



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura Química Farmacéutica Biológica

INFORME DE SERVICIO SOCIAL

“Diseño y caracterización de nanopartículas de Curcumina y Apigenina para el tratamiento de cáncer de mama”

Alumno: Gabriela Guevara Trinidad

Asesores: Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón

Dra. Lizbeth Martínez Acevedo

07- Octubre- 2024

Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón
Profesor Titular B.T.C
No. Eco. 38889

Dra. Lizbeth Martínez Acevedo
No. Eco. 900078
Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-X

Contenido

1. Introducción.....	2
2. Marco teórico	3
2.1 El Cáncer	3
2.2 Cáncer de mama	3
2.2.1 Tratamiento	3
2.3 Nanopartículas Poliméricas	4
2.3.1 Método de nano precipitación o desplazamiento de solvente.	4
2.4 Curcumina	5
2.4.1 Estudios de la curcumina	5
2.5 Apigenina	6
2.5.1 Estudios de la apigenina	6
2.6 Diseño experimental	7
2.6.1 Diseño Box- Behnken.....	7
3. Planteamiento del problema y justificación	8
3.1 Pregunta de investigación	9
3.2 Hipótesis.....	9
3.3 Objetivos	9
4. Metodología	10
4.1 Obtención del nanosistema mediante el método de nanoprecipitación ..	10
4.2 Optimización de los componentes del NC API-CUR	10
4.3 Caracterización del nanosistema	12
5. Resultados y discusión.....	14
5.1 Optimización del NC API-CUR.....	14
5.2 Caracterización química del NC API-CUR	22
5.2.1 DSC	22
5.2.2 Espectroscopia IR.....	23
5.3 Perfil de liberación.....	26
6. Conclusión	28
7. Referencias.....	29

1. Introducción

El cáncer es una enfermedad genética que afecta cualquier zona del organismo donde las células del cuerpo se multiplican sin control y se diseminan a otras partes del cuerpo. Estas células pueden formar tumores cancerosos malignos o benignos. La cifra global de esta enfermedad incrementa rápidamente con un estimado de 19.3 millones de nuevos casos al año, se espera que para 2040 se registre una cifra máxima de 28.4 millones de casos. (Farghadani, R., & Naidu, R. 2022).

Existen diferentes tipos de cáncer, entre los más comunes se encuentra al cáncer de mama. Para el 2022, la OMS ha registrado el cáncer de mama como el segundo lugar con 2,3 millones de casos (OMS,2022). Este tipo de cáncer es una enfermedad en la cual las células de la mama se multiplican sin control. Existen distintos tipos de cáncer de mama, la mayoría comienzan en los conductos o en los lobulillos.

En la actualidad, la industria farmacéutica ha realizado una búsqueda exhaustiva para encontrar alternativas que incluyan compuestos naturales, a manera de reducir el impacto negativo de algunos tratamientos como la quimioterapia. Entre las alternativas, la nanotecnología juega un papel relevante porque brinda una terapia dirigida que puede aumentar el efecto terapéutico y disminuir los efectos secundarios asociados a las terapias convencionales.

De tal manera que, en este trabajo de investigación, se busca desarrollar un sistema nanoestructurado de Apigenina -Curcumina como tratamiento combinado para el cáncer de mama con la intención de disminuir el crecimiento de las células tumorales, tener un tratamiento dirigido y reducir los efectos tóxicos de la quimioterapia. La propuesta incluirá el empleo de materiales biodegradables, biocompatibles y naturales en la formulación. Se espera que los nanosistemas obtenidos presenten una alternativa innovadora para el tratamiento de cáncer de mama *in vitro* y se consolide una línea de investigación en el área de tecnología farmacéutica de la UAM-Xochimilco.

2. Marco teórico

2.1 El Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética que afecta cualquier zona del organismo donde las células del cuerpo se multiplican sin control y se diseminan a otras partes del cuerpo. Estas células pueden formar tumores cancerosos malignos o benignos. Los tumores malignos se diseminan o invaden los tejidos cercanos, formando tumores sólidos a diferencia de los tumores benignos, los cuales no se diseminan a los tejidos cercanos (¿Qué es el cáncer?, 1980).

2.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad en la cual las células de la mama se multiplican sin control. Existen distintos tipos de cáncer de mama, la mayoría comienzan en los conductos o en los lobulillos. El cáncer de mama puede diseminarse fuera de la mama a través de los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos. Cuando el cáncer de mama se disemina a otras partes del cuerpo, se dice que ha hecho metástasis (Cáncer de mama. 2024).

Existen diferentes tipos de cáncer de mamá, los más comunes son Carcinoma Ductal Infiltrante donde el cáncer se origina en los conductos y Carcinoma Lobulillar Infiltrante donde el cáncer se origina en los lobulillos (CDC español, 2023, Julio 28).

2.2.1 Tratamiento

El tratamiento se determina dependiendo del tipo de cáncer, la etapa clínica y tamaño, y si las células cancerosas son susceptibles a las hormonas.

Terapia local

- Cirugía: su propósito es eliminar la mayor cantidad de células cancerígenas y entre más pequeño sea el tumor, las opciones quirúrgicas serán más. Las opciones más consideradas para el cáncer de mama son: Lumpectomía, Mastectomía, Extracción de ganglios linfáticos y extracción de ambas mamas.
- Radioterapia: La radioterapia es el uso de rayos X u otras partículas con alta potencia para eliminar las células cancerosas. La duración del tratamiento depende del tipo de cáncer y la ubicación del tumor. Existen diferentes tipos de radioterapia: Irradiación de toda la mama, Radioterapia intraoperatoria, Braquiterapia, radiación de intensidad modulada y terapia de protones.

Terapia sistémica

- Quimioterapia: Es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas, evitar que crezcan, se dividan y produzcan más células cancerosas. Puede

administrarse antes de la cirugía para reducir el tamaño de un tumor grande, facilitar la cirugía y disminuir el riesgo de recurrencia. Cuando se administra antes de la cirugía, se denomina “quimioterapia neoadyuvante”. También, puede administrarse después de la cirugía para reducir el riesgo de recurrencia, denominada quimioterapia adyuvante.

- Terapia hormonal: La finalidad de este tipo de tratamiento es actuar como tratamientos “antihormonales” o “antiestrógenos”. Bloquean las acciones o los niveles hormonales más bajos en el organismo. Es sugerida para mujeres que presentan tumores con receptores positivos (ER-positivo y/o PR-positivo) después de la cirugía, para evitar la recaída.

- Terapia dirigida/biológica: La terapia dirigida es un tratamiento que apunta a los genes, las proteínas o las condiciones del tejido que contribuyen al crecimiento y la supervivencia del cáncer. Se utiliza en casos donde la quimioterapia no es eficaz. El medicamento más utilizado es el trastuzumab, el cual inhibe la proliferación de células tumorales en el cáncer de mama HER2 positivo no metastásico (Cáncer de mama - Tipos de tratamiento, 2012).

2.3 Nanopartículas Poliméricas

Las nanopartículas poliméricas se definen como partículas de tamaño inferior a 1 μm , generalmente entre 10 y 500 nm, elaboradas a partir de materiales poliméricos de diferente naturaleza. El método de fabricación, la composición química de éstos y la naturaleza del ligando, en caso de que lo posea, influenciarán su funcionalidad y efectividad. Los métodos para la elaboración de las nanopartículas se clasifican en dos: los de elaboración directa y aquellos a base de polímeros preformados. Entre los métodos de elaboración directa se pueden mencionar la polimerización de una emulsión (que permite crear nanoesferas) y la polimerización interfacial a partir de monómeros (para formar nanocápsulas). Dentro de los métodos que emplean polímeros preformados destacan la emulsión evaporación de solvente (simple o doble) que permite obtener nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente y la nanoprecipitación por inyección. El empleo de las nanopartículas en la terapia contra el cáncer ha sido uno de los tópicos más estudiados, debido a que se han implementado para la liberación de fármacos (Gómez-Gaete, C. (2019).

2.3.1 Método de nano precipitación o desplazamiento de solvente.

El desplazamiento de disolvente es una técnica sencilla que se ha utilizado para la preparación de nanopartículas poliméricas, se le conoce también como método de nanoprecipitación. Este método requiere de 2 fases, la fase solvente (fase orgánica) y la no solvente (fase acuosa). Para la formación de nanopartículas mediante esta técnica se disuelve el fármaco y polímero en un disolvente semipolar miscible con

agua (p. ej acetona o etanol). Esta solución es vertida o inyectada en una solución acuosa que puede o no contener un estabilizante (p. ej. alcohol poli vinílico o polaxámero) y que se encuentra en agitación constante. Se ha sugerido que la formación de nanopartículas mediante esta técnica es comparable al mecanismo de difusión que ocurre durante la emulsificación espontánea. Conforme a este mecanismo, el disolvente orgánico difunde rápidamente hacia el agua llevando consigo cadenas de polímero que aún se encuentran en solución, como resultado se obtienen estructuras que puede estar en el rango nanométrico. El mecanismo de formación de las nanopartículas puede describirse en base a las interacciones agua-disolvente, agua-polímero y disolvente-polímero.

2.4 Curcumina

La curcumina pertenece a la familia de los curcuminoides, pigmentos polifenólicos presentes en los rizomas o tallos subterráneos de la planta tropical Cúrcuma (*Curcuma longa L., Zingiberaceae*), conocida también como turmérico o haldi, nativa del sur y sudeste del Asia tropical que pertenece a la familia del jengibre. La curcumina es una molécula anfipática (molécula con grupos hidrófilos e hidrófobos), lo que la capacita para ser parcialmente soluble en agua y en disolventes orgánicos. Tiene un punto de fusión de 176-181°C (González-Albadalejo, J., Sanz, D., Claramunt, R. M., Lavandera, J. L., Alkorta, I., & Elguero, J.).

Es un metabolito de interés para la medicina moderna ya que presenta una amplia gama de actividades farmacológicas como: propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y anticancerígenas. Se han desarrollado diversas nano-preparaciones de curcumina para la terapia contra el cáncer, las nanopartículas lipídicas sólida, liposomas, glicoles, celulosa dendrímeros, nanodiscos y nanofibras (Münch, G., Venigalla, M., Sonogo, S., & Gyengesi, E, 2015).

2.4.1 Estudios de la curcumina

La curcumina ha demostrado efectos antitumorales en el cáncer de mama HER2+. Puede inducir la muerte celular en las células tumorales del cáncer de mama induciendo cambios en el potencial de la membrana celular.

Las células madre tumorales es una de las principales causas de que un tumor tenga una recidiva tras el tratamiento. Las células madre tumorales son las responsables de la resistencia a la quimioterapia tras un tiempo de tratamiento, por lo tanto, la investigación para desarrollar enfoques que permitan la destrucción de las células madre tumorales es de suma importancia. La curcumina ha demostrado su capacidad de eliminar las células madre tumorales, además de aumentar la eficacia de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer de mama.

El gen p53 es un gen capaz de detectar y reparar ADN dañado. También, tiene la capacidad de provocar la muerte celular evitando de esta manera el desarrollo de tumores. La mutación de este gen supone un aumento de la probabilidad de padecer cáncer, ya que da como resultado la pérdida total o parcial de su función. La mutación de p53 está presente en el 30% de los tumores de mama. La importancia de regular este gen ha hecho que los investigadores concentren sus esfuerzos en desarrollar una inmunoterapia capaz de regularlo. La curcumina ha demostrado su capacidad de inducir muerte celular mediante la activación y regulación del gen p53. Las células tumorales que expresan niveles altos del gen p53 mutado son los más sensibles al tratamiento con curcumina (Ibañez, 2023).

2.5 Apigenina

La apigenina es un bioflavonoide que posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiangiogénicas, antialergizantes, antígenotóxicas y anticancerosas. Este flavonoide natural se encuentra presente en frutas y verduras como el perejil, la cebolla, el apio y el té de manzanilla. La apigenina también, está presente en el vino tinto y en la cerveza. Puede servir para una serie de propósitos de salud como ayuda natural para el sueño, antidiabético y agente anticancerígeno (Apigenina, 2020). Este metabolito de interés para la medicina se centra en su capacidad única terapéutica para promover la apoptosis, prevenir el cáncer y reducir la inflamación (Pro, V. 2022, octubre 24).

2.5.1 Estudios de la apigenina

Varios estudios han proporcionado evidencia de que muchas formas de cánceres potencialmente mortales se desarrollan como resultado de la influencia de la dieta o el estilo de vida, y se puede prevenir o incluso tratar con modificaciones relativamente simples y mediante la utilización de una gran cantidad de nutrientes naturales. Uno de los principales métodos utilizados por las células cancerosas para desarrollar y propagarse es una capacidad única de engañar al sistema inmune y evadir la eliminación a través de un proceso natural conocido como apoptosis.

La apigenina de verduras frescas estimula ciclo de muerte normal en las células. Un equipo de investigadores de la Universidad de Ohio, publicaron los resultados de un estudio en las Actas de la Academia Nacional de Ciencias en el cual un compuesto abundante en la dieta mediterránea roba a las células cancerosas su capacidad de evadir la muerte. Los científicos descubrieron que, al alterar un paso muy específico en la regulación génica, este compuesto esencialmente reduzca a las células cancerosas para volver a ser células que mueren en la fecha prevista. La apigenina restablece el perfil normal en las células cancerosas, esto puede tener un gran valor clínico como una posible estrategia para prevenir el cáncer. Un hallazgo importante fue que la apigenina influye la actividad de ARN mensajero, un componente crítico

para la construcción de proteínas. Los expertos en nutrición recomiendan consumir cinco a nueve porciones diarias de verduras frescas para reducir el riesgo de muchas enfermedades crónicas. El aumento de apigenina influye directamente en el ciclo de vida de las células cancerosas para reducir drásticamente el riesgo de muchas formas de cáncer (Gonzalez Villa, 2015).

2.6 Diseño experimental

Un diseño de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DOE) que ayudan a mejorar y optimizar la respuesta. La metodología del diseño de superficie de respuesta se utiliza con frecuencia para refinar los modelos, después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta. Entre los diseños de superficie respuesta se encuentran los diseños centrales compuestos y diseños de Box- Behnken (Minitab, 2024).

2.6.1 Diseño Box- Behnken

Los diseños de Box-Behnken son un tipo de diseño superficie respuesta, por lo general tienen menos puntos de diseño que los diseños centrales compuestos. Pueden estimar eficientemente los coeficientes de primer y segundo orden; sin embargo, no pueden incluir corridas de un experimento factorial. Los diseños de Box-Behnken siempre tienen 3 niveles por factor, a diferencia de los diseños centrales compuestos, que pueden tener hasta 5. Otra diferencia con respecto a los diseños centrales compuestos es que los diseños de Box-Behnken nunca incluyen corridas donde todos los factores estén en su valor extremo, como por ejemplo todos los valores de configuración bajos (Minitab, 2024).

3. Planteamiento del problema y justificación

La OMS ha considerado al cáncer de mama femenino como el segundo lugar con 2,3 millones de casos. En México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) dio a conocer sus resultados de defunción para el 2022, en los cuales se registraron 7 840 defunciones, divididas en tres grupos: 65 años y más, con 3 050 casos (38.9 %); e 55 a 64 años con 1 999 casos (25.5 %) y el de 45 a 54, con 1 721 casos (22.0 %) (INEGI,2023).

La OMS ha enfatizado en que se deben de dar uno o varios tratamientos y la elección de ellos debe basarse en pruebas científicas (OMS, 2021). Como tratamientos alternos se ha considerado la investigación de compuestos derivados de fuentes naturales y renovables aplicados con técnicas modernas como la nanotecnología. Uno de los usos de la nanotecnología es la liberación de fármacos mediante nanocomplejos estructurados, los cuales presentan estudios que respaldan su eficacia como quimioterapéuticos, porque brindan un efecto terapéutico dirigido que puede disminuir la dosis efectiva y los efectos secundarios asociados a las terapias convencionales contra el cáncer.

El desarrollo de sistemas farmacéuticos innovadores que mejoren los tratamientos convencionales mediante el uso de materiales sostenibles o biodegradables para mitigar el impacto ambiental hace importante el uso de compuestos naturales con propiedades terapéuticas. Tal es el caso de la apigenina y la curcumina, que han demostrado individualmente propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y anticancerígenas. Este estudio tiene como objetivo diseñar y optimizar un sistema nanoestructurado sostenible para la coencapsulación de apigenina y curcumina, utilizando disolventes ecológicos como el etanol y materias primas renovables. Este enfoque emplea la nanotecnología para crear sistemas sostenibles de liberación de fármacos, con el objetivo de mejorar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos adversos asociados a enfermedades como el cáncer de mama.

3.1 Pregunta de investigación

¿Será posible diseñar y optimizar un sistema nanoestructurado sostenible para la coencapsulación de apigenina y curcumina mediante el diseño de experimentos para futuras aplicaciones como el cáncer de mama?

3.2 Hipótesis

Si se diseña y optimiza un sistema nanoestructurado sostenible para la coencapsulación de apigenina y curcumina mediante el diseño de experimentos se tendrá un sistema para el tratamiento de enfermedades como el cáncer de mama.

3.3 Objetivos

Objetivo general

Desarrollar y caracterizar un sistema nanoparticulado sostenible con curcumina y apigenina como tratamiento combinado para el cáncer de mama mediante el diseño de experimentos.

Objetivos específicos

1. Establecer los excipientes adecuados y su concentración para la formulación de un sistema nanoparticulado mediante el diseño de experimentos.
2. Validar la formulación optimizada para producir el sistema nanoparticulado de apigenina-curcumina para futuras aplicaciones en cáncer de mama.
3. Caracterizar el nanosistema: tamaño de partícula, potencial zeta, eficiencia de encapsulación, perfil de liberación; así como u caracterización química mediante DSC y espectroscopia IR para el cumplimiento de los atributos de calidad de la formulación.

4. Metodología

4.1 Obtención del nanosistema mediante el método de nanoprecipitación

El sistema nanoestructurado de apigenina (API) y curcumina (CUR) se fabricó utilizando el método de nanoprecipitación con algunas modificaciones, empleando etanol como fase disolvente y agua a pH 4 como antidisolvente. Además, se utilizaron materias primas biocompatibles, biodegradables y renovables, como zeína (agente encapsulante) y quitosano (agente de recubrimiento), para lograr un producto completamente biodegradable. La fase disolvente consistió en disolver por separado cada compuesto natural y la zeína en etanol e inyectarlos por pasos en la fase antidisolvente, una vez obtenidas las nanopartículas se recubrieron con una solución de quitosán para tener el nanocomplejo de apigenina-curcumina (NC API-CUR) (Figura 1).

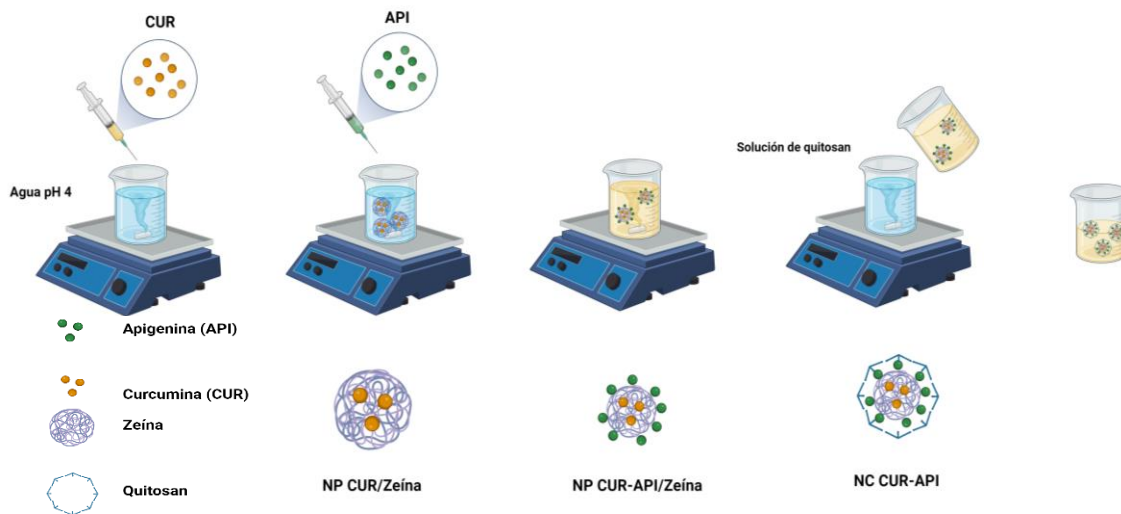


Figura 1. Método de nanoprecipitación para la obtención del NC API-CUR.

4.2 Optimización de los componentes del NC API-CUR

Se empleó un diseño de Box-Behnken para optimizar las variables independientes: concentración de zeína, concentración de quitosano y concentración de API-CUR, los niveles estudiados de cada factor se muestran en la Tabla 1. Las variables de respuesta medidas incluyeron el tamaño de partícula (TP), índice de polidispersidad

(IPD), potencial zeta (ζ) y eficiencia de encapsulación (EE%) para cada lote experimental.

Tabla 1. Niveles de cada factor de estudio para la optimización del nc pi-cur mediante el diseño de Box- Behnken.

Factor	Nivel		
	Bajo	Medio	Alto
Zeína (%)	0.5	1.0	1.5
Quitosan (%)	0.05	0.20	0.35
API:CUR (mg:mg)	20:80	50:50	80:20

En la Tabla 2 se presenta la matriz de diseño de Box-Behnken para la optimización de la formulación del NC API-CUR obtenida con el software estadístico Minitab® versión 17, donde se definieron 15 experimentos por bloque. Cada lote experimental se fabricó de acuerdo con el procedimiento de la Figura 1.

Tabla 2. Matriz del diseño Box-Behnken para la optimización de NC API-CUR

Lote	Zeína (%)	Quitosan (%)	Apigenina (mg)	Curcumina (mg)
LAC1	0.5	0.05	50	50
LAC2	1.5	0.05	50	50
LAC3	0.5	0.35	50	50
LAC4	1.5	0.35	50	50
LAC5	0.5	0.2	20	80
LAC6	1.5	0.2	20	80
LAC7	0.5	0.2	80	20
LAC8	1.5	0.2	80	20
LAC9	1	0.05	20	80
LAC10	1	0.35	20	80
LAC11	1	0.05	80	20
LAC12	1	0.35	80	20
LAC13	1	0.2	50	50
LAC14	1	0.2	50	50
LAC15	1	0.2	50	50

4.3 Caracterización del nanosistema

4.3.1 Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersidad (IPD)

El TP y el IPD de las nanopartículas fueron determinados mediante la técnica de dispersión dinámica de luz usando un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, R.U.). Antes de la medición, cada dispersión fue diluida 10 veces con agua Mili-Q®. El TP e IPD se midieron por triplicado.

4.3.2 Potencial zeta (ζ)

La carga superficial de las nanopartículas de cada sistema fue obtenida por el movimiento electroforético de las partículas en dispersión usando un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, R.U.). Similarmente, antes de la medición las dispersiones fueron diluidas 10 veces. Las mediciones se realizaron por triplicado.

4.3.3 Eficiencia de encapsulación de CUR y API

La eficiencia de encapsulación (EE%) se define como la cantidad de principio activo que fue incorporado dentro del sistema nanoparticulado, relacionada con la concentración inicial utilizada. La cuantificación de CUR y API se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS Lambda 35 (PerkinElmer®) a 419 nm para la CUR y 337 para API. Los lotes fabricados se centrifugaron a 12,000 rpm por 2 h a 10°C para separar el sobrenadante y posteriormente diluir con metanol. La concentración de API o CUR se calculó por interpolación en la curva de calibración correspondiente para cada compuesto. La EE % se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{[Concentración\ CUR\ o\ API\ total] - [Concentración\ CUR\ o\ API\ sobrenadante]}{[Concentración\ CUR\ o\ API\ total]} (100\%)$$

4.3.4 Caracterización química

4.3.4.1 Calorimetría diferencial de barrido

Las determinaciones de DSC de la materia prima, las mezclas físicas y el nanosistema se realizaron en un instrumento (NETZSCH®, Alemania). Se colocaron aproximadamente 5 mg de las muestras en crisoles de aluminio herméticamente sellados y se calentaron de 0 a 400°C a una velocidad de 10°C/min bajo una atmósfera dinámica de nitrógeno (50 mL/min).

4.3.4.2 Espectroscopia IR

Las nanopartículas obtenidas bajo condiciones optimizadas se lavaron utilizando tres ciclos de centrifugación a 12,857 xg durante 20 minutos con agua Milli-Q®. El sedimento fue resuspendido en agua Milli-Q® durante 24 horas a temperatura ambiente y luego liofilizado (Sistema de Liofilización de Sobremesa FreeZone de 1 Litro, Labconco Corp., Kansas City, Missouri, EE. UU.). Se mezclaron diez miligramos de la muestra liofilizada (zeína, quitosan, CUR, API y NC API-CUR) con 100 mg de KBr en un mortero de ágata durante 2 minutos. La mezcla en polvo se compactó utilizando una prensa manual (Hand Press w/1, Pike Technologies, Wisconsin, EE. UU.) con un dado de 7 mm. El análisis FTIR se realizó utilizando un espectrómetro FTIR (Tensor 27, Bruker, Massachusetts, EE. UU.) en modo de transmisión (TR), con 64 escaneos realizados en la región de 400-4000 cm⁻¹. Los espectros FTIR se analizaron utilizando el software OPUS® versión 5.0 (Bruker, Massachusetts, EE. UU.).

4.3.5 Perfiles de Liberación

Para el perfil de liberación del NC API-CUR se empleó como medio PBS pH 6 con Tween 80 al 0.5% en un baño de agua a 37 ± 1°C y 100 rpm. La muestra se colocó en una membrana de diálisis de 10 kDa y fue sumergida en un vaso con medio de liberación. Se realizó un muestreo a los 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 24 h tomado 5 mL de muestra con reposición del medio. Las muestras se cuantificaron mediante espectrofotometría UV-VIS a 426 nm para CUR y 337 para API por interpolación en la curva de calibración correspondiente a cada compuesto. Se calculó el porcentaje de compuesto liberado con respecto al tiempo.

5. Resultados y discusión

5.1 Optimización del NC API-CUR

Una vez definido el material encapsulante (zeína) y el agente de recubrimiento (quitosa), se realizaron los lotes control mediante el método de nanoprecipitación. En la Tabla 3 se muestra la composición para los lotes control, los cuales se fabricaron con el objetivo de obtener una referencia sobre el comportamiento de los excipientes solos y/o adicionando un solo activo (API o CUR).

Tabla 3. Formulación lotes control.

	Componente			
	Zeína	Quitosa	API	CUR
NC BCO	1mg	0.2mg	-----	-----
NC API	1mg	0.2mg	50mg	-----
NC CUR	1mg	0.2mg	-----	50mg

En la Figura 2 se presentan los lotes obtenidos, observando una pigmentación amarilla debida a la CUR y blanquecina para NC API. Lo cual indica que los compuestos se están incorporando en el nanosistema, al no observar una separación de fases.

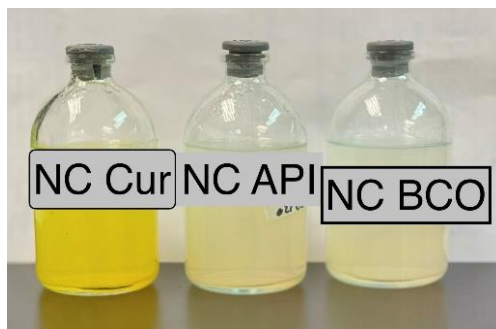


Figura 2. Representación de los lotes control

La caracterización de los NC API-CUR fabricados por el método de desplazamiento de solvente mediante el diseño de Box-Behnken a las diferentes condiciones del diseño experimental se presenta en la Tabla 4, en el cual se optimizaron las variables independientes del experimento: concentración de zeína, concentración de quitosan, y concentraciones API:CUR.

Tabla 4. Caracterización de los NC API-CUR a las diferentes condiciones del diseño experimental de Box-Behnken.

Lote	TP (nm)		IPD		PZ (mV)	
	Promedio	Desviación Estándar	Promedio	Desviación Estándar	Promedio	Desviación Estándar
LAC1	160.93	3.30	0.42	0.02	27.93	0.28
LAC2	116.5	1.34	0.22	0.001	41.76	1.03
LAC3	205	8.66	0.48	0.02	52.46	4.12
LAC4	146	1.95	0.28	0.003	50.1	0.69
LAC5	135.23	1.60	0.30	0.004	39.06	2.11
LAC6	132.03	2.80	0.25	0.004	47.96	1.75
LAC7	158.63	5.61	0.41	0.01	48.93	2.04
LAC8	127.06	2.49	0.25	0.01	48.83	2.36
LAC9	104	0.86	0.26	0.01	37.26	1.73
LAC10	162.2	6.13	0.41	0.002	57.56	0.73
LAC11	143.36	3.37	0.36	0.008	41.53	1.84
LAC12	155.36	0.60	0.45	0.007	46.36	2.81
LAC13	136.63	1.24	0.27	0.01	45.86	4.30
LAC14	142.8	1.48	0.32	1.02	51.86	1.02
LAC15	123.23	0.89	0.26	0.001	44.86	1.43

En la Figura 3 se muestran los 15 lotes de NC API-CUR. El tamaño de partícula cambio de un lote a otro, oscilando entre 103 y 205 nm; el IPD varío de 0.2 a 0.5. Los cambios de color pueden deberse a la concentración de CUR que se utilizó, entre más CUR más amarilla es el lote. Lo que demuestra la influencia de los componentes de la formulación en el tamaño de partícula y el IPD, entre más cantidad de agente encapsulante más cantidad de compuesto se puede encapsular, sin embargo, esto puede incrementar el TP y el IPD.

El potencial zeta nos indica que tan estables son las nanopartículas y cuanto mayor sea el valor, más estables son. Para los lotes fabricados el valor varío entre 25 y 50 mV, por lo cual se tienen nanosistemas físicamente estables.



Figura 3. Lotes experimentales fabricados de acuerdo con el diseño de Box-Benhken

En análisis estadístico del diseño para la optimización de las variables de respuesta se describe a continuación:

1. TAMAÑO DE PARTICULA (TP)

En la gráfica de contornos para TP (Figura 4) se observa un TP menor a 130 nm con las cantidades siguientes: 0.05% de quitosán y 1.5% de zeína, por el contrario, si se tiene una cantidad de 0.50% de zeína y 0.35% de quitosán se observa un TP >190 nm. Entre mayor cantidad de zeína y menor cantidad de quitosán se obtienen valores pequeños, pero cabe mencionar que entre más pequeño sea el TP se puede encapsular una menor cantidad de los compuestos.

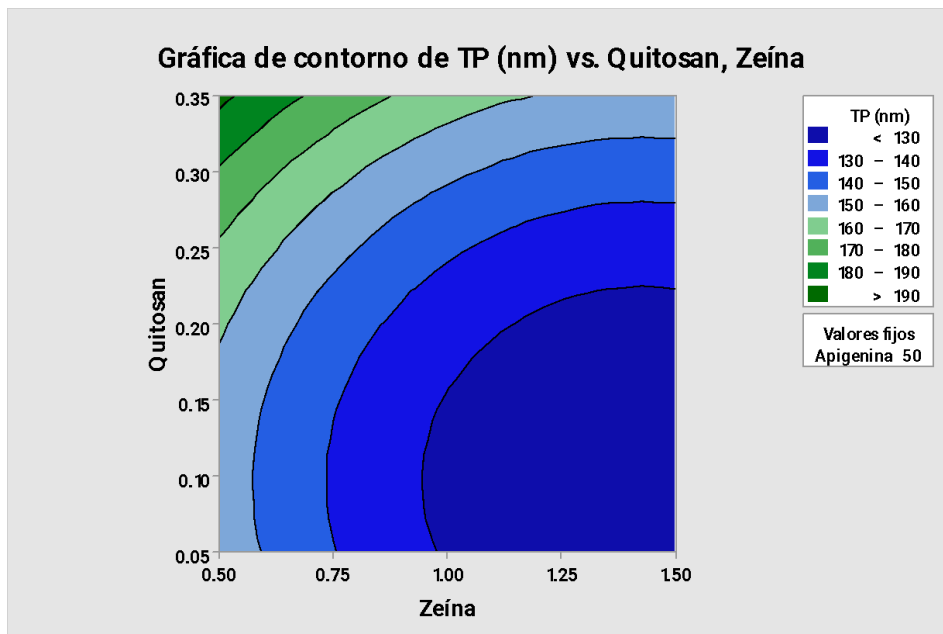


Figura 4. Gráfica de Contornos para TP de acuerdo con la cantidad suministrada de Zeína y Quitosán en %.

2. INDICE DE POLIDISPERSIDAD (IPD)

En la gráfica de contornos para IPD (Figura 5) se observa que la distribución de TP es dependiente de la cantidad de zeína con poca influencia del agente de recubrimiento, puesto que se requiere de una concentración de 1.5% para alcanzar IPD pequeños.

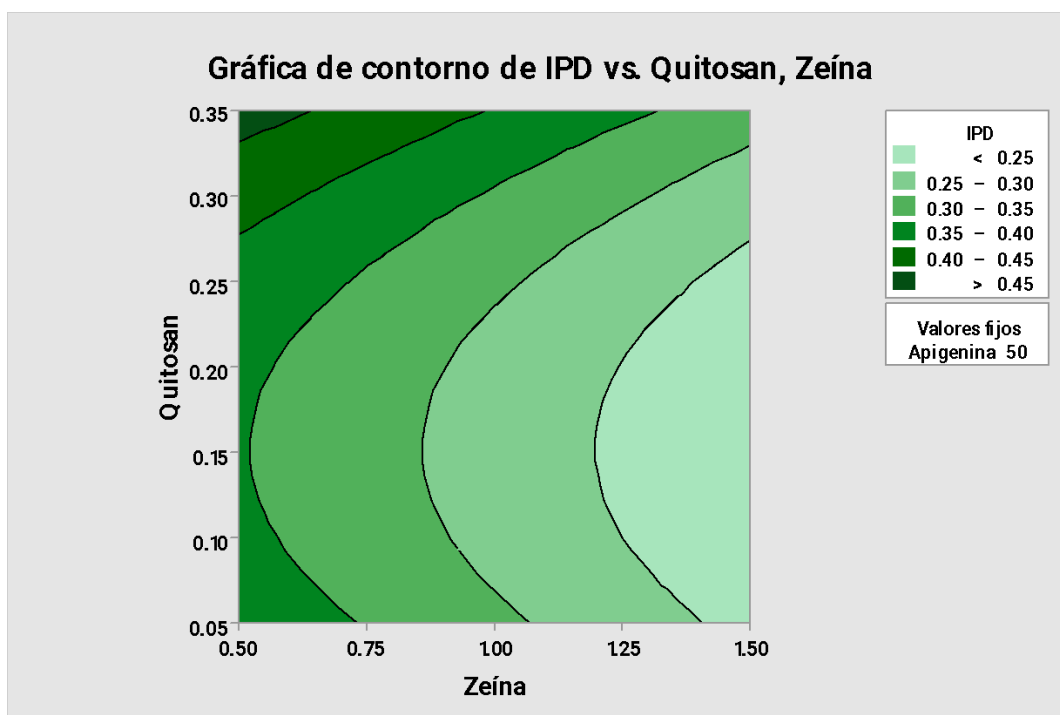


Figura 5. Gráfica de contornos para IPD de acuerdo con la cantidad suministrada de zeína y quitosan en %.

3. POTENCIAL ZETA ζ

En la gráfica de contornos para PZ (Figura 6) se observa que la estabilidad del nanosistema depende de la carga superficial de las partículas, la cual se adquiere por la incorporación del agente de recubrimiento (quitosan) que le confiere una carga positiva, siendo el PZ mayor al adicionar una cantidad >0.20% de quitosan. El potencial zeta es un indicador de la estabilidad de una dispersión o emulsión. En general, cuanto mayor sea la magnitud del potencial, mejor será la estabilidad de la dispersión o emulsión (MICROTRAC, s.f.), observando que los lotes fabricados presentan una estabilidad aceptable al tener valores de PZ > 25 mV.

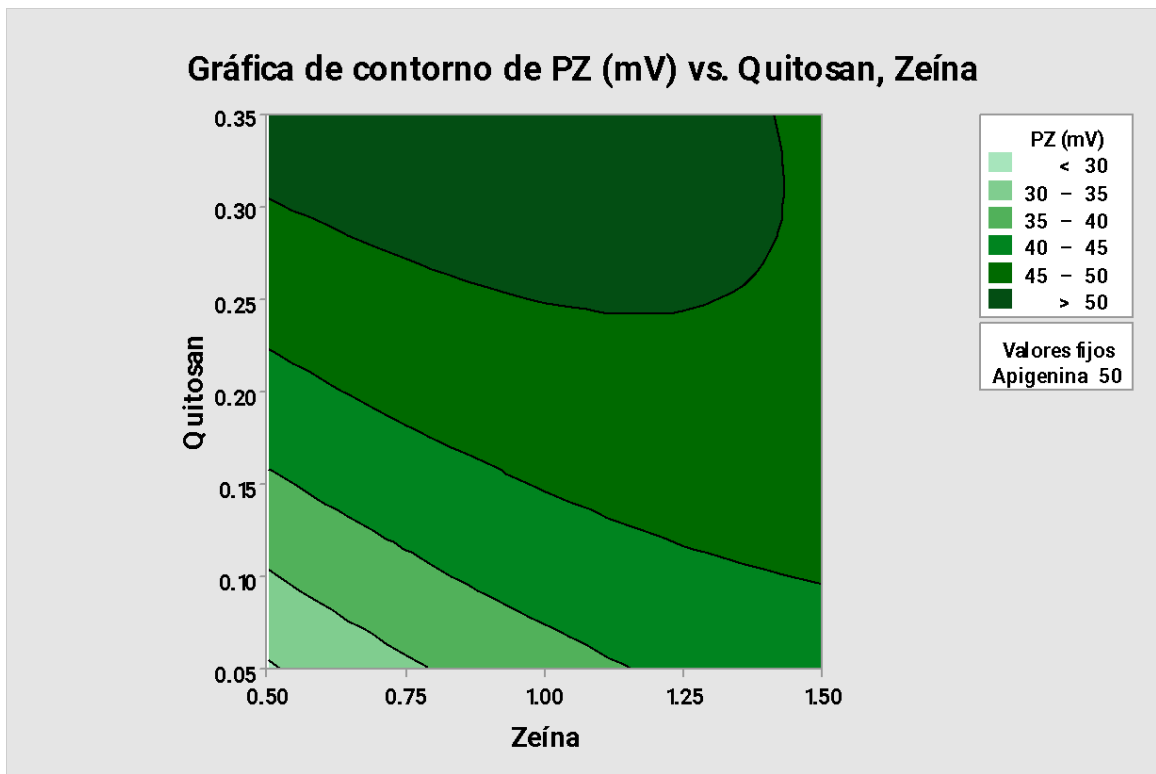


Figura 6. Gráfica de contornos para PZ de acuerdo con la cantidad suministrada de zeína y quitosan en %.

4. EFICIENCIA DE ENCAPSULACION DE CURCUMINA

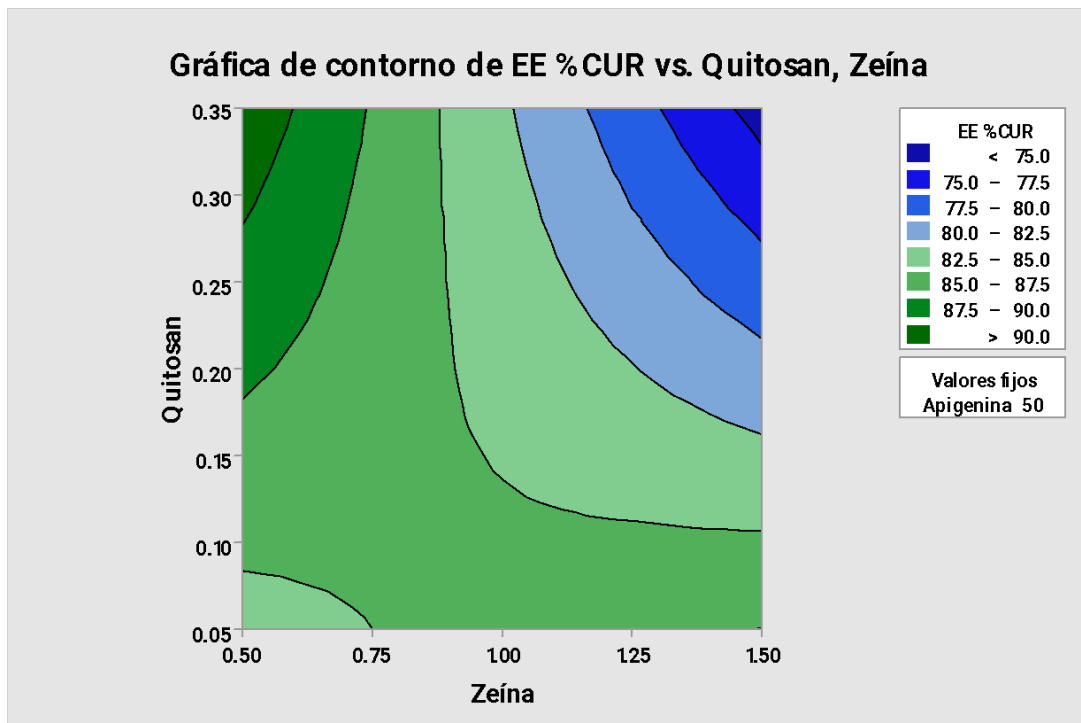


Figura 7. Gráfica de contornos para EE % CUR de acuerdo con la cantidad suministrada de zeína y quitosan en %.

En la gráfica de contornos para la EE% de CUR (Figura 7) se muestra que una cantidad de CUR encapsulada mayor, se obtiene con una cantidad entre 1.15 a 1.50 % de zeína y una cantidad de 0.25 a 0.35 % de quitosan. De tal manera, que la EE % depende del agente de encapsulación para incorporar el compuesto a encapsular., en este caso de la interacción de la zeína con la CUR.

5. EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE APIGENINA

En la gráfica de contornos de EE% de API (Figura 8) se muestra que una cantidad mayor de API encapsulada se obtiene con una cantidad entre 0.80 a 1.10 % de zeína y una cantidad de 0.15 a 0.25 % de quitosan. Cantidades menores en comparación con la encapsulación de CUR, puesto que la API se incorpora en la segunda etapa de adición depende tanto del agente de recubrimiento como de su interacción con la zeína.

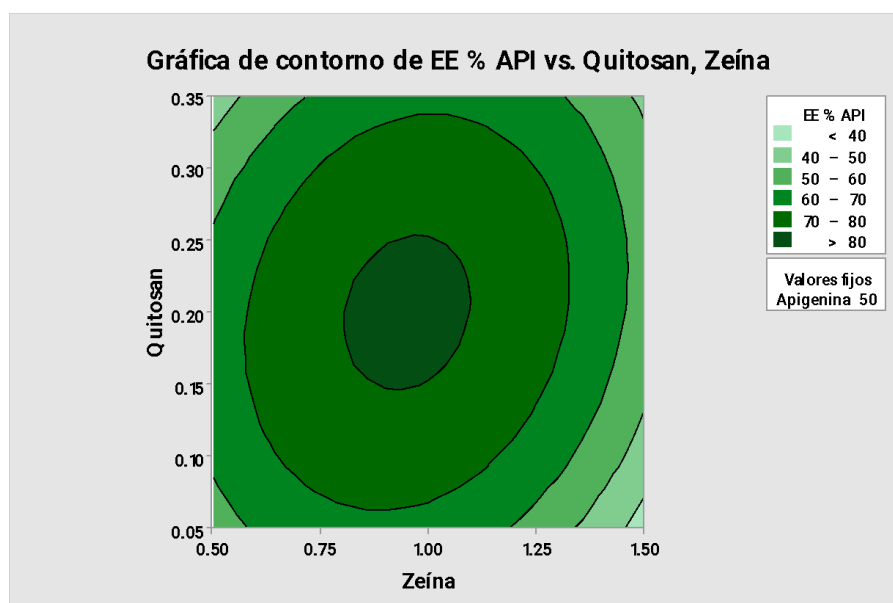


Figura 8. Gráfica de contornos para EE % CUR de acuerdo con la cantidad suministrada de zeína y quitosan en %.

Una vez obtenido los valores de las variables independientes (TP, IPD, PZ, EE%) se calculó la función de deseabilidad con el Software estadístico (Minitab versión 17) para obtener las cantidades óptimas de zeína, quitosan, API y CUR, la cual se muestra en la Figura 9.

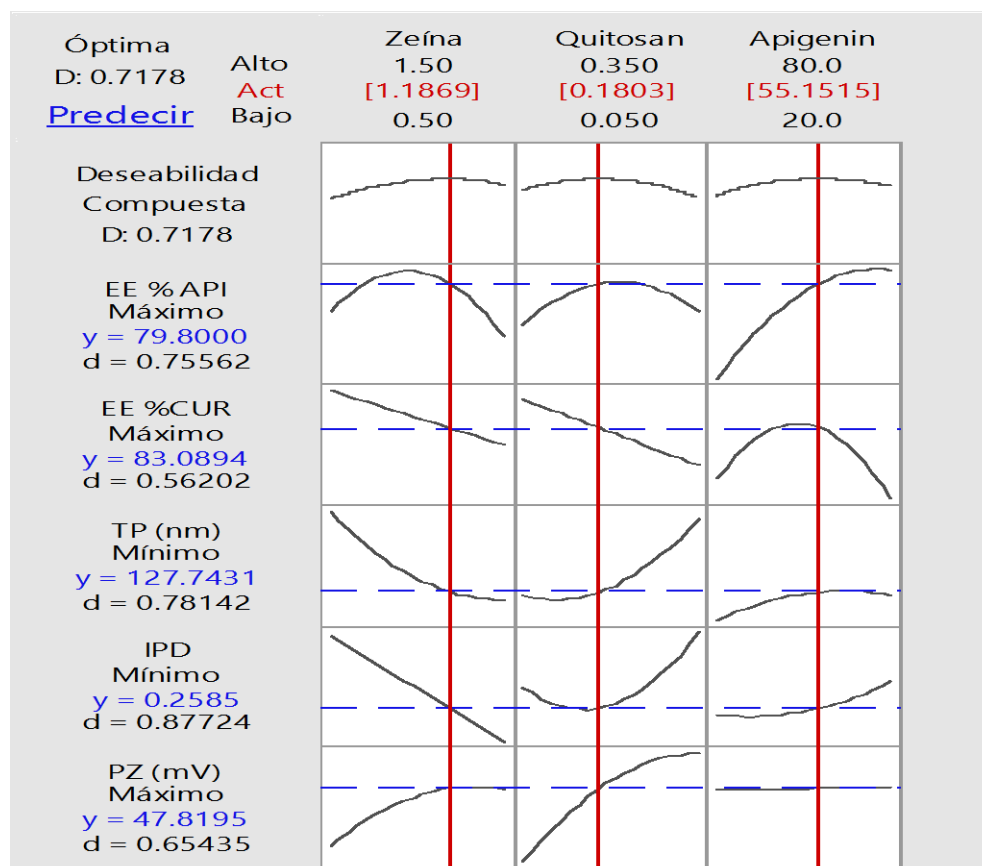


Figura 93. Optimización de la respuesta: EE% API, EE%CUR, TP (nm), IPD, PZ (mV) mediante la función de deseabilidad.

De acuerdo con la función de deseabilidad (0.7178), las condiciones óptimas para obtener el NC API-CUR fueron 1.18% p/v de zeína, 0.18% p/v de quitosan, 0.55 mg de API y 0.45 mg de CUR. La predicción de las variables respuesta con la función de deseabilidad se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Predicción de las variables respuesta con la función de deseabilidad

Respuesta	Valor Teórico
TP (nm)	127.8
IPD	0.259
ζ (mV)	47.8
EE% CUR	83.08
EE % API	79.8

Con estas condiciones optimizadas se prosiguió a la fabricación de los lotes experimentales por triplicado para corroborar la predicción del modelo matemático. La caracterización de estos se muestra en la Tabla 6. Se muestra una diferencia mínima entre el valor teórico y el valor experimental, por lo que las condiciones optimizadas de los componente de la formulación son adecuados para obtener un NC API-CUR de tamaño nanométrico, monodisperso y estable. Se estima que la formulación implementada y el método de desplazamiento de solvente fueron efectivos para obtener resultados con una diferencia mínima a los resultados teóricos.

Tabla 6. Caracterización de lotes experimentales fabricados con las condiciones optimizadas.

Respuesta	Valor teórico	Valor experimental
TP (nm)	127.8	137.4 ± 6.1
IPD	0.259	0.300 ± 0.06
ζ (mV)	47.8	50.1 ± 3.7
EE CUR (%)	83.08	80.28 ± 1.2
EE API (%)	79.8	79.7 ± 1.6

5.2 Caracterización química del NC API-CUR

5.2.1 DSC

En las Figuras 10 y 11 se muestran los resultados de DSC correspondiente a la comparación de las materias primas y el NC API-CUR; y la mezcla física respectivamente. Para la CUR se presenta un pico correspondiente al punto de fusión (82.4 °C); en el caso de la API presenta varios picos a diferentes señales de punto de fusión. Sin embargo, el más representativo es el que se encuentra en 369.3 °C, el cual concuerda con lo ya reportado en la literatura. Por otro lado, el punto de fusión del quitosán se presenta en 98.2 °C y el de la zeína en 76.5 °C.

Los distintos picos en la señal de la API presentados a 71.4 °C, 112 °C, 133.5 °C, 169.3 °C, 194.2 °C, 322.9 °C Y 368.3 °C, sugieren que el estado de la API es cristalino. Las sustancias cristalinas suelen presentar picos de fusión bien definidos, mientras que las sustancias amorfas pueden mostrar transiciones más amplias. Lo que sugiere que la CUR se presenta en forma amorfa, al no presentar el punto de fusión reportado, dentro del intervalo de 176-181 °C y presentarse en un pico ancho a 82.4 °C.

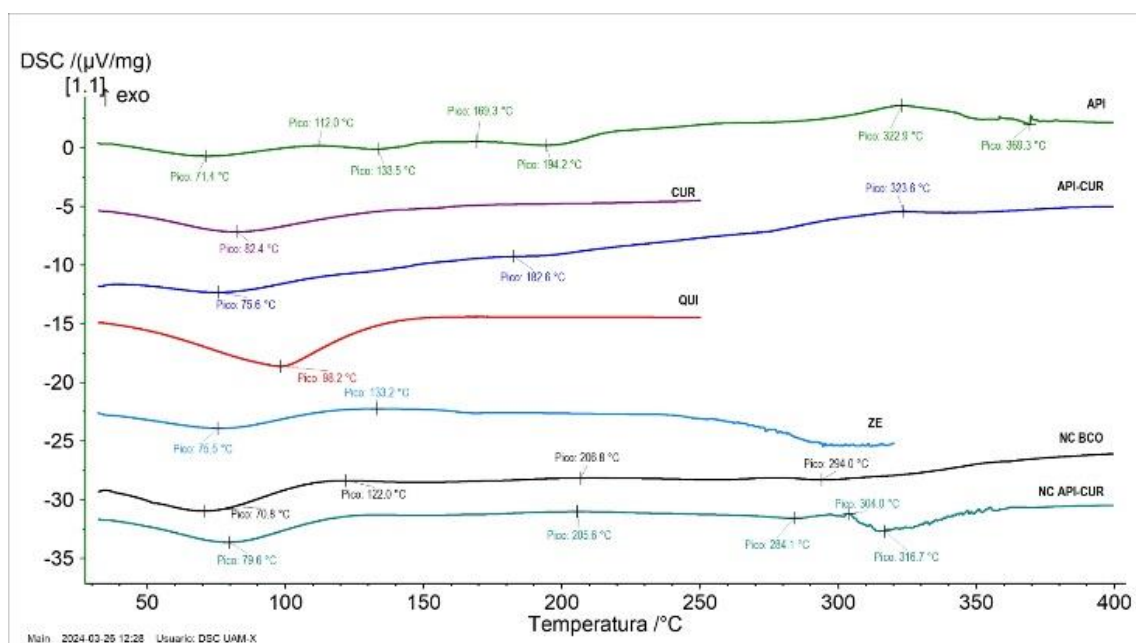


Figura 10. DSC para la comparación de la materia prima con el NC API-CUR.

Al analizar la mezcla física de la formulación del NC API-CUR (Figura 11), se observan picos de fusión a 82.5 y 306.3 °C, sugiriendo un desplazamiento de la

temperatura de fusión CUR y API. Sin embargo, al observar el NC API-CUR, tiene señalizaciones en 79.6 °C desplazando la señal de la CUR hasta 205.6- 284.1 °C. La señal de la materia prima del quitosán y la zeína se muestran desplazadas. Esto nos indica que todos los compuestos cambian al combinarse entre sí, presentando una interacción al ser encapsulados en el NC API-CUR.

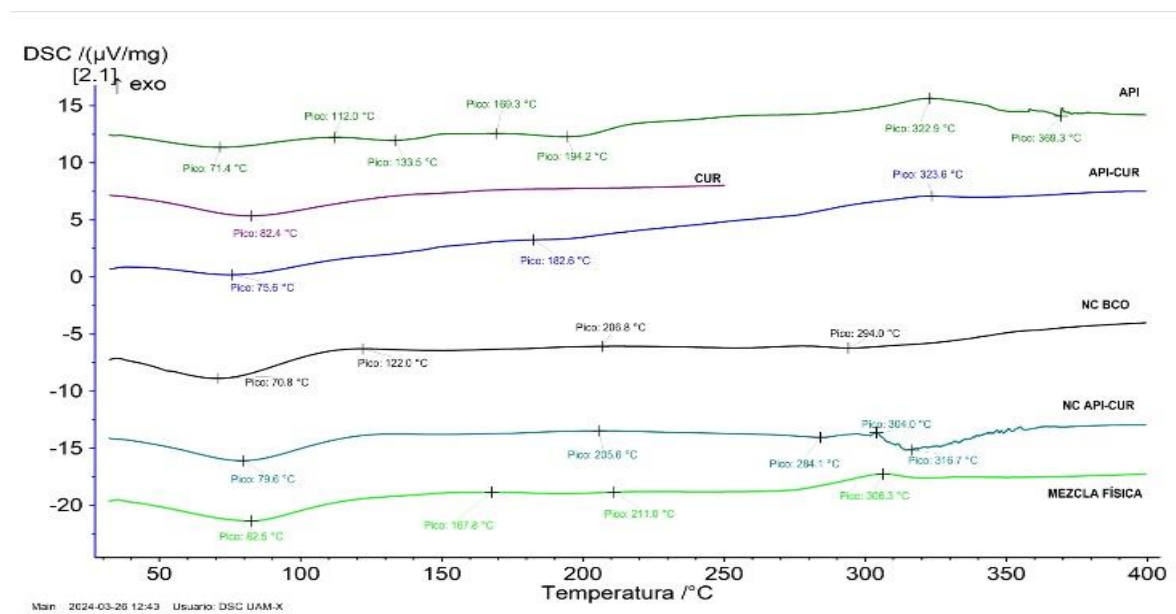


Figura 11. DSC para la comparación de la materia prima con la mezcla física del NC API-CUR

5.2.2 Espectroscopia IR

La Figura 12 muestra el espectro de IR para el NC API-CUR y las materias primas, ejemplifica las interacciones químicas de los compuestos utilizados para la fabricación del NC API- CUR. En el espectro infrarrojo (IR) de la CUR (rojo), se encuentran los siguientes grupos funcionales:

- Enlaces alquenos (C=C): La curcumina tiene dos dobles enlaces conjugados (alquenos) en su estructura. Las vibraciones de estiramiento C=C aparecen típicamente en la región de 1600-1620 cm^{-1} en el espectro IR.
- Grupo cetona (C=O): El grupo cetona de la curcumina, que forma parte de la estructura de la β -dicetona, produce vibraciones de estiramiento C=O. En el espectro IR, se observa una banda de absorción alrededor de 1660-1690 cm^{-1} debido al grupo carbonilo.

- Hidroxilo fenólico (OH): la curcumina tiene grupos hidroxilo fenólicos, que exhiben vibraciones de estiramiento O-H en el espectro IR. Estas vibraciones aparecen típicamente en la región de 3200-3600 cm^{-1} .
- Anillos aromáticos: Es posible observar bandas de absorción en el rango de 1450-1600 cm^{-1} debido a las vibraciones de flexión C-H en los anillos aromáticos.

Los resultados concuerdan con lo reportado por Ibañez et al. (2023), confirmando la presencia de la CUR en el NC. En este artículo, se hace alusión principalmente a tres bandas débiles que aparecen en la región 1548 cm^{-1} atribuidas a enlaces C-H acoplados a movimientos del anillo aromático.

En cuanto al espectro de IR de la API (negro) se presentan señales de los siguientes grupos funcionales:

- Hidroxilo fenólico (OH): Los grupos hidroxilo fenólicos exhiben vibraciones de estiramiento O-H en el espectro IR. Estas vibraciones aparecen en la región de 3336 cm^{-1} .
- Grupo cetona (C=O): El grupo cetona produce vibraciones de estiramiento C=O. En el espectro IR, se observa una banda de absorción alrededor de 1660 cm^{-1} debido al grupo carbonilo. Se observan otras vibraciones entre 1269 - 1494 cm^{-1} pertenecientes a los enlace C-O y C-H.
- Anillos aromáticos: Es posible observar bandas de absorción en el rango de 1450-1600 cm^{-1} debido a las vibraciones de flexión C-H en los anillos aromáticos.
- Conjugación: La conjugación da como resultado un desplazamiento de las bandas de absorción C=C a números de onda más bajos.

Tanto las bandas de la CUR y la API individuales disminuyen o desaparecen al ser incorporados en las nanopartículas, mostrando que las señales del NC API-CUR corresponden a la zeína y el quitosan principalmente, por lo cual se tiene el acoplamiento de la API y CUR en el nanocomplejo.

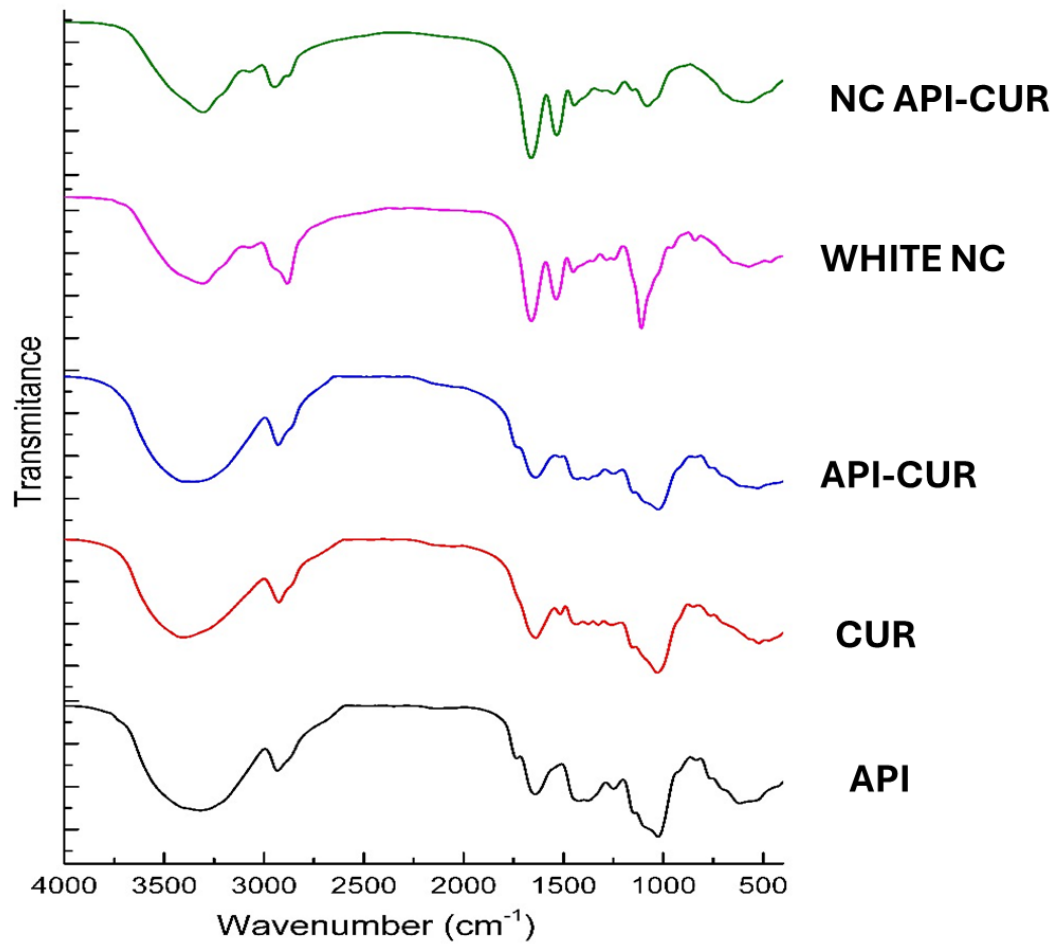


Figura 12. Espectros de IR para la comparación de la materia prima con el NC API-CUR.

5.3 Perfil de liberación

En la Figura 13 se muestra el perfil de liberación de la API como activo libre (azul) en relación con la API en el NC API-CUR (naranja). En las primeras horas, la liberación del activo libre es mayor debido a que no presenta ninguna barrera del agente encapsulante, liberando un 60% a la primera hora. En contraste, el NC API-CUR alcanza un porcentaje de liberación del 40% aproximadamente a las 8 h, teniendo una liberación más lenta con respecto a la API libre debido a su incorporación en el NC API-CUR, teniendo que superar la salida desde la nanopartícula.

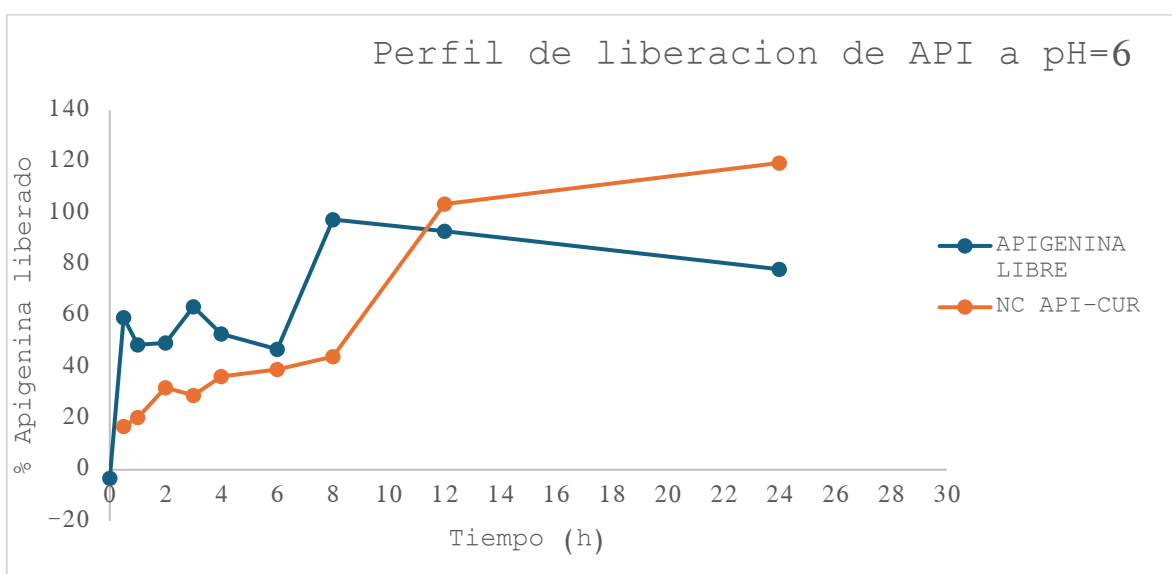


Figura 13. Perfil de liberación de API a pH 6 para la comparación de la materia NC API-CUR vs API libre.

En la Figura 14 se muestra el perfil de liberación de la CUR como activo libre (azul) en relación con el NC API-CUR (naranja), observando que la CUR libre mantiene una liberación del 40% hasta las 6 h, en comparación con el NC API-CUR que libera pausadamente la CUR hasta alcanzar una liberación del 20% a las 6 h. Logrando una liberación menor al ser incorporada en el NC, teniendo que superar la barrera del agente de recubrimiento (quitosan) y luego la salida desde el agente encapsulante (zeína). Una vez que se supera esta barrera, se alcanza un 80 % de CUR liberada a las 12 h.

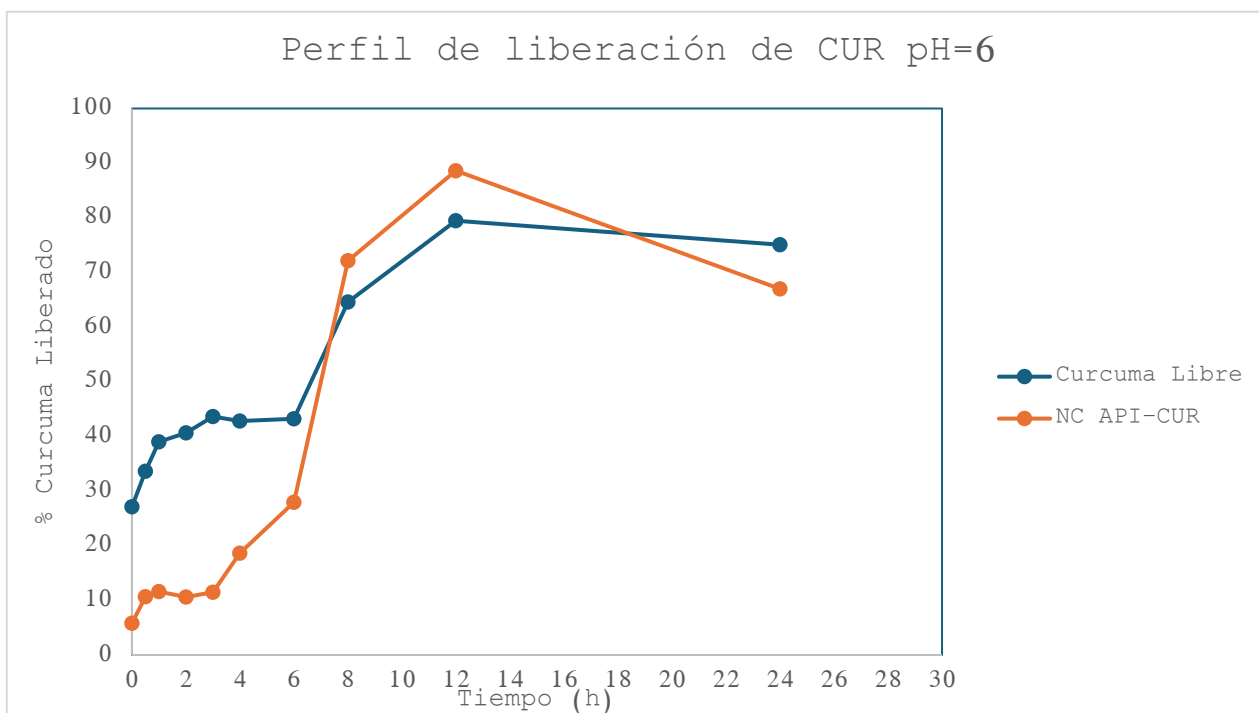


Figura 14. Perfil de liberación de CUR a pH 6 para la comparación de la materia NC API-CUR vs CUR libre.

6. Conclusión

Se logró implementar el método de desplazamiento del solvente con algunas modificaciones para la fabricación del NC API-CUR, obteniendo un sistema nanoestructurado sostenible para la coencapsulación de apigenina y curcumina optimizado mediante el diseño de experimentos.

Este estudio logró producir un nanosistema completamente biodegradable, monodisperso y con alta eficiencia de encapsulación para la administración simultánea de apigenina y curcumina. También, se obtuvo un producto más sostenible, utilizando únicamente materiales biodegradables y biocompatibles derivados de fuentes renovables, con potenciales propiedades antioxidantes, antimicrobianas o anticancerígenas. Estos hallazgos destacan la importancia de desarrollar productos con fármacos naturales para prevenir, controlar y tratar ciertas enfermedades.

La investigación en curso continúa explorando posibles áreas donde la eficacia del NC API-CUR sea significativa para algún tipo de celular de cáncer de mama.

7. Referencias

- ✓ Apigenina. (2020). Recuperado el 20 de febrero de 2024, de Scribd website: <https://es.scribd.com/doc/302704947/Apigenina>
- ✓ CDC español. (2023, July 28). ¿Qué es el cáncer de mama? Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm
- ✓ Cáncer de mama. (2024, febrero 10). MayoClinic.org. <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/breast-cancer/diagnosis-treatment/drc-20352475>
- ✓ Cáncer de mama - Tipos de tratamiento. (2012, junio 21). Cancer.net. <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-mama/tipos-de-tratamiento>
- ✓ Definición de nanomateriales y nanopartículas. (2014, marzo 6). Recuperado el 20 de febrero de 2024, de Malvernpanalytical.com website: <https://www.malvernpanalytical.com/es/industries/nano-materials>
- ✓ De Jesús y Sandra Loera Serna, A. G. (2021). contra el cáncer. Recuperado el 20 de febrero de 2024, de Wwww.uv.mx website: <https://www.uv.mx/veracruz/microna/files/2022/02/ART02-V4N2.pdf>
- ✓ Farghadani, R., & Naidu, R. (2022). Curcumin as an enhancer of therapeutic efficiency of chemotherapy drugs in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2144.
- ✓ García, M. L., & Pérez, R. S. (2020). *Journal of nanoparticle research*. Avances en la caracterización de nanopartículas, 45-57.
- ✓ Gómez-Gaete, C. (2019) Nanopartícula poliméricas: tecnología y aplicaciones. *Sociedad de Farmacología de Chile*, 7(2), 7-16.
- ✓ González-Albadalejo, J., Sanz, D., Claramunt, R. M., Lavandera, J. L., Alkorta, I., & Elguero, J. (s/f). Title in Spanish: Curcumina y curcuminoides: química, estudios estructurales y propiedades biológicas. Recuperado el 20 de febrero de 2024, de Analesranf.com website: https://analesranf.com/wp-content/uploads/2015/81_04/8104_02.pdf
- ✓ Gonzalez Villa, E. (18 de Noviembre de 2015). Herbolario de confianza. Obtenido de Para que sirve la Apigenina: <https://herbolariodeconfianza.es/blog/para-que-sirve-la-apigenina-n593>

- ✓ Ibañez, E. (7 de Julio de 2023). Medicina integrativa. Obtenido de Cúrcuma y cáncer de mama: <https://www.xn--draestheribaez-1nb.com/curcuma-y-cancer-de-mama>.
- ✓ López, A. B., & Martínez, C. D. (2019). Técnicas de medición del potencial z en nanopartículas. *Revista de Nanotecnología*, 112-125.
- ✓ Minitab.. (2024). ¿Qué son los diseños de superficie de respuesta, los diseños centrales compuestos y los diseños de Box-Behnken?. MINITAB. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/#:~:text=Un%20dise%C3%B1o%20de%20Box%2DBehnken%20es%20un%20tipo%20de%20dise%C3%B1o,inyecci%C3%B3n%20una%20pieza%20de%20pl%C3%A1stico>.
- ✓ Münch, G., Venigalla, M., Sonogo, S., & Gyengesi, E. (2015). Curcumin and Apigenin - novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 10(8), 1181. doi:10.4103/1673-5374.162686
- ✓ Nanomateriales. (2024). Recuperado el 20 de febrero de 2024, de Europa.eu website:https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/nanomaterials/es/index.htm
- ✓ ONU Crece la carga mundial de cáncer en medio de una creciente necesidad de servicios. (s/f). Recuperado el 20 de febrero de 2024, de Who.int website:<https://www.who.int/es/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing-amidst-mounting-need-for-services>
- ✓ ONU Cáncer. (s/f). Recuperado el 20 de febrero de 2024, de Who.int website: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- ✓ Pro, V. (2022, octubre 24). ¿Qué es la apigenina? Beneficios, dosis y riesgos. Recuperado el 20 de febrero de 2024, de vitalityPRO | Suplementos potenciadores de NAD website: <https://vitality-pro.com/es/apigenin/benefits-dosage-side-effects-api/>
- ✓ ¿Qué es el cáncer? (1980, January 1). Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>