con resina removedora de inhibidores, el resto de los reactivos se utilizaron tal y como fueron recibidos. En las polimerizaciones se empleó agua desionizada (0.055 μS/cm) obtenida de un equipo mili-Q. El diclorometano (DCM, 99.5% con 50 ppm de amileno como estabilizador) fue adquirido también de Sigma-Aldrich. Para la caracterización de las partículas cargadas por espectroscopia de UV-vis se utilizó etanol absoluto. Para llevar a cabo la diálisis del látex se utilizó una membrana de celulosa MC24X100 CLR adquirida por Sigma-Aldrich. El argón de ultra alta pureza fue adquirido de INFRA.

5.2 Equipo.

En este subcapítulo se describen los equipos de reacción utilizados para ambas metodologías de cargado de curcumina en las NPPs.

5.2.1 Cargado *in situ* de curcumina durante la polimerización

Las reacciones de polimerización (SHP) en condiciones de avidez de monómero se llevaron a cabo en un sistema de reacción como el representado en la Figura 5.1. Este sistema consistió en un reactor de vidrio enchaquetado de 100

mL con tapa de 4 bocas. En una de las bocas se hizo pasar una corriente de argón; en otra boca se conectó un sistema de reflujo; en otra boca se insertó a través de un tapón de caucho la aguja para la dosificación de la mezcla de monómeros con la curcumina presente en dicha solución y, finalmente, en la boca central se insertó una varilla de teflón con una propela con configuración de media luna, para mantener la mezcla en agitación. La temperatura de reacción se controló por medio de un baño de recirculación POLYSCIENCE, mientras que la agitación del sistema, se mantuvo constante con la ayuda de un motor mecánico (IKA laboratechnik) con indicador digital. Para la dosificación de la mezcla de monómeros y curcumina se utilizó una bomba de infusión (KDScientific) modelo 200, serie 19008.

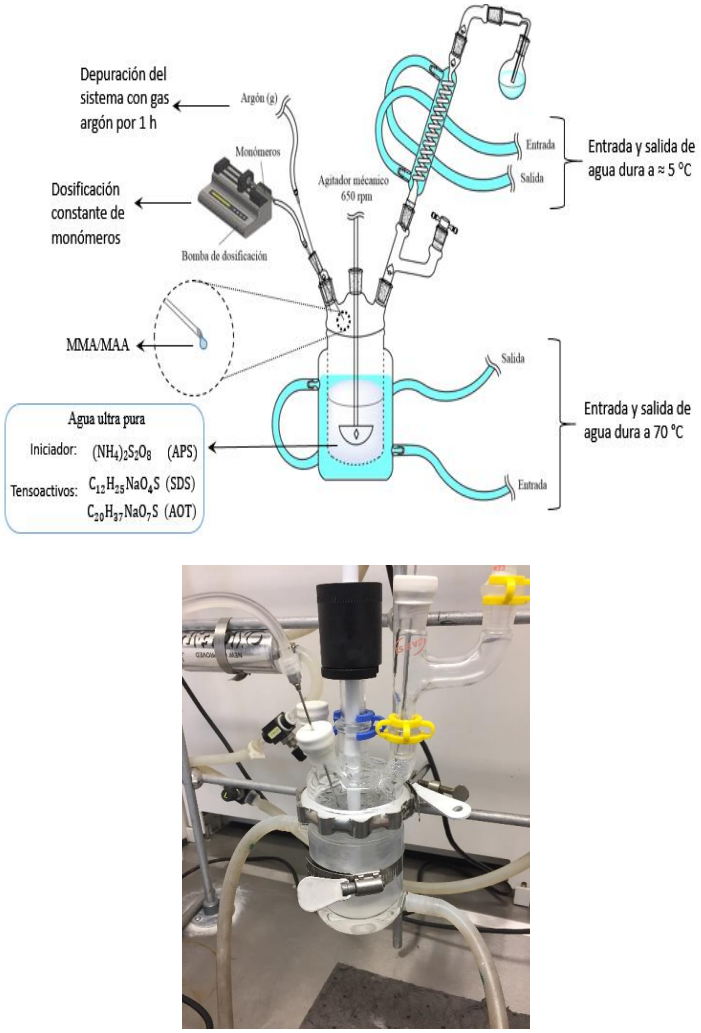


Figura 5.1 Sistema utilizado para llevar a cabo las polimerizaciones.

5.2.2 Cargado de curcumina por el método de difusión-fisisorción

El cargado de las NPPs (previamente obtenidas por SHP) con curcumina se realizó en un vaso de precipitado de vidrio de 600 mL, enchaquetado para mantener constante la temperatura. El vaso se colocó sobre una parrilla de agitación magnética (Cymarec) y la chaqueta se conectó a un baño de circulación de temperatura constante (Polystat). El sistema experimental se presenta en la Figura 5.2.

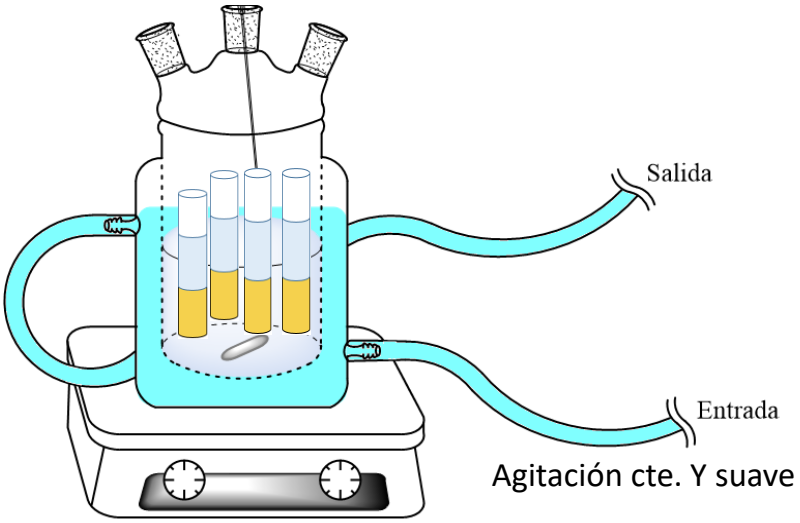


Figura 5.2 Sistema utilizado para el cargado por el método de difusión-fisisorción.

5.2.3 Equipos utilizados para preparación de muestras y caracterización

El diámetro de las NPPs se determinó por dispersión dinámica de luz (DLS) con un equipo Microtrac Nanotrac modelo Wave II Q.

La determinación de concentración de curcumina en las NPPs se llevó a cabo por medio de espectroscopia UV-Vis en un equipo Shimadzu modelo UV-2401PC.

La composición de los copolímeros en los sistemas desarrollados se determinaron por medio de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de

protón (^{1}H NMR), donde las diversas muestras fueron analizadas en un espectrómetro Bruker-400 MHz.

Las propiedades térmicas de los materiales, específicamente su temperatura de transición vítrea (T_g), fueron determinadas por la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), en un equipo Discovery Series DSC/TGA (TA-Instruments).

La morfología de algunas de las NPPs obtenidas se evaluó mediante Microscopía Electronica de Transmisión (TEM) en un FEI, TITAN 80-300.

Otros equipos utilizados fueron: Centrífuga Allegra 64R Beckman Couter equipada con un rotor f1010; Ultrasonicador Qsonica de 700 Watts al 60% de potencia/intensidad, con punta de ½", utilizado para dispersar la curcumina en los monómeros; Medidor de pH manual digital Hanna Instruments HI 98107; Termómetro digital digi-sense J-T-E-K con termopar de acero inoxidable tipo T con un intervalo de temperatura de -250 °C a 400 °C y Liofilizador Labconco modelo FreeZone.

5.3 Metodología

5.3.1 Dispersión de la curcumina en la mezcla de monómeros

Para determinar cuánta curcumina se adicionaba al reactor durante la reacción de polimerización se determinó una curva de dosificación a diferentes concentraciones de curcumina (1, 3 y 5 % en peso). Primeramente, se pesó curcumina en un vaso de precipitados de 50 mL, después, en seguida, se pesaron los monómeros en el mismo vaso y se tapó el vaso con papel aluminio. Posteriormente, se colocó el vaso en un cristalizador de vidrio que contenía agua con hielo (para evitar que se elevara la temperatura de la mezcla de monómeros). Las mezclas fueron sonicadas a diferentes tiempos (5, 10 y 15 min) y se cargaron en la jeringa que sería utilizada para dosificar la mezcla de monómeros y

curcumina durante la reacción de polimerización. Se tomó el peso de la jeringa y se colocó en la bomba de dosificación; se accionó la bomba como si fuera a llevarse a cabo la reacción de polimerización, y se recuperó en charolas de aluminio lo dosificado a diferentes tiempos de adición (10, 20, 30, 45 y 60 min). Al finalizar los 60 min, la jeringa se volvió a pesar para determinar por diferencia de pesos la mezcla total agregada. Se permitió que el monómero se evaporara y se estimó por diferencia de pesos la cantidad de curcumina adicionada a diferentes tiempos.

5.3.2 Preparación de NPPs cargadas con curcumina mediante el método de cargado *in situ*

Las formulaciones utilizadas para la obtención de NPPs cargadas con curcumina se presentan en la Tabla 5.1. Se cargaron al reactor el agua, el iniciador y la mezcla de surfactantes en una relación de 3/1 (p/p). La solución se mantuvo bajo un flujo de argón por un periodo de 60 min, a temperatura ambiente y una agitación de 650 rpm. Pasado este tiempo, la temperatura se elevó a 70 °C y se inició la dosificación de la mezcla de monómeros, en una relación de 2/1 (mol/mol), que contenía diferentes cantidades de curcumina. La mezcla de monómeros y curcumina se preparó previamente, pesando las cantidades requeridas de curcumina y monómeros en un vaso de precipitado de 50 mL. La curcumina se dispersó con ayuda de energía de ultrasonido. La dosificación de esta mezcla se realizó con una bomba de infusión calibrada a un flujo de 12.4 mL/h para agregar un total de 12.6 g. Durante la polimerización se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar la conversión del monómero por gravimetría y diámetro de las partículas por DLS. Al finalizar el periodo de dosificación de la mezcla de monómeros, se permitió que la reacción continuara por 30 min adicionales para asegurar la conversión total del monómero. Los látex obtenidos se filtraron para separar la curcumina que se encontraba en forma de hojuelas flotando en la superficie del látex, o bien, adheridas a las paredes del reactor. Además, los látex fueron centrifugados a 10500 rpm durante una 1 h. Esto se hizo para sedimentar la curcumina que no estuviera incorporada en las NPPs.

Durante la experimentación se varió, además de la concentración de curcumina, el tiempo de sonicación de la solución para dispersar la curcumina en los monómeros antes de ser agregada a la reacción.

Tabla 5. 1 Formulaciones empleadas en la síntesis de NPPs cargadas con curcumina mediante el método de cargado *in situ*

Reactivos	Obtención de las NPPs			
	Fase acuosa	Fase dispersa (formulación 1)	Fase dispersa (formulación 2)	Fase dispersa (formulación 3)
Agua	93.1 g	-	-	-
Persulfato de amonio (APS)	0.1 g	-	-	-
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	0.7 g	-	-	-
Bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato sódico (AOT)	0.09 g	-	-	-
Metacrilato de metilo (MMA)	-	10.4 g	10.18 g	10.32 g
Ácido metacrílico (MAA)	-	4.45 g	4.37 g	4.43 g
Curcumina	-	0.15 g	0.45 g	0.75 g

5.3.3 Diálisis de los látex para eliminación de surfactante

La diálisis de los látex que serían utilizados para realizar el cargado por el método de difusión-fisisorción se llevó a cabo para retirar el surfactante utilizado durante la polimerización. Para esto, se utilizaron membranas para diálisis, las cuales fueron sumergidas en agua desionizada durante 10 min, para su hidratación. Posteriormente, se prepararon soluciones de los látex al 5 % en peso y se pesaron entre 10-12 g de los mismos para llenar las membranas, luego se colocaron en una cubeta con agua desionizada a temperatura ambiente. La diálisis de los látex tuvo una duración de 1-2 semanas; durante este tiempo se reemplazó el agua desionizada cada 12 h y se tomó un registro de la variación en la conductividad eléctrica del agua de diálisis. La prueba finalizó cuando ya no se observaron variaciones en la conductividad eléctrica. Al terminar la diálisis, el látex

se filtró y se determinó el contenido de sólidos para ajustarlo, mediante dilución con agua desionizada, a un contenido de sólidos del 1 % en peso. A esta disolución resultante se le midió el pH y el diámetro de partícula.

5.3.4 Cargado de NPPs con curcumina por el método de difusión-fisisorción

Las NPPs libres de curcumina se obtuvieron siguiendo exactamente el mismo procedimiento detallado en la sección anterior, pero en ausencia de la curcumina, seguido de una etapa de diálisis. El látex dializado, cuyo contenido de sólidos fue determinado al terminar el proceso de diálisis, se diluyó con agua desionizada hasta llevar la concentración de NPPs al 1 % en peso. Por otra parte, se preparó una solución de curcumina en DCM al 0.1 % en peso. Para el cargado se colocaron en viales de vidrio de 40 mL, 30 mL de la solución de curcumina y 10 mL del látex; se agregó un pequeño magneto a cada vial y se taparon con papel aluminio al que se hicieron perforaciones con una aguja, para permitir que el DCM se evaporara lentamente. Los viales fueron introducidos a un vaso de vidrio enchaquetado que contenía agua, el mismo se colocó sobre una parrilla de calentamiento a 35 °C, con agitación suave. Los viales se dejaron en esas condiciones hasta que el DCM se evaporó por completo. El látex cargado se filtró para eliminar las hojuelas de curcumina que no fue adsorbida sobre la superficie de las NPPs. El cargado se llevó a cabo por un proceso de difusión de las moléculas de curcumina de la fase orgánica a la fase acuosa y su posterior fisisorción sobre la superficie de las NPPs presentes en el látex.

5.4 Caracterización.

5.4.1 Determinación del tamaño de partícula

El diámetro promedio de partícula se determinó por DLS. El equipo Microtrac se programó para realizar 7 mediciones por cada muestra analizada. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C, se colocaron en viales dos gotas del látex (≈ 0.04 g) y se diluyeron en 4 mL de agua desionizada.

5.4.2 Cuantificación de contenido de curcumina en el látex

Para determinar el contenido de curcumina en las NPPs, se preparó una curva de calibración de curcumina en una mezcla etanol-agua 9:1 (p/p). En la Figura 5.3 se presenta la curva de calibración utilizada para determinar el contenido de curcumina en los látex.

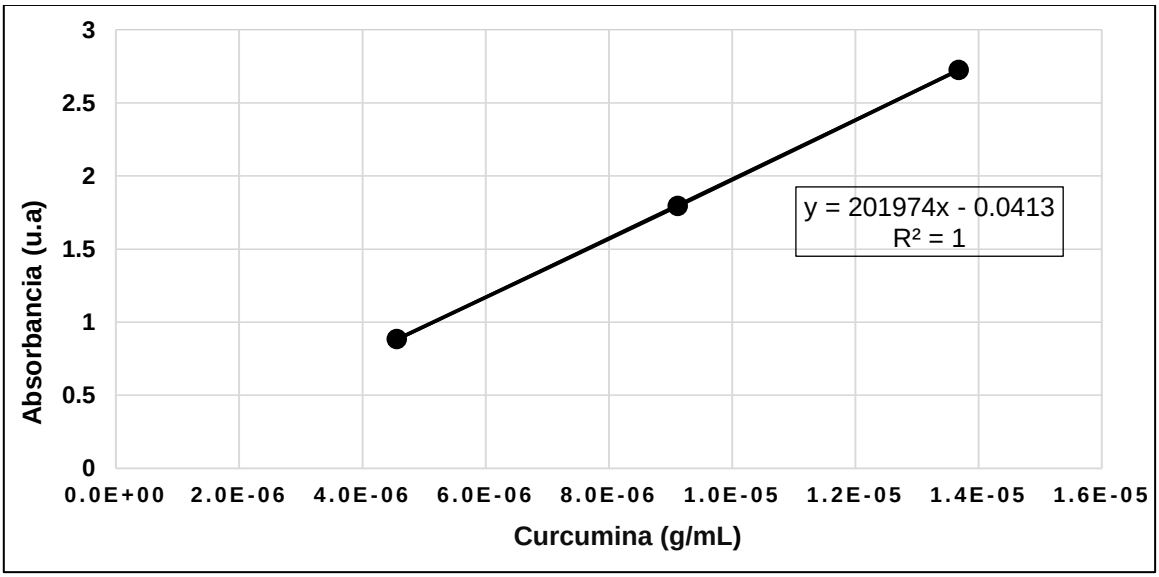


Figura 5.3 Curva de calibración UV-vis para la determinación de contenido de curcumina.

5.4.3 Determinación de la composición de los copolímeros en las NPPs cargadas

La composición de los copolímeros (contenido de MMA vs MAA) en los sistemas desarrollados se determinaron por medio de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protón (^{1}H NMR). Aproximadamente 30 mg de cada muestra (previamente aislada del látex y secada hasta peso constante) fueron disueltos en 0.5 mL de DMSO-d6. Posteriormente las disoluciones fueron trasvasadas a bubos de cuarzo de 5 mm de diámetro para ser analizadas en el equipo, a temperatura ambiente y durante 16 scans.

5.4.4 Determinación de las propiedades térmicas de las NPPs cargadas con curcumina

La T_g de los copolímeros, tanto del sistema libre de curcumina como de los sistemas cargados con curcumina se determinó por la técnica del DSC. Se pesaron aproximadamente 7 mg de cada muestra en las pequeñas charolas de aluminio específicas para este tipo de análisis. Se sellaron las charolas y se analizaron en el equipo desde temperatura ambiente hasta 200 °C y a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. El segundo calentamiento es para eliminar el historial térmico de la muestra. La T_g se determinó como el punto de inflexión en la curva de flujo de calor con el segundo ciclo de calentamiento.

5.4.5 Determinación del tamaño y morfología de las NPPs cargadas con curcumina

Algunas de las muestras obtenidas fueron seleccionadas para ser analizadas por TEM. Las muestras se prepararon de la siguiendo dos procedimientos,

tratando de tener una buena dispersión de las NPPs en las rejillas de cobre (lacey carbón). Se prepararon dos disoluciones una del látex cargado por el método de difusión-fisisorción y otra por el método del cargado *in situ;* para la primera muestra se preparó una solución de SDS al 1% pesando 0.5 g del compuesto en un matraz que se aforo a 50 mL de agua desionizada, posteriormente en un vial se pesaron 0.05 g (10% en peso) del látex y se le agregó 10 g de la solución de SDS, esta disolución se agitó durante 2 min para lograr una dispersión homogénea.

Para la segunda muestra se preparó una solución 0.1 M de ácido clorhídrico (37% en peso), en un matraz de 50 mL se agregó agua desionizada, posteriormente se agregaron 0.41 mL del ácido al matraz y se aforo. Seguidamente se tomó un vaso de precipitados de 250 mL en donde se agregó agua desionizada y 6 gotas de la solución preparada con la finalidad de bajar el pH del agua a 3.23. Después en un vial se pesaron 0.023 g (10% en peso) del látex (cargado *in situ*) y se le adicionaron 3 mL del agua desionizada (pH 3.23) al igual que la muestra 1 la solución se agito durante 2 min.

Posteriormente, para la tinción de las muestras se preparó una solución de ácido fosfotúngstico al 0.02% pesando 0.01 g del compuesto en un matraz y se aforo a 50 mL de agua desionizada, esto se realizó con la finalidad de brindar un mejor contraste y apreciación de las NPPs.

Para la preparación de muestras se tomó una rejilla de cobre, cual está cubierta con una película de carbono y se sumergió completamente en la dispersión de NPPs, se retiró y dejó secar durante un día, posteriormente se agregó una gota de la solución de ácido fosfotúngstico y se retiró el exceso con un trozo de papel filtro, finalmente se dejó secar por un día antes de la observación.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Preparación de NPPs de poli(MMA-*co*-MAA) cargadas con curcumina mediante el método de cargado *in situ*

Antes de llevar a cabo las reacciones de polimerización, se hicieron estudios para determinar el efecto del tiempo de sonicación sobre el grado de dispersión de la curcumina en la mezcla de monómeros, buscando una dispersión adecuada de la curcumina que no ocasionara inconvenientes al momento de inyectar la mezcla de monómeros al sistema de reacción. Algunas de las dispersiones preparadas se cargaron a la jeringa que se utilizaría para adicionar la mezcla de monómeros al reactor utilizando una bomba de infusión.

En la Figura 6.1 se presenta el perfil de adición de curcumina que se tuvo para cada una de las dispersiones. La bomba de infusión se calibró a 12.4 mL/h para dosificar un total de 12.6 g de las mezclas efectuadas, es importante aclarar que el valor de flujo para cada uno de los puntos de cada dispersión se calculó tomando en cuenta la cantidad de curcumina que se adicionó en la charola en el intervalo de tiempo entre muestra y muestra; dividiendo el peso de la curcumina contenida en la charola después de la evaporación de los monómeros entre el tiempo transcurrido al momento de tomar dicha muestra. Las líneas punteadas no representan el comportamiento del flujo entre puntos, solo se utilizan para facilitar la identificación de los puntos correspondientes a cada uno de los experimentos.

Debido a que las dispersiones contenían curcumina en exceso, se observó la sedimentación de curcumina en la jeringa durante la adición de la mezcla (60 min) para las mezclas a concentraciones del 3 y 5 % de curcumina. Como puede apreciarse, a la concentración del 1 % no se observó un efecto del tiempo de sonicación y el flujo se mantuvo prácticamente constante. Lo mismo ocurrió para la mezcla al 3 % de curcumina que se preparó con 5 min de sonicación. Sin embargo, el comportamiento del flujo cambió para la mezcla al 3% que se preparó con 10 min de sonicación, ya que el flujo se mantuvo constante en los primeros 45 min, pero fue mucho mayor en los últimos 15 min. Finalmente, para el caso de las

mezclas que se prepararon al 5% de curcumina las variaciones en el flujo fueron aún más pronunciadas. Para el caso de la mezcla preparada con 15 min de sonicación se llevó a cabo la repetición del experimento para comprobar que no se tratara de un error.

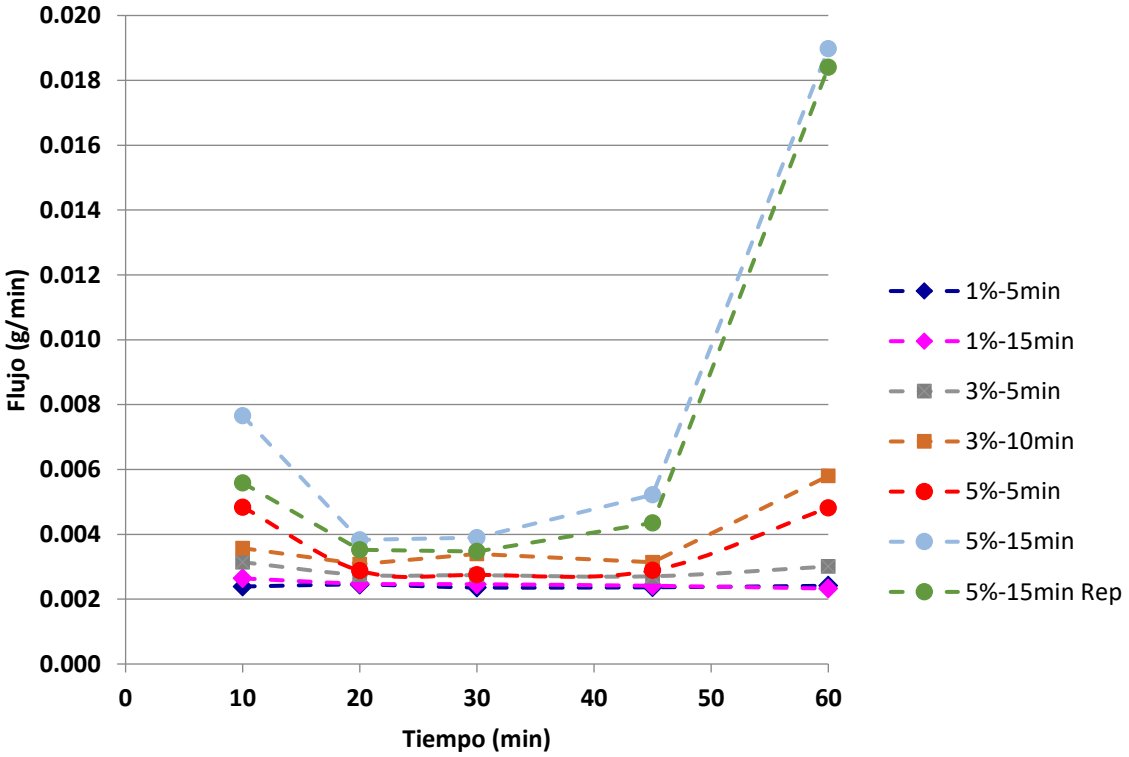


Figura 6. 1 Perfil de adición de curcumina para mezclas de los monómeros preparadas con diferentes concentraciones de curcumina y diferentes tiempos de sonicación.

La explicación que se propone para la variación en el flujo de adición de curcumina en las dispersiones más concentradas es la siguiente; desde el inicio de la adición las partículas de curcumina se fueron sedimentando en la jeringa de dosificación y la mezcla se fue clarificando. Esta es la razón por la que se observa una disminución en el flujo de curcumina. Al final, a pesar de la sedimentación, se adicionó una mezcla con una concentración mayor. En la Tabla 6.1 se muestra un estimado de la curcumina realmente agregada para las mezclas preparadas. La estimación de curcumina realmente adicionada al reactor durante la polimerización, se realizó tomando en cuenta la cantidad de curcumina empleada

en la dispersión de monómeros y la cantidad de curcumina recolectada en cada una de las charola después de la evaporación de la mezcla de monómeros durante el periodo de dosificación, para cada uno de los experimentos realizados.

Como puede verse, solamente en el caso de la mezcla de curcumina al 1 % se adiciona la cantidad deseada (100% de la curcumina empleada en la dispersión de monómeros. No obstante, los problemas de sedimentación que se observaron, se decidió continuar con el estudio de las polimerizaciones llevadas a cabo en presencia de la curcumina (cargado *in situ*), tomándose como base los datos de la Tabla 6.1 para estimar la eficiencia del cargado.

Tabla 6.1 Efecto de las condiciones de sonicación sobre la cantidad de curcumina realmente adicionada al reactor.

Curcumina empleada en la mezcla de monómeros (%)	Tiempo de sonicación (min)	Curcumina realmente agregada (%)	% de curcumina agregada
1%	5 min	1 %	100%
1%	15 min	1 %	100%
3%	5 min	1.3 %	43.3%
3%	10 min	1.7 %	56.6%
5%	5 min	1.6 %	32 %
5%	15 min	3.6 %	72%

Se llevaron a cabo una serie de polimerizaciones donde las dos variables de proceso estudiadas fueron: la concentración de curcumina en la mezcla de monómeros y el tiempo de sonicación de las mezclas preparadas, es decir, MMA/MAA/curcumina. Primeramente, se llevó a cabo la Polimerización en Heterofase en Semicontinuo (SHP) de la mezcla de monómeros MMA:MAA a una relación molar 2:1 y en ausencia de la curcumina (R1), reproduciendo la metodología previamente reportada por López *et al.* [18]. Posteriormente, se llevaron a cabo las reacciones SHP, exactamente de la misma manera que en R1, con la única variante de incorporar diferentes concentraciones de curcumina en la

mezcla de monómeros, al 1, 3 y 5 % en peso, para preparar NPPs cargadas con curcumina, lo que en el presente trabajo denominamos como cargado *in situ*. Esta metodología ya había sido reportada por nuestro grupo de trabajo para el cargado de ibuprofeno en NPPs del mismo copolímero metacrílico [17].

En total se llevaron a cabo 5 reacciones de polimerización vía SHP en presencia de curcumina, más la polimerización de referencia, y se demostró la factibilidad de la técnica para lograr el cargado *in situ* de este principio activo de alta hidrofobicidad en las NPPs del copolímero poli(MMA-*co*-MAA). En la Figura 6.2 se presenta la evolución de la conversión de monómero con respecto al tiempo de reacción para todas las polimerizaciones. La línea continua representa la conversión instantánea (conversión calculada tomando en cuenta el monómero adicionado al momento de tomar la muestra) y la línea punteada representa la conversión global (conversión calculada tomando en cuenta la cantidad total de monómero al final del periodo de adición). En la Tabla 6.2 se presenta la nomenclatura para estas 6 reacciones de polimerización, así como las variables estudiadas en cada una de ellas.

Tabla 6.2 Polimerizaciones SHP para preparar NPPs del copolímero poli(MMA-*co*-MAA) cargadas con curcumina mediante el método de cargado *in situ*.

Experimento	Curcumina (%)	Tiempo de sonicación (min)
R1	0	0
R2	1	2
R3	1	2
R4	3	10
R5	5	2
R6	5	10

Debido a que en las pruebas de dispersión de la curcumina no se notó un efecto significativo del tiempo de sonicación sobre la alimentación para la dispersión al 1 %, en la prueba de polimerización se utilizó un tiempo de sonicación de tan solo 2 min para llevar a cabo la primera reacción en presencia

de curcumina (R2). Lo anterior se decidió así para disminuir la potencial degradación de la curcumina. La polimerización procedió sin problemas y se obtuvo un látex estable sin formación de coágulos. Para comprobar la reproducibilidad del método se llevó a cabo una repetición de la polimerización la cual fue nombrada R3, la cual arrojó resultados similares a los obtenidos en R2. Después, en el experimento R4 se incrementó la concentración de curcumina al 3 % pero se utilizó un tiempo de sonicación de 10 min. Finalmente, se llevaron a cabo las polimerizaciones R5 y R6, en las cuales se utilizó una concentración de curcumina del 5 % y se varió el tiempo de sonicación a 2 y 10 min, respectivamente.

En la Figura 6.2 se observa que la reacción donde no se utilizó curcumina (R1) tiene una velocidad de reacción mayor, por lo cual se manifiesta que la curcumina, en cualquiera de las concentraciones empleadas, tuvo un efecto de retardación. El efecto de retardación se atribuyó a una interacción de la curcumina con el iniciador, el principio activo al inicio de la polimerización se encontraba mayormente disponible en el medio de reacción y a medida que la polimerización avanzaba se agotaba de la mezcla de monómeros, esto debido a la sedimentación que sufre durante la dosificación de la mezcla. Cuanto menor era la concentración de curcumina en el medio de reacción durante la polimerización mayor era la velocidad de reacción para cada una de las polimerizaciones efectuadas y por lo tanto, el efecto de retardación disminuía.

A pesar de dicho efecto de retardación, la conversión final del monómero fue mayor al 90 **%** en todos los casos y el contenido de sólidos varió entre el 12 y 13 % en peso; a diferencia de lo reportado por Saade *et al.*, ya que ellos observaron una conversión menor al 87.5%, la cual sugiere un posible efecto de dilución del monómero cuando el ibuprofeno está presente en el medio de reacción [17].

El comportamiento de las curvas, indica que no se alcanzaron las condiciones totalmente de avidez de monómero. Si así hubiera sido, la conversión instantánea debería estar por encima del 90 % desde etapas tempranas de la reacción así

como, tamaños de partícula mucho muy pequeños. No obstante lo anterior, se ha reportado que el copolímero obtenido bajo las mismas condiciones tiene una composición homogénea.

Tabla 6.3 Temperatura de transición vítrea para las NPPs del copolímero poli(MMA-*co*-MAA) cargadas con curcumina mediante el método de cargado *in situ*.

Experimento	T_g (°C)
R1	136.4
R2	139.6
R3	140.4
R4	138.1
R5	138.2
R6	139.8

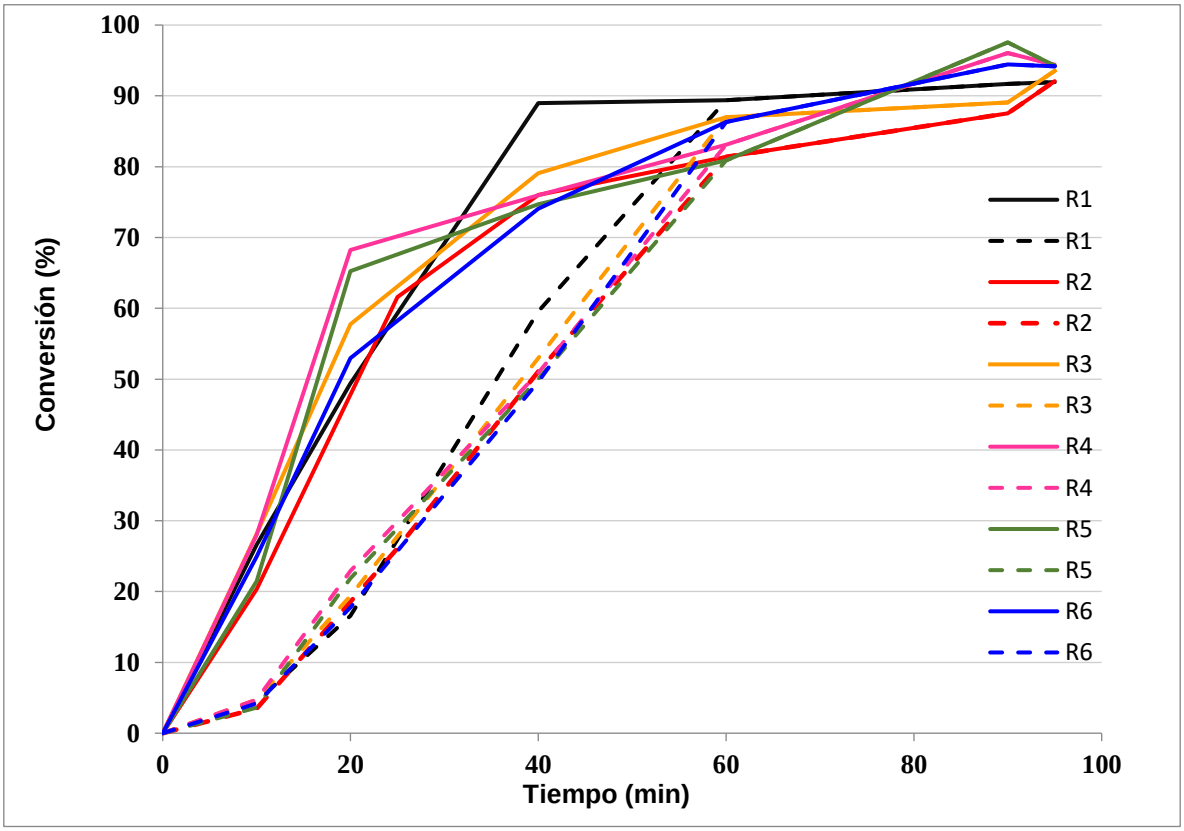


Figura 6.2 Efecto de la concentración de curcumina sobre la cinética de la polimerización.

Se realizaron análisis de DSC para descartar la presencia de homopolímeros de poli(MMA) y/o poli(MAA) en las diferentes reacciones llevadas a cabo, así como para visualizar el efecto sobre la T_g de la incorporación de la curcumina a diferentes concentraciones en las NPPs. En la Figura 6.3 se muestran los termogramas de DSC para los experimentos R1 y R6, es decir, el experimento llevado a cabo vías SHP en ausencia de la curcumina y el experimento ejecutado a partir de la mayor concentración de curcumina evaluada. El comportamiento de ambos termogramas coincide con lo previamente reportado por Saade *et al.*, es decir, para cada material solamente se observa un valor de T_g, (136.4 °C para R1 y 139.8 °C para R6) y la ausencia de endotermas adicionales indica que no se forman homopolímeros de poliMMA ni de poliMAA [18]. Además, el valor de T_g coincide con el reportado en la literatura para el Eudragit S100.

En la Tabla 6.3 se muestran todos los valores de T_g determinados para los diferentes experimentos de esta serie de cargados *in situ*. Se puede apreciar que no hay variación significativa en la T_g entre los 5 materiales con contienen curcumina, no importando el porcentaje inicial de ésta en las formulaciones, sin embargo, si existe un ligero corrimiento hacia mayores temperaturas para las muestras con curcumina en comparación con las NPPs de referencia (R1), lo cual puede atribuirse a una interacción electrostática entre la curcumina y el copolímero, efecto que pudo modificar el empaquetamiento de las cadenas del copolímero y aumentar la temperatura de transición vítrea.

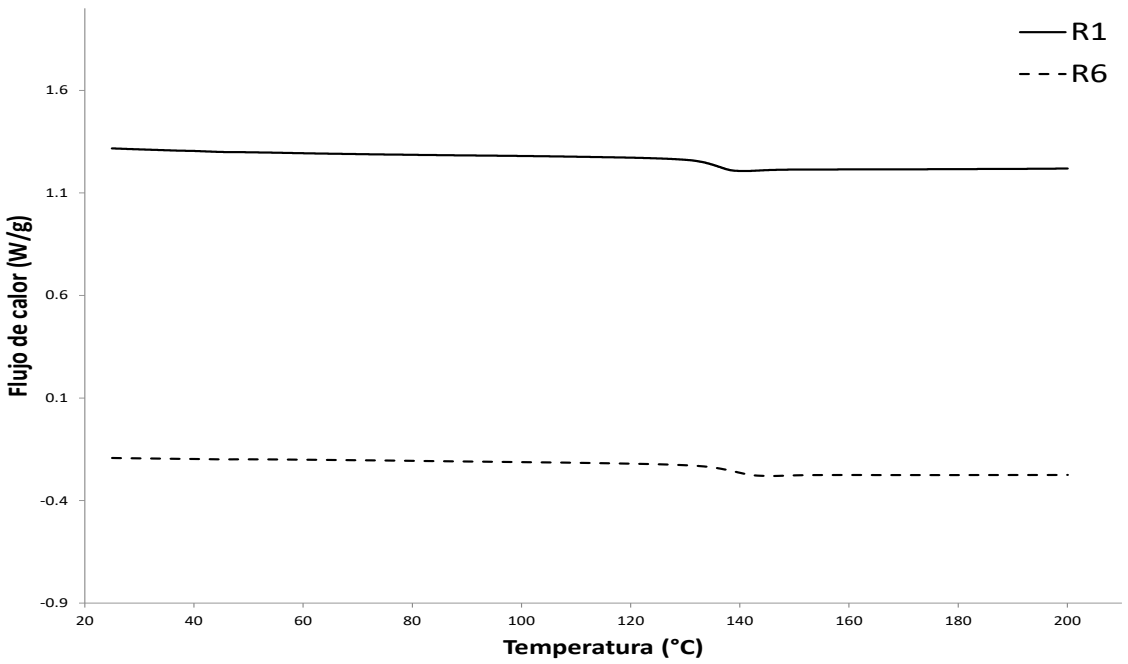


Figura 6.3 Termogramas de DSC para las muestras R1 (polimerización en ausencia de curcumina) y R6 (experimento con el mayor porcentaje de curcumina en la formulación inicial).

La alimentación de monómeros a las reacciones fue en una relación molar 2:1 de MMA/MAA, así que empleando la técnica de ^{1}H NMR se hizo un estimado de la composición final de ambos componentes en el copolímero para determinar si la presencia de la curcumina en las polimerizaciones afectaba en este sentido a la reacción de copolimerización. Las señales utilizadas para realizar los cálculos fueron la del grupo -COO<u>H</u> en el MAA (12 ppm) y la del grupo -COOC<u>H</u>$_3$ en el MMA (3.6 ppm) En la Tabla 6.4 se indican las composiciones de los copolímeros determinadas para esta serie de experimentos, en la cual se puede apreciar que todas las composiciones se encuentran dentro del porcentaje esperado de acuerdo a la alimentación de ambos monómeros. Adicionalmente, Saade *et al.* encontraron por espectroscopia de ^{13}C NMR que el copolímero a diferentes intervalos de conversión global, tiene una relación molar de MMA:MAA muy cercana a 2:1, relación molar similar a la alimentación; hecho que se apoya del resultado obtenido por DSC. Cabe mencionar que las copolimerizaciones realizadas en régimen semicontinuo en condiciones de avidez de monómero

permiten la síntesis de copolímeros homogéneos que tienen una composición similar a la de la mezcla de monómeros en la alimentación [(17),(18)].

Tabla 6.4 Composición de los copolímeros y porcentaje de curcumina para las NPPs obtenidas mediante el método de cargado *in situ*.

Experimento	*MMA* *(% mol)*	*MAA* (% mol)
R1	61	39
R2	61	39
R3	60	40
R4	62	38
R5	67	33
R6	68	32

De igual forma, esta técnica fue empleada para demostrar cualitativamente le presencia de curcumina en las NPPs. La molécula de la curcumina presenta protones aromáticos (ver Figura 2.2), los cuales no interfieren en las señales que presenta el copolímero poli(MMA-*co*-MAA), por lo que un empalme de espectros como el que se presenta en las Figuras 6.4 y 6.5 demuestra inequívocamente la presencia de la curcumina en las NNPs analizadas por ^{1}H NMR. En la Figura 6.4 muestran los espectros de los 6 materiales, en donde se puede apreciar la aparición de pequeñas señales en la región aromática del espectro, así como el incremento de estas señales conforme se fue aumentando el contenido de curcumina en la formación inicial. Para clarificar aún más la explicación de esta figura se enmarcó en color rojo las señales pertenecientes a los ^{1}H aromáticos de la curcumina en el producto del experimento R6, mientras que para el producto del experimento R1, el cual fue llevado a cabo en ausencia de la curcumina, no se observan señales en la región aromática del espectro, tal y como se esperaba. En la Figura 6.5 se presenta la superposición de ambos espectros, el de R1 y el de R6, pudiéndose claramente apreciar la presencia de protones aromáticos solamente en el espectro de R6.

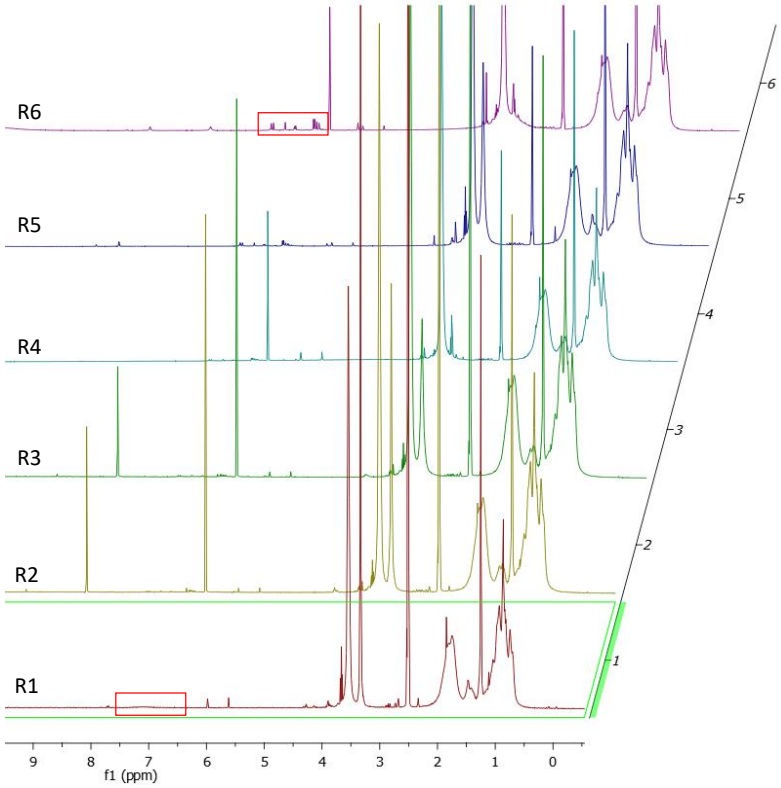


Figura 6.4 Espectros de ^{1}H NMR de las muestras R1, R2, R3, R4, R5 y R6.

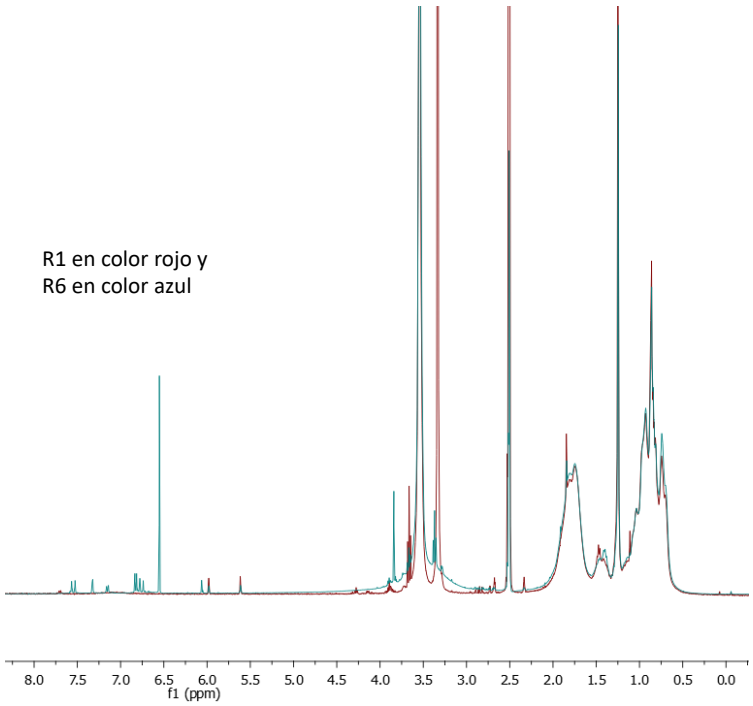


Figura 6.5 Espectros de ^{1}H NMR de las muestras R1 y R6.

En la Figura 6.6 se presenta la evolución del tamaño de partícula (D_p) con respecto a la conversión global del monómero. La disminución en el valor de D_p para la copolimerización donde no se agregó curcumina ya ha sido reportada y se atribuye a la nucleación continua durante el periodo de adición del monómero [17], [18]. En este sentido, Ledezma *et al.* llevaron a cabo para la polimerización del MMA vía SHP con la adición de monómero a diferentes flujos, observando que existe la nucleación continua de partículas y que éstas se estabilizan con las moléculas de tensoactivo, pero también con los grupos polares del MMA. Durante la polimerización, la mayor parte del monómero agregado fue para formar nuevas partículas y no para el hinchamiento y crecimiento de las existentes. La distribución del tamaño de las partículas fue estrecha porque la formación de nuevas partículas predominó sobre el hinchamiento y crecimiento de las existentes [64].

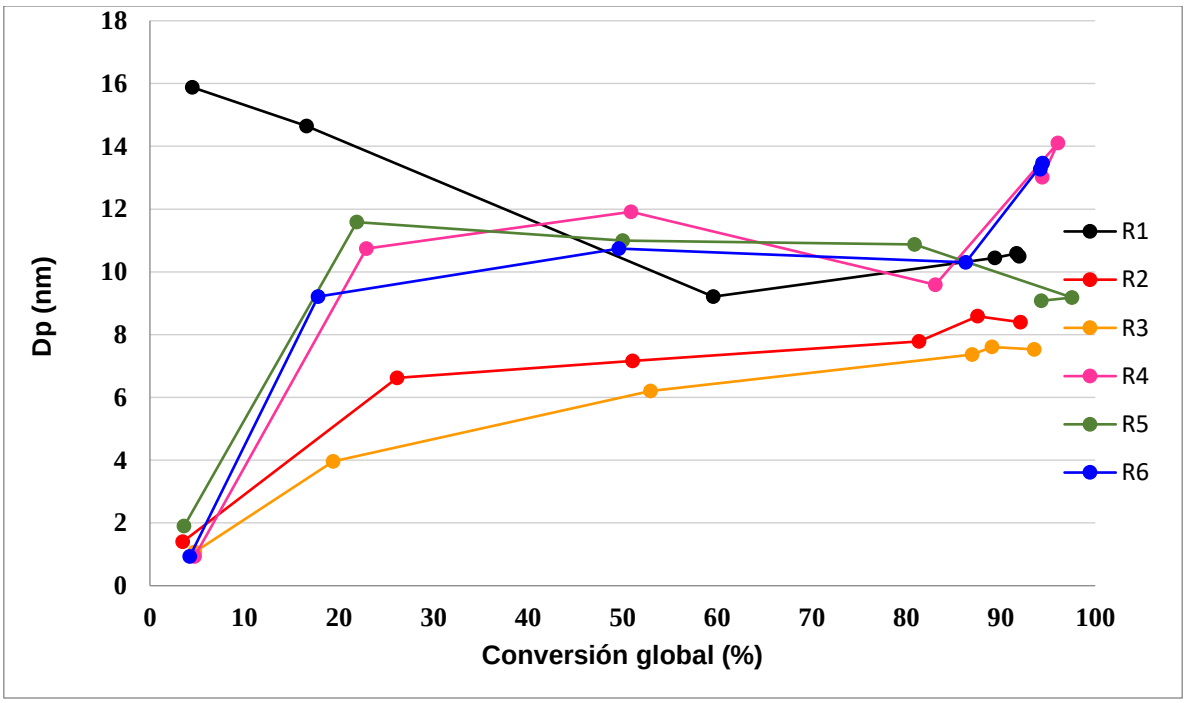


Figura 6.6 Efecto de la concentración de curcumina sobre el D_p con el avance de la polimerización.

De la Figura 6.6 se observa que para el caso de las polimerizaciones donde se utilizó curcumina, el valor de D_p incrementó durante la polimerización y este incremento fue más marcado al aumentar la concentración de curcumina. Los valores de D_p de las polimerizaciones con el 1% de curcumina resultaron inferiores a los reportados en la obtención de estas mismas NPPs cargadas con ibuprofeno (9.2 nm de diámetro promedio). Los D_p obtenidos son muy pequeños lo que puede ser favorable para las aplicaciones de suministro de fármacos, en donde muchas de las veces se requieren NPPs con D_p que tengan la capacidad de atravesar la pared del intestino y entrar al torrente sanguíneo.

Una vez finalizadas las reacciones de polimerización los látex se filtraron para eliminar residuos de curcumina que quedaron pegadas en las paredes del reactor o flotando en la superficie del látex. Todos los látex resultantes fueron coloidalmente estables y de un color amarillo cuya intensidad aumentaba con la concentración de curcumina en la formulación inicial de la reacción. La Figura 6.7 muestra una fotografía que evidencia claramente la estabilidad y alta coloración de los látex resultantes de los experimentos R2 a R6.

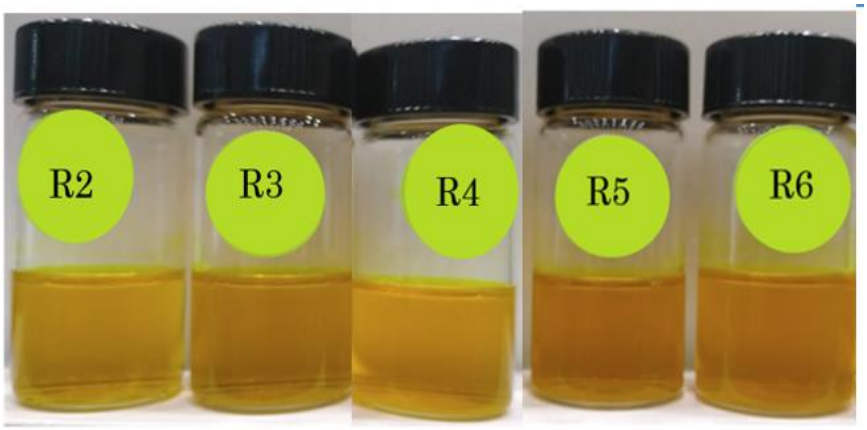


Figura 6.7 Látex obtenidos de las polimerizaciones en presencia de curcumina.

A todos los látex se les determinó el contenido de sólidos y la concentración de curcumina por espectroscopia de UV-vis. Estos valores se tomaron en cuenta para calcular la concentración del curcumina con respecto al polímero. En la Figura 6.8

se representa los resultados obtenidos para estos cálculos, mismos que indican una relación directa entre la concentración inicial de curcumina en la mezcla de monómeros y la concentración final de curcumina en el látex. En cuanto a la eficiencia de cargado, para hacer el cálculo se consideró la curcumina realmente agregada al reactor (ver Tabla 6.1). Así, se estimó una eficiencia promedio de 59 % para las polimerizaciones donde se utilizó una mezcla al 1 % de curcumina, 56 % cuando se utilizó 3 % de curcumina y, por último, 75 % cuando se utilizó una mezcla con 5 % de curcumina sonicada durante 2 min, disminuyendo drásticamente a 33% cuando la mezcla al 5 % de curcumina fue sonicada por 10 min.

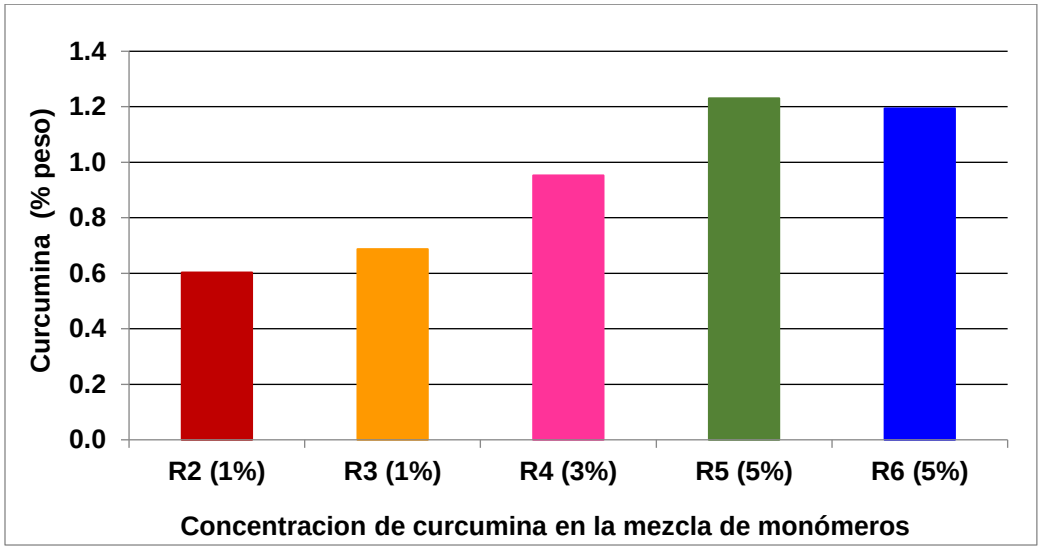


Figura 6.8 Concentración de curcumina con respecto al polímero en los látex obtenidos mediante el método de cargado *in situ*.

Estos resultados se pueden tomar como base para la realización de un estudio específico de esta metodología de cargado donde se busque la optimización de la eficiencia de cargado y maximizar el contenido del principio activo en el sistema NPP/curcumina, por ejemplo mediante mejoras en la alimentación de la solución a polimerizar logrando una dispersión más homogénea de la curcumina. Por lo pronto, se puede decir que las variables estudiadas en esta metodología, es decir, la concentración de curcumina en la mezcla de monómeros y el tiempo de sonicación para lograr su dispersión, tienen un efecto importante sobre la

eficiencia de cargado, logrando la obtención de sistemas NPP/curcumina con un contenido máximo de curcumina del 1.2 % en peso.

Al finalizar las reacciones de polimerización, también se les midió a los látex resultantes el pH, el cual variaba entre 3.5 y 5. Debido a que la solubilidad de la curcumina en agua es muy baja en medio ácido, se esperaría una baja concentración de curcumina en el látex. Sin embargo, se encontró que la concentración de curcumina en agua desionizada es de ≈ 3 mg/L [68]. En la Figura 6.9 se muestra la concentración de curcumina determinada para los diferentes látex que fueron preparados.

El incremento en la concentración de curcumina en el látex se puede atribuir a que el principio activo se encuentra incorporado en las NPPs. Diversos autores han encontrado que a través de las nano-preparaciones de curcumina, donde se emplean NPPs, liposomas, polietilenos, hidrogeles, etc., es posible incrementar la concentración de este principio activo. De esta manera, es posible aumentar su biodisponibilidad y aprovechar mejor sus propiedades medicinales [50].

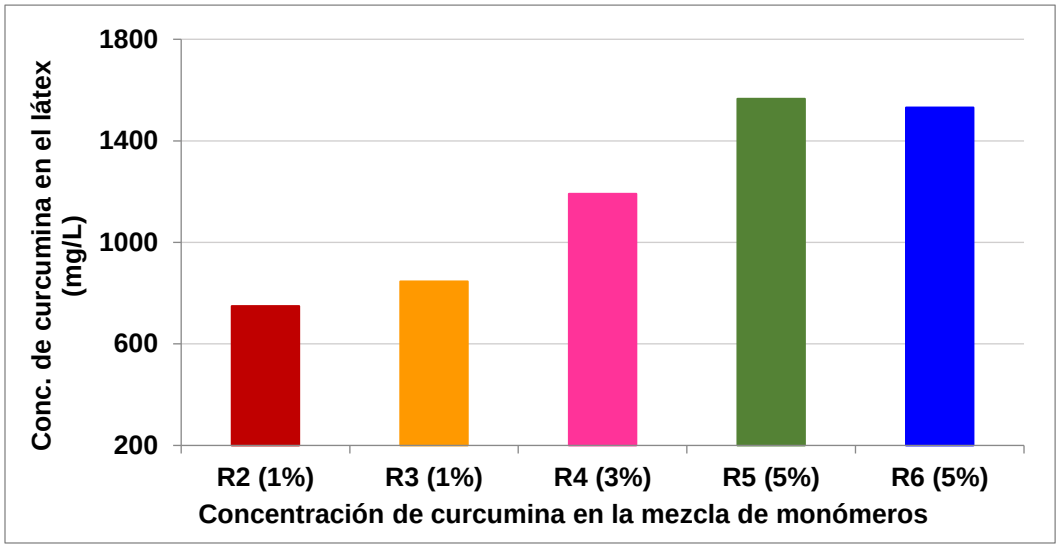


Figura 6.9 Concentración de la curcumina con respecto a los látex obtenidos mediante el método de cargado *in situ*.

Los látex de los experimentos R2 y R3 fueron dializados como parte de un estudio complementario para llevar a cabo pruebas de liberación de la curcumina a un pH regulado. Dicho experimento de liberación no es reportado en este trabajo, sin embargo, la diálisis de los látex arrojó resultados interesantes por discutir. El pH del látex antes y después de la diálisis fue de 3.5 a 5.6. En la Figura 6.10 se muestra la disminución en la cantidad de curcumina después del proceso de diálisis. Lo anterior puede haber ocurrido porque parte de la curcumina se difundió a través de la coraza de polímero. Tal como se espera que ocurra en las pruebas de liberación controlada.

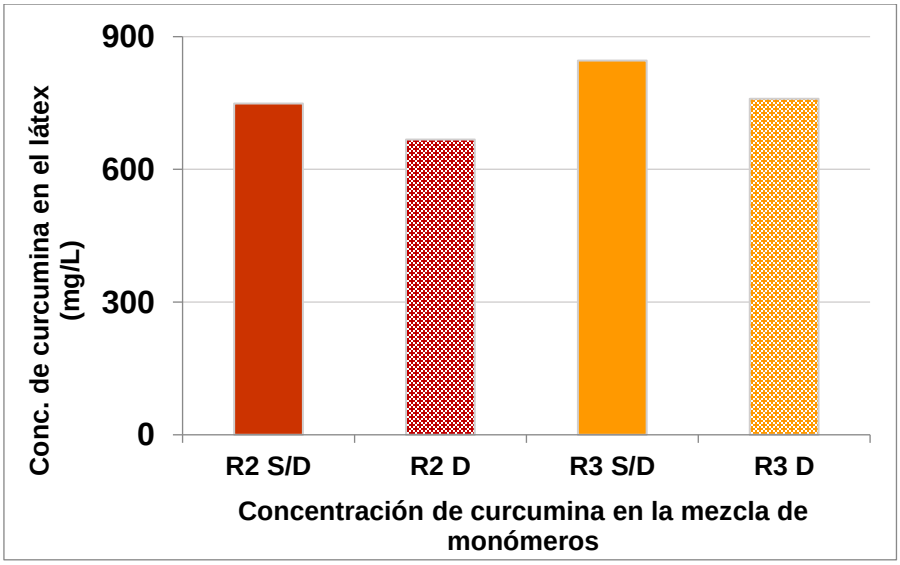


Figura 6.10 Disminución de la concentración de curcumina en el látex después del proceso de diálisis.

Como caracterización complementaria de las NPPs cargadas con curcumina obtenidas a partir de un cargado *in situ, se* presenta en la Figura 6.11 una micrografía de TEM correspondiente al producto del experimento R5, el cual fue llevado a cabo al 5% de curcumina inicial. En dicha micrografía se alcanzan a apreciar las NPPs dispersas en la rejilla de cobre, con tamaños de partícula que oscilan entre los 5 y 10 nm aproximadamente. Cabe resaltar que existe una concordancia en tamaño de partícula entre las técnicas de DLS y TEM, al menos

para esta muestra analizada. Con este resultado se corrobora la preparación de NPPs sub 15 nm, cargadas con curcumina, siendo que dichos tamaños de partícula pudieran resultar ventajosos por su tamaño ultrapequeño en numerables aplicaciones tanto médicas, como agrícolas o de otra área.

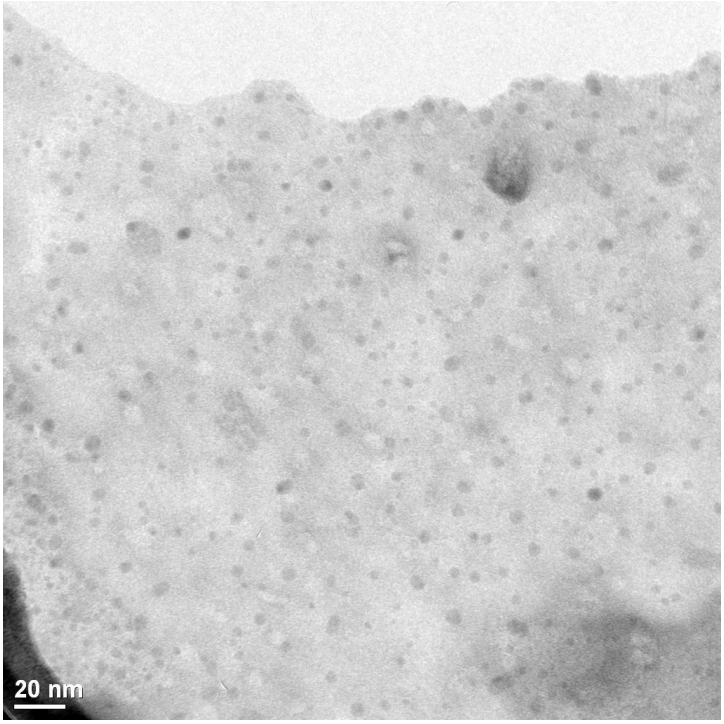


Figura 6.11 Micrografía de TEM de la muestra R5.

6.2 Preparación de NPPs de poli(MMA-*co*-MAA) cargadas con curcumina mediante el método de difusión-fisisorción

Para realizar las pruebas de cargado por este método se utilizó el látex obtenido a partir del experimento R1, en el cual donde se alimentó a la reacción la mezcla de monómeros MMA/MAA sin curcumina, por lo que el producto de la reacción son NPPs del copolímero poli(MMA-*co*-MAA) estabilizadas en el látex resultante. El látex fue dializado para eliminar el surfactante y posteriormente se hizo la dilución requerida para llevarlo al 1 % en peso. Antes de iniciar con el cargado de las

NPPs con la curcumina se determinó que el D_p del látex era de 19.7 nm y el pH de 3.8.

Debido a que aún no se cuenta con un sistema experimental donde se hayan optimizado las variables involucradas en este método de cargado, se optó por someter la misma muestra de látex a varios tratamientos de cargado, es decir, el mismo látex proveniente de R1 fue sometido a 6 etapas de cargado, bajo las mismas condiciones cada etapa, utilizando el látex resultante de cada etapa previa. Al terminar el primer cargado, el látex se filtró para eliminar el exceso de curcumina que había quedado en forma de grumos y fue caracterizado para determinar su contenido de sólidos, D_p y concentración de curcumina. Buscando incrementar la cantidad de curcumina que quedara adsorbida en la superficie de las NPPs, el látex fue utilizado para llevar a cabo el proceso de cargado otras 5 ocasiones. Los resultados de cada etapa de cargado son resumidos en la Tabla 6.5.

Durante el experimento se encontró que después de cada cargado, tanto el contenido de sólidos del látex como el valor del D_p aumentaban, lo cual se atribuye a que una pequeña cantidad de curcumina se iba adsorbiendo a la superficie de las NPPs después de cada cargado.

Tabla 6.5 Resultados de las diferentes etapas de cargado por el método de difusión-fisisorción.

No. Cargado	Sólidos (%)	D_p (nm)	pH
1°	1.00	21.4	5.01
2°	1.03	21.4	5.68
3°	1.29	21.5	4.61
4°	1.33	21.7	4.98
5°	1.37	22.3	5.22
6°	1.38	22.4	5.28

En la Figura 6.12 se presentan las curvas de cada uno de los cargados realizados, en esta figura se puede apreciar como el pico de máxima absorción de curcumina se vuelve más intenso con cada cargado (425-428 nm), esta variación de intensidad está directamente relacionada con la cantidad de curcumina depositada en la superficie de las NPPs [28].

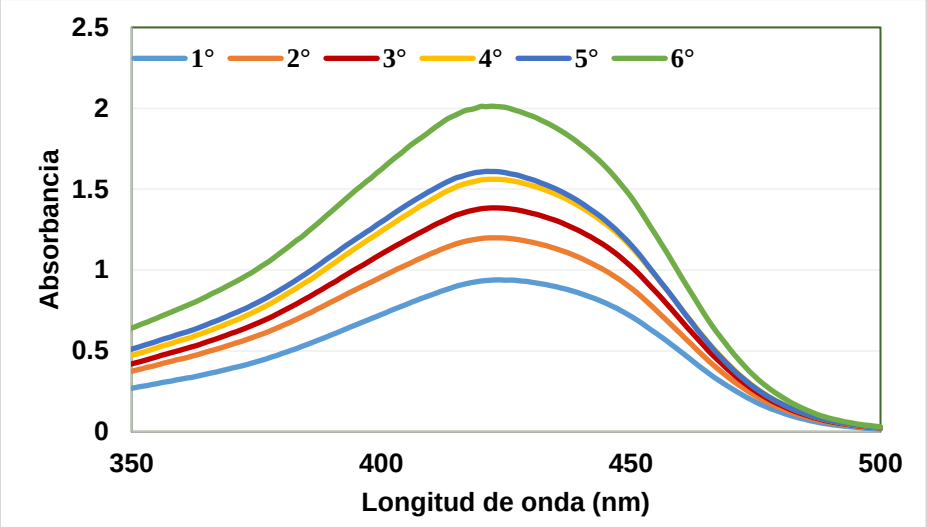


Figura 6.12 Curvas de absorbancia determinada por espectroscopia de UV-vis para las pruebas de cargado por el método de difusión-fisisorción.

En la figura 6.13 se muestra una fotografía de los látex obtenidos después de cada etapa de cargado. La fotografía muestra una evidencia visual de como la intensidad en la coloración amarillenta aumentaba ligeramente conforme se avanzaba en las etapas del cargado, señal inequívoca de un aumento en la concentración de la curcumina en el sistema.

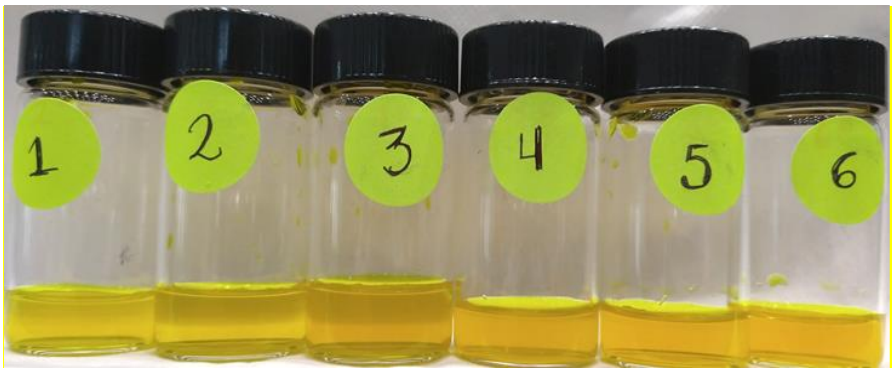


Figura 6.13 Látex obtenidos después del cargado por el método de difusión-fisisorción.

Los resultados obtenidos del cálculo de concentración de curcumina sobre el látex cargado se pueden observar en la Figura 6.14, es evidente que después de cada uno de estos cargados al látex la concentración de curcumina aumenta debido a que la misma se adhiriere y poco a poco empieza a saturar la superficie de las NPPs.

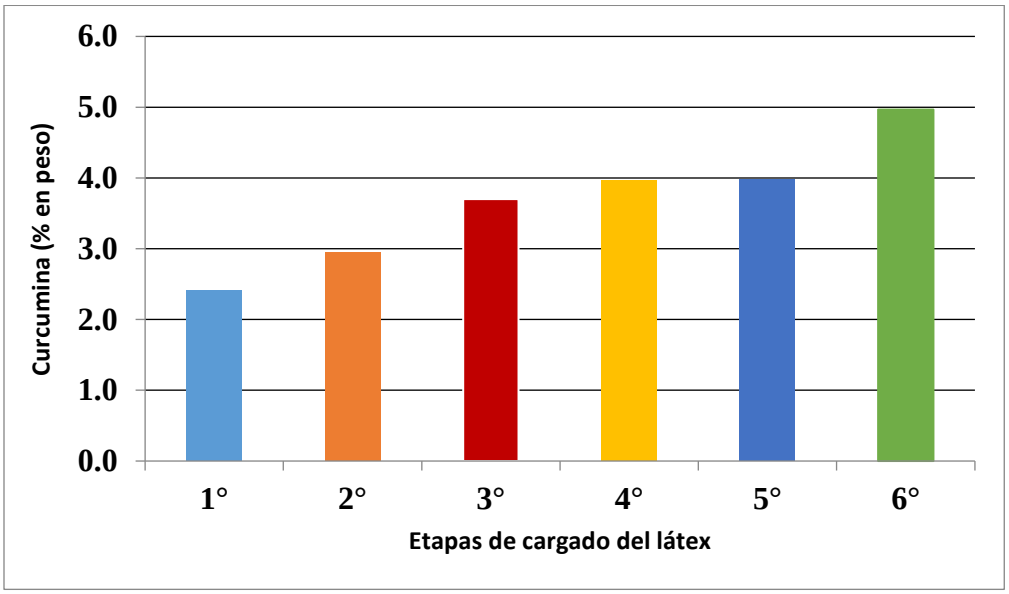


Figura 6.14 Concentración de curcumina con respecto a las NPP en los látex obtenidos mediante el método de difusión-fisisorción.

Al igual que en la primera metodología de cargado (*in situ*), en ésta se realizó el cálculo sobre incremento de la concentración de curcumina en agua, cuando esta se encuentra en la superficie de las NPPs, y se determinó que la concentración de curcumina aumentó hasta 450 mg/L al emplear la técnica de difusión–fisisorción

como técnica de cargado, ver Figura 6.15. La concentración alcanzada es inferior a la obtenida por la primer metodología, sin embargo se debe recordar que solo se realizó un total de 6 cargados sobre el látex al 1% en peso, por lo cual es posible que no se haya alcanzado a saturar completamente la superficie de las NPPs, por lo que es necesario realizar pruebas a diferentes concentraciones de látex para tener una mayor área superficial de partículas y de esta forma llegar al límite de adsorción superficial de las mismas, además se debe considerar una mayor cantidad de látex inicial debido a la evaporación del mismo.

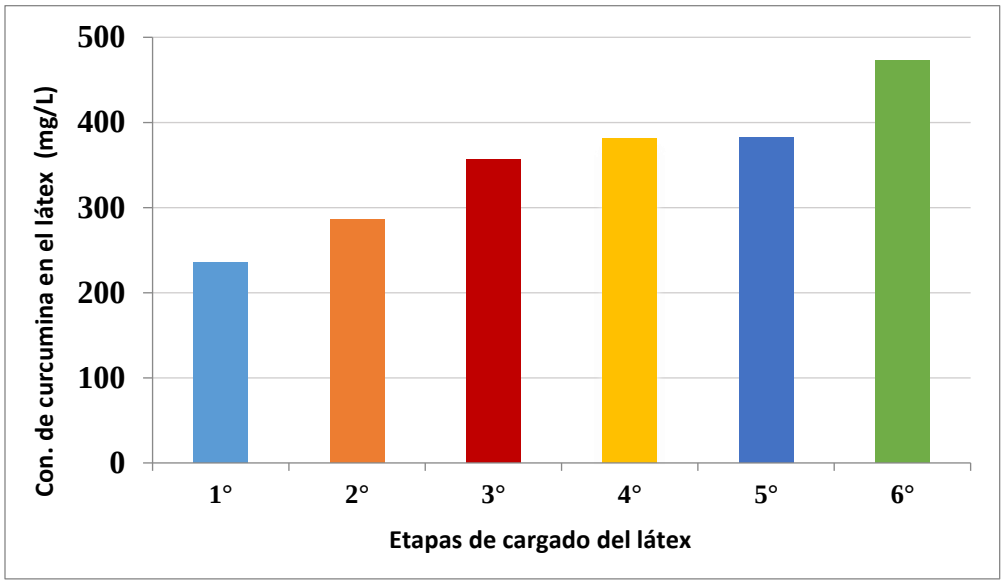


Figura 6.15 Concentración de la curcumina en el látex (cargado por difusión-fisisorción).

En la Figura 6.16 se muestra el termograma de DSC correspondiente a las NPPs después de la sexta etapa de cargado. De igual manera que con las muestras obtenidas por el cargado *in situ*, se observa una sola transición en 138.7 °C, la cual es asociada a la T_g del poli(MMA-co-MAA). El valor de la T_g encontrado en este análisis es el mismo que el reportado para los 6 lotes de NPPs cargadas con curcumina de manera *in situ*, por lo que se puede concluir que el método de cargado no presentó ninguna influencia en las propiedades térmicas de los materiales.

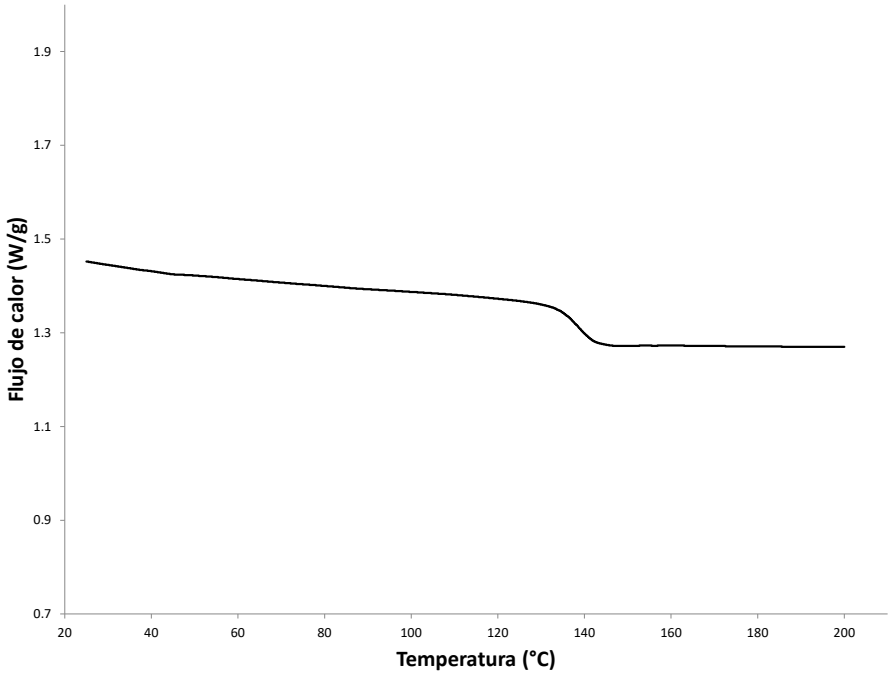


Figura 6.16 Termogramas de DSC para las NPPs cargadas con curcumina por el método de difusión-fisisorción.

En la Figura 6.17 se muestra el empalme de 2 espectros, el de color rojo pertenece a las NPPs libres de curcumina sintetizadas por un procedimiento típico de una SHP, mientras que el espectro de color azul son las mismas NPPs pero después de haber sido sometidas a 6 etapas de cargado por el método de difusión-fisisorción. En la Figura se puede observar claramente la presencia de señales correspondientes a los protonos aromáticos de la curcumina en el espectro azul, mientras que en el espectro rojo no se tienen estas señales, tal y como se esperaba esta comparación cualitativa. El resto de señales de los espectros corresponden al copolímero, a monómero residual, trazas de humedad y al solvente utilizado para el análisis.

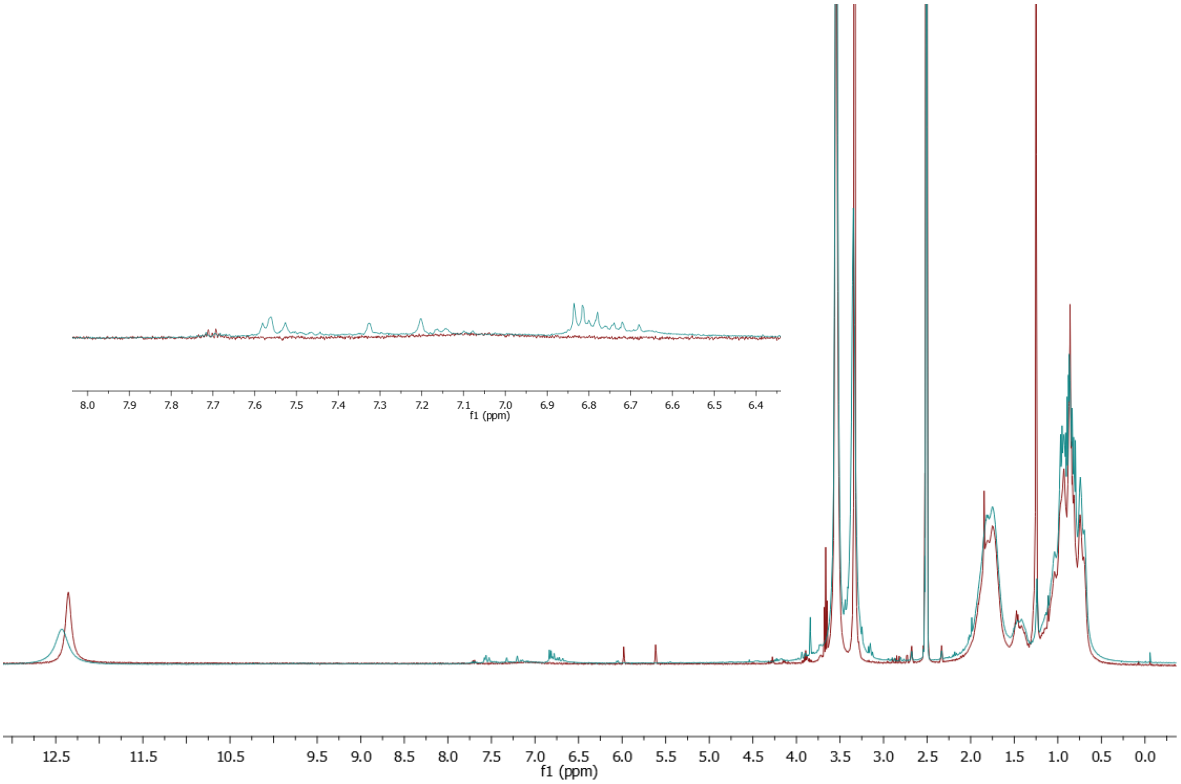


Figura 6.17 Espectros de ^{1}H NMR para las NPPs cargadas con curcumina por el método de difusión-fisisorción, comparación con las NPPs antes del cargado.

Estas NPPs cargadas con curcumina también fueron analizadas por TEM. En la Figura 6.18 se muestra una micrografía correspondiente a este análisis, en la cual se puede observar la presencia de las NPPs dispersas en la rejilla, con tamaños de partícula por debajo de los 15 nm, corroborando la preparación por esta metodología de sistemas poliméricos nanométricos cargados con curcumina.

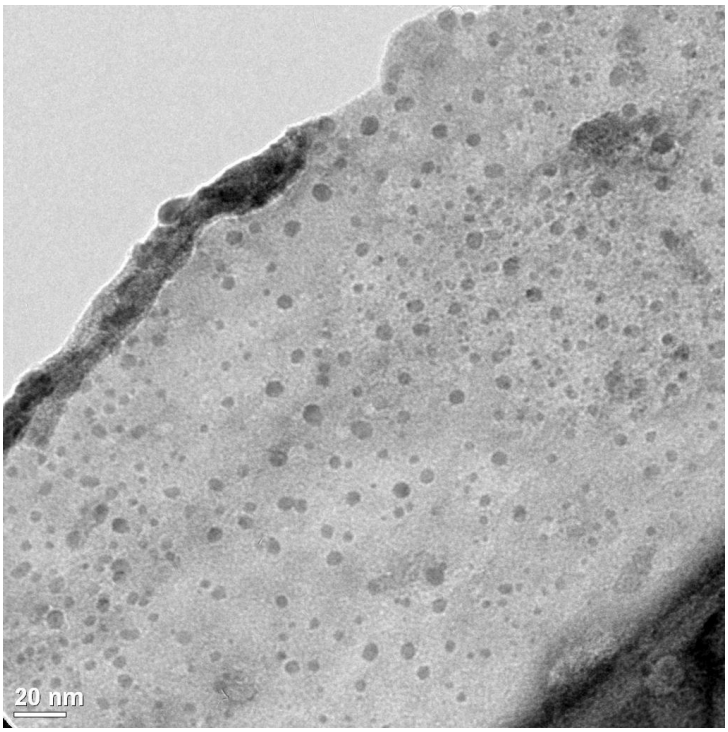


Figura 6.18 Micrografía de TEM para las NPPs cargadas con curcumina por el método de difusión-fisisorción.

7. CONCLUSIONES

Se evaluaron exitosamente 2 metodologías para la preparación de nanopartículas del copolímero poli(metacrilato de metilo-*co*-ácido metacrílico) cargadas con curcumina, ambas metodologías teniendo como base la Polimerización en Heterofase en Semicontinuo. La primera metodología consistió en la polimerización de los monómeros en presencia de la curcumina en el medio de reacción (cargado *in situ*), mientras que la segunda metodología consistió en primer lugar en la formación de las nanopartículas poliméricas y una subsecuente etapa de cargado con curcumina regida por los fenómenos de difusión-fisisorción.

Por el método de cargado *in situ* se lograron conversiones de los monómeros superiores al 90 %, produciendo látex coloidalmente estables con diámetros promedio de partícula entre 8 y 13 nm, y con contenido de sólidos de aproximadamente 12.5 % en peso. La presencia de la curcumina en las nanopartículas poliméricas fue demostrada cualitativa y cuantitativamente. La caracterización de los látex por espectroscopia de UV-vis indica que la concentración de este compuesto osciló entre 800 y 1500 mg/L; valor que supera enormemente el valor de solubilidad de la curcumina en agua en soluciones ácidas (≈3 mg/L). Las nanopartículas cargadas presentaron una relación curcumina/polímero de 0.4 a 1.1 % en peso, dependiendo de la concentración utilizada en la mezcla de monómeros adicionada en semicontinuo.

En la reacción de polimerización, la presencia de la curcumina ocasionó un retardo de la velocidad de polimerización, que afecto la nucleación y el crecimiento de partículas. Sin embargo, se obtuvieron valores similares a los diámetros promedio de partícula en ausencia de curcumina.

La presencia de curcumina no ocasionó la coalescencia de las nanopartículas, ya que se obtuvieron distribuciones de tamaño estrechas y con solo una población en el análisis por dispersión de luz dinámica.

Mediante el método de cargado por un proceso de difusión-fisisorción en un sistema heterogéneo, se utilizó un látex del copolímero a una concentración del 1 % en peso de las nanopartículas, logrando incrementar la concentración de curcumina en la dispersión acuosa hasta 450 mg/L. Las nanopartículas cargadas presentaron una relación curcumina/polímero de 2.4 a 49 % en peso.

La caracterización estructural, térmica y morfológica de las nanopartículas cargadas con curcumina corrobora la preparación de sistemas eficientemente cargados y con diámetros promedio de partícula aún por debajo de los 20 nm.

8. TRABAJO FUTURO

El trabajo realizado en este proyecto de tesis representa una alternativa para solucionar la problemática en la aplicación terapéutica de la curcumina debido a su baja solubilidad en agua. No obstante, queda mucho trabajo por hacer en el futuro. Algunos de los aspectos que se consideran importantes de investigar son los siguientes:

a) Efecto del pH del medio de reacción en la síntesis de las NPPs cargadas con curcumina mediante el método de cargado *in situ*, así como en el método de cargado por difusión-fisisorción.
b) Pruebas de liberación de curcumina de las NPPs para determinar el efecto de la metodología de cargado sobre los perfiles de liberación.
c) Evaluación del efecto citotóxico en líneas celulares sanas de las NPPs cargadas con curcumina por ambos métodos.
d) Evaluación del efecto antineoplásico, bactericida, fungicida y larvicida de las NPPs cargadas con curcumina por ambos métodos.
e) Estudios de estabilidad química de la curcumina durante el almacenamiento de los látex.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee R. Turmeric and Curcumin: Biological Actions and Medicinal Applications. Curr Sci. 2004;87(1):1–14.

2. Kunnumakkara A, Bordoloi D, Padmavathi G., Monisha J, Roy N, Prasad S, Aggarwal B. Curcumin, the Golden Nutraceutical: Multitargeting for Multiple Chronic Diseases. Br J Pharmacol. 2017;174:1325–48.

3. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M. Chemopreventive and Therapeutic Effects of Curcumin. Cancer Lett. 2005;223(1):181–90.

4. Anand P, Kunnumakkara A, Newman R, Aggawal B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. Mol Pharm. 2007;4(6):807–18.

5. Ravichandran R. Studies on Dissolution Behaviour of Nanoparticulate Curcumin Formulation. Adv Nanoparticles. 2013;02(01):51–9.

6. Allegra A, Innao V, Russo S, Gerace D, Alonci A, Musolino C. Anticancer Activity of Curcumin and Its Analogues: Preclinical and Clinical Studies. Cancer Invest. 2017;35(1):1–22.

7. Adefolaju A, Mwkikuga A. Lopinavir and Curcumin Directly Alters BAX / BCL2 and VEGF165b mRNA Levels to Suppress Human Squamous Cervical Carcinoma Cell Growth. 2019;37(2):584–91.

8. Jieying L, Siyuan C, Li L, Lei S, Shengrong G, Shentang H. Recent Progress in Studying Curcumin and its Nano-preparations for Cancer Therapy. Curr Pharm Des. 2013;19(11):1974–93.

9. Harsha K, Kumud B, Deepshikha K. Biodegradable Polymers, Role in Enhancing Bioavailability of Drug. Asian J Biomed Pharm Sci. 2011;1(5): 1–11.

10. Laffita O, Castillo A. Advances in the Pharmacological and Toxicological Characterization of the Herbal Medicine Curcuma Longa. Medisan. 2012;16(1):97–114.

11. Manzanares L, Licea A, Oroz I, Bernaldez J, Diaz F, Licea A. Smart Nanoformulation Based on Stimuli-Responsive Nanogels and Curcumin: Promising Therapy against Colon Cancer. ACS Omega. 2020; *5* (16), 9171-9184.

12. Shaikh J, Ankola AA, Beniwal V, Singh D, Ravi K. Nanoparticle Encapsulation Improves oral Bioavailability of Curcumin by at Least 9-fold when Compared to Curcumin Administered with Piperine as Absorption Enhancer. Eur J Pharm Sci. 2009;37:223–30.

13. Doane T, Burda C. Nanoparticle Mediated Non-covalent Drug Delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(5):607–21.

14. Parappurath N, Kirubanandam S, Arumugam V, Ethirajulu R, Narayanan V, Soundarajan A, Soundarajan A. In Vivo Biocompatiblity Studies: Perspectives on Evaluation of Biomedical Polymer Biocompatibility. In: Sabu T; Pretha B, Editor. Fundamental Biomaterials: Polymers. Woodhead P. United States: Elsevier Ltd.; 2018. 217–47.

15. Canan ET, Ömer UC. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals by Nanoparticles. In: Mihai GA., editor. Nutraceutical: Nanotechnology in the Agri-Food Industry. Elsevier Inc; 2016;4.535–91.

16. Pinto C, Neufeld R, Ribeiro A, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-loaded Polymeric Nanoparticles. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2006;2(1):8–21.

17. Saade H, Díaz de León R, Enríquez F, López RG. Preparation of Ultrafine Poly(Methyl Methacrylate-co-Methacrylic Acid) Biodegradable Nanoparticles Loaded with Ibuprofen. J Biomater Sci Polym Ed. 2016;27(11):1126–38.

18. Saade H, Guillén ML, Cabello RJ, Cepeda J, Ilyna A, Fernandez S, Enriquez

F, López RG. Biocompatible and Biodegradable Ultrafine Nanoparticles of Poly(Methyl Methacrylate-co-Methacrylic Acid) Prepared via Semicontinuous Heterophase Polymerization: Kinetics and Product Characterization. Int J Polym Sci. 2016;1–8.

19. Treviño M.E et al., Patente en trámite (2018).

20. Paula SC. Cúrcuma I (Curcuma longa L.). Reduca (Biología) Ser Botánica. 2014;7(2):84–9.

21. Vogel HA, Pelletier J. Curcumin-biological and Medicinal Properties. J. Pharma 1815, 2, 50. 1815;1815.

22. Roughley PJ, Whiting DA. Experiments in the Biosynthesis of Curcumin. J. Chem. Soc., 1973, 20, 2379 – 2388. 1973;2388.

23. Tung BT, Nham DT, Hai NT, Thu DK. Curcuma longa, the Polyphenolic Curcumin Compound and Pharmacological Effects on Liver. In: Ronald Ross Watson VRP, editor. Dietary Interventions in Liver Disease. States United: Elsevier Inc.; 2019. 125–134.

24. Hung V, Duyen T. Structure, Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Starches Isolated from Yellow (Curcuma longa) and (Curcuma caesia) Tumeric Rhizomes. Starch. 2017;69(5):1–27.

25. Prasad S, Tyagi AK, Aggrwal B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: The Golden Pigment from Golden Spice. Cancer Res Treat. 2014;46(1):2–18.

26. Priyadarsini KI. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. Molecules. 2014;19(12):20091–112.

27. Porkert M. Klinische Chinesische Pharmakologie. 1978;509, 512.

28. Gonzáles A, Sanz D, Claramunt R, Lavandera J, Alkorta J. Curcumin and Curcuminoids : Chemistry , Structural Studies and Biological Properties. An la real Acad Nac Farm. 2015;81(4):278–310.

29. Indira Priyadarsini K. Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin. Curr Pharm Des. 2013;19(1):2093–100.

30. Tapan KG. Bioavailability Enhancement of Curcumin Nutraceutical Through Nano-delivery Systems. In: Mihai GA., editor. Nutraceuticals: Nanotechnology in the Agri-Food Industry Vol. 4. Elsevier Inc.; 2016. 593–625.

31. Hsu C, Cheng A. Clinical Studies with Curcumin. Adv Exp Med Biol. 2007;595:471–80.

32. Mareheshwari RK, Anoop KS, Jaya G, Srimal R. Multiple Biological Activities of Curcumin: A Short Review. Life Sci. 2006;78:2081–7.

33. Shehzad A, Qureshi M, Anwar MN, Lee Y. Multifunctional Curcumin Mediate Multitherapeutic Effects. J Food Sci. 2017;82(9):2006–15.

34. Li L, Braiteh FS, Kurzrock R. Liposome-encapsulated Curcumin: In Vitro and in Vivo Effects on Proliferation, Apoptosis, Signaling, and Angiogenesis. Cancer. 2005;104(6):1322–31

35. Kuttan H, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC. Posible Actividad Anticancerígena de la Cúrcuma (Curcuma longa). Cancer Lett. 1985;29:197 — 202.

36. Ammon HPT, Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. Planta Med. 1991;57(1):1–7.

37. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of Curcumin in the Rat. Acta Pharmacol Toxicol. 1978, 43:86 – 92. 1978;1978.

38. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Absorption and Tissue Distribution of Curcumin in rats. Toxicology. 1980, 16:259 – 265. 1980;1980.

39. Hsu C, Cheng A. Clinical Studies with Curcumin. Adv Exp Med Biol. 2007;595:471–80.

40. Sharma RA, McLelland HR, Hill K, Ireson R, Euden S, Manson M,

Pirmohamed M, Marnett LJ, Gescher AJ, Steward,W. P. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Study oforal Curcuma Extract in Patients with Colorectal Cancer. Clin. Cancer Res. 2001, 7, 1894 – 1900.

41. Archana G, Priyanka A, Pranav S. Natural Biodegradable Polymers Based Nano-formulations for Drug Delivery: A review. Int J Pharm. 2019;561(1):244–64.

42. Mehare G, Tamizharasi S, Sivakumar T, Sawarkar S. Biodegradable Polymeric Nanoparticles For Drug Delivery And Targeting. Am J Pharmatech. 2013;3(6):84–102.

43. Ferrari M. Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers. In: Torchilin V, editor. Fundamental Biomedical Technologies. Boston, USA.: Springer New York; 2008. 255-67.

44. Nikolic V, Kikolic L, Stojanovic SI, Petrovic S TA. Administration Routes for Nano Drugs and Characterization of Nano Drug Loading. In: Mohapatra SS, Ranjan S, Dasgupta N, Kumar MR TS, editor. Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery. Micro y Na. United States: Elsevier Inc.; 2019. 587–625.

45. Karewicz A. Polymeric and liposomal nanocarriers for controlled drug delivery. Biomaterials for Bone Regeneration: Novel Techniques and Applications. Woodhead Publishing Limited; 2014. 351–373 .

46. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. J Control Relase. 2001;70(1): 1-20.

47. Manconi M, Manca M, Escribano E, Coma-Cros E, Biosca A, Lantero E, Latero E, Fernández X, Fadda A, Caddeo C. Nanoformulation of Curcumin-Loaded Eudragit-nutriosomes to Counteract Malaria Infection by a Dual Strategy: Improving Antioxidant Intestinal Activity and Systemic Efficacy. Int J Pharm. 2019;556:82–8.

48. Beloqui A, Coco R, Memvanga PB, Ucakar B, Des Rieux A, Préat V. pH-sensitive Nanoparticles for Colonic Delivery of Curcumin in Inflammatory Bowel Disease. Int J Pharm. 2014;473(1–2):203–12.

49. Madni A, Tahir N, Rehman M, Raza A, Muhammad R, Mahmood A, Muhammad I, Price M. Hybrid Nano-carriers for Potential Drug Delivery. Adv Technol Deliv Ther. 2017;54–86.

50. Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers R, Hennink W. Curcumin Nanoformulations: A Review of Pharmaceutical Properties and Preclinical Studies and Clinical data Related to Cancer Treatment. Biomaterials. 2014;35(10):3365–83.

51. Yallapu M, Jaggi M, Chauhan S. Curcumin Nanoformulations: A future Nanomedicine for Cancer. Drug Discov Today. 2012;17(1–2):71–80.

52. Sheetal R, D'Mello, Sudip KD N. Polymeric Nanoparticles for Small-Molecule Drugs: Biodegradation of Polymers and Fabrication of Nanoparticles. In: Yashwant P, editor. Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization. New York, USA: PharmaceuTech, Inc; 2009.16–34.

53. Rejesh K, Laxmi P, Bajpai A, Abhilasha M. Responsive Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications. In: Hamdy AS, editor. Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications Volumen 2. United States: Elsevier Ltd.; 2018. 289–320.

54. Kadian S, Harikumar S. Eudragit and its Pharmaceutical Significance. Roorkee Coll Pharm. 2014;2(1):1–16.

55. Martín E, Gálan M, Carbonell R. Drug Delivery Technologies: The Way Forward in the New Decade. Ind Eng Chem Res. 2009;48(5):2475–86.

56. Patra C, Priya R, Swain S, Goutam K, Panigrahi K, Ghose D. Pharmaceutical Significance of Eudragit: A review. Futur J Pharm Sci. 2017;3(1):33–45.

57. Modificar. Power to create. 2 Advanced Drug Delivery 1 EUDRAGIT ®

Products EUDRAGIT ® Acrylic Polymers for Solid Oral Dosage Forms.

58. Lovell PA, El-Aasser M.S. Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers. 1. 1997;1997.

59. Odian G. Principles of Polymerization. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.

60. Treviño ME. Polimerización del Acetato de Vinilo con Monómeros Bifuncionales: Cinética, Morfología de las Partículas y Propiedades Mecánicas de las Películas [Tesis]; Universidad de Nacional Autónoma de México. Facultad de Química; 2010.

61. Andrade RG., Copolimerización Radicalica del Sistema Estireno-Mirceno [Tesis]; Universidad de Autonoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Químicas; 2017.

62. Krackeler JJ, Naidus H. Particle size and Molecular weight Distributions of Various Polystyrene Emulsions. J. Polym. Sci. Part. 1969, 27, 207 – 235. 1969;1969.

63. Smith Wv, Ewart RH. Kinetics of Emulsion Polymeriztion. J. Chem Phys. 1948, 16, 292-599.

64. Ledezma R, Treviño ME, Elizalde L, Pérez-Carrillo LA, Mendizábal E, Puig E, López RE. Semicontinuous Heterophase Polymerization Under Monomer Starved Conditions to Prepare Nanoparticles with Narrow size Distribution. J Polym Sci Part A Polym Chem. 2007;45(8):1463–73.

65. Esquivel O, Treviño ME, Saade H, Puig JE, Mendizábal E, López RG. Mesoporous Polystyrene Nanoparticles Synthesized by Semicontinuous Heterophase Polymerization. Polym Bull. 2011;67(2):217–26.

66. Pérez-García MG, Alvarado AG, Rabelero M, Arellano M, Pérez-Carrillo LA, López-Serrano F, López E, Mendizábal E, Puig E. Semicontinuous Heterophase Polymerization of Methyl and Hexyl Methacrylates to Produce Latexes with high Nanoparticles Content. J Macromol Sci Part A Pure Appl

Chem. 2014;51(2):144–55.

67. Saade H, Barrera C, Guerrero R, Mendizábal E, Puig JE, López RG. Preparation and Loading with Rifampicin of Sub-50 nm Poly(ethyl cyanoacrylate) Nanoparticles by Semicontinuous Heterophase Polymerization. J Nanomater. 2016 (1);11.

68. Kharat M, McClements DJ. Recent advances in colloidal delivery systems for nutraceuticals: A case study – Delivery by Design of curcumin. J Colloid Interface Sci. 2019;557:506–18.