

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Desarrollo de un suplemento con mayor biodisponibilidad de curcumina para el control de la osteoartritis asociada a la inflamación”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

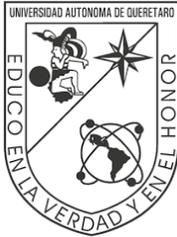
Presenta:

I.A. Eréndira Rivera Pérez

Dirigida por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Querétaro, Qro. Noviembre, 2021



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

“Desarrollo de un suplemento con mayor biodisponibilidad de curcumina para el control de la osteoartritis asociada a la inflamación”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A. Eréndira Rivera Pérez

Dirigida por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Presidente

Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez

Secretario

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Vocal

Firma

Dra. Iza Pérez Ramírez

Suplente

Firma

Dr. Carlos Regalado González

Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Noviembre, 2021

México

Agradecimientos

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación y así cumplir una meta en mi trayectoria profesional.

Expreso un profundo agradecimiento a la Dra. Rosalía Reynoso Camacho por su dirección en este proyecto, por sus valiosas aportaciones que hicieron posible la conclusión de este trabajo.

Gracias sinceras a: Dr. Mario Rodríguez, Dra. Iza Pérez, Dr. Carlos Regalado, la Dra. Minerva Ramos y Dra. Silvia Amaya quienes me asesoran técnicamente y aportaron valiosas observaciones durante el proyecto de investigación.

A la Dra. María Antonieta Carbajo y Dr. Martín García del Bioterio de la Universidad Autónoma de México, campus Juriquilla, por su asesoría tan profesional en el manejo de animales.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de bioquímica molecular: Alexandro, Ana, Yazmin, Karen, Haiku, Alejandra, Joel, y Yuri por su disponibilidad incondicional en apoyar en cualquier momento del desarrollo de esta investigación.

Dedicatorias

A Martín, por su amor y apoyo incondicional.

A Vania y Emmanuel, por ser el regalo más grande en mi vida.

A mis padres† y hermano, por su ejemplo, amor y apoyo incondicional.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



RESUMEN

La osteoartritis es una enfermedad articular caracterizada por la degradación de los condrocitos y la matriz extracelular localizados en el cartílago; esta degradación se asocia a un proceso de inflamación, generando dolor y deformación. Es una enfermedad incapacitante común que puede representar una pérdida de 2.3 años de vida saludable. Para reducir la progresión de la enfermedad, se recomienda el consumo de curcumina por sus propiedades antiinflamatorias, sin embargo, su absorción es muy limitada. El objetivo de este proyecto fue aumentar la absorción de la curcumina utilizando nanoemulsiones para desarrollar un suplemento. Primero, se elaboraron nanoemulsiones utilizando los métodos de temperatura de inversión de fase y ultrasonificación. Los ingredientes utilizados incluyeron curcumina, tween 80, aceite de coco, aceite de oliva o aceite de soya, y NaCl o MgCl₂. La absorción de curcumina se determinó *in vivo*. Primero se evaluó la solubilidad de la curcumina en los tres diferentes aceites; el aceite de coco mostró tener la mayor solubilidad. La eficiencia de incorporación de curcumina en la nanoemulsión se determinó en diferentes concentraciones de tween 80 (10, 15 y 20 %), NaCl (0.2, 0.4 M) o MgCl₂ (3.1 y 5.3 mM); la mayor eficiencia (> 95 %) se obtuvo utilizando 20 % de tween 80 y 5.3 mM MgCl₂. Se utilizó espectrometría infrarroja para determinar la interacción de los componentes de la nanoemulsión, donde se identificaron enlaces de hidrógeno en la formación de micelas. Las nanoemulsiones se secaron por aspersión utilizando colágeno hidrolizado para microencapsularlas, obteniendo una eficiencia de encapsulación del 54 %. El microencapsulado fue fortificado con vitamina C para desarrollar el suplemento. Se determinó el tamaño de partícula e índice de polidispersidad (IPD) de las nanoemulsiones, obteniéndose nanopartículas de tamaño de 56 y 77 nm con un IPD entre 0.13-0.27. El índice de solubilidad del suplemento se determinó obteniendo un resultado del 84%. Finalmente, la absorción fue mayor en nanoemulsión (13 veces) y suplemento (14 veces) que la curcumina sin emulsificar. El suplemento desarrollado contiene curcumina nanoemulsificada estabilizada con magnesio, microencapsulada en colágeno hidrolizado y fortificada con vitamina C, que podría brindar beneficios para el control de la osteoartritis.

(Palabras clave: Osteoartritis, curcumina, colágeno hidrolizado, vitamina C, magnesio).

ABSTRACT

Osteoarthritis is a joint disease characterized by the degradation of chondrocytes and the extracellular matrix located in the cartilage; this degradation is associated with a process of inflammation, generating pain and deformation. It is a common disabling disease and represents a loss of 2.3 years of healthy life. To reduce the progression of the disease, the consumption of curcumin is recommended for its anti-inflammatory properties, however, it has a very limited absorption. The objective of this project was to increase the absorption of curcumin using nanoemulsions to develop a supplement. The nanoemulsions were made using phase inversion temperature and ultrasonication methods, the ingredients used were curcumin, tween 80, coconut oil, olive oil or soybean oil, and NaCl or MgCl₂. The curcumin absorption was determined *in vivo*. The solubility of curcumin in the oils was evaluated; coconut oil was shown to have the highest solubility. The efficiency of incorporation of curcumin in the nanoemulsion was determined at different concentrations of tween 80 (10%, 15% and 20%), NaCl (0.2 and 0.4 M) or MgCl₂ (3.1 and 5.3 mM), the highest efficiency (> 95%) was obtained using 20% of tween 80 and 5.3 mM MgCl₂. Infrared spectrometry was applied to determine the interaction of the components of the nanoemulsion. In this regard, hydrogen bonds were identified in the formation of micelles. The nanoemulsions were spray dried using hydrolyzed collagen to microencapsulate the nanoemulsion, obtaining an encapsulation efficiency of 54% with a particle size and polydispersity index (IPD) of 56-77 nm and 0.13-0.27, respectively. The microencapsulate was fortified with vitamin C to develop the supplement. The solubility index of the final product was determined obtaining a result of 84%. Finally, absorption was higher in nanoemulsion (13 times) and supplement (14 times) than curcumin without emulsification. The developed supplement contains nanoemulsified curcumin stabilized with magnesium, microencapsulated in hydrolyzed collagen and fortified with vitamin C, which could provide benefits for the control of osteoarthritis.

(Keywords: Osteoarthritis, curcumin, hydrolyzed collagen, vitamin C, magnesium).

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Osteoartritis	16
2.1.1. Cartílago.....	16
2.1.2. Membrana sinovial	18
2.2. Suplementos para la osteoartritis.	19
2.3. Vitamina C	20
2.4. Magnesio	21
2.5. Colágeno hidrolizado	21
2.6. Curcumina	22
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo general.....	27
4.2. Objetivos específicos	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Materiales	27
5.2. Solubilidad de curcumina.....	27
5.3. Preparación de nanoemulsiones cargadas con curcumina.....	28
5.3.1. Método de temperatura de inversión de fase.	28
5.3.2. Método de ultrasonido.....	29
5.4. Caracterización de la nanoemulsiones cargadas con curcumina.	30
5.4.1. Porcentaje de eficiencia de incorporación de curcumina.	30
5.4.2. Espectro infrarrojo trasformada de Fourier (FTIR).	30
5.5. Microencapsulación de la nanoemulsión de curcumina.....	31
5.5.1. Porcentaje de eficiencia de microencapsulación (%EM).....	31
5.6. Elaboración del suplemento.....	32

5.7. Índice de solubilidad.	32
5.8. Índice de dispersabilidad.	32
5.9. Tamaño de partícula y índice de polidispersidad de nanoemulsiones y suplemento.	33
5.10. Estudios de la absorción de curcumina nanoemulsificada y microencapsulada.....	33
5.10.1. Absorción de polifenoles en suero de nanoemulsiones preparadas con diferentes concentraciones de tween 80 y sales.....	35
5.10.2. Absorción de polifenoles en suero comparando el método de temperatura de inversión de fase y ultrasonido.....	35
5.10.3. Absorción de polifenoles en suero del microencapsulado.....	36
5.11 Cuantificación de compuestos fenólicos totales en suero.....	36
5.12 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo DPPH y ABTS.	36
5.12.1 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	37
5.12.2. Método ABTS (ácido 2, 2' Azinobis-3-etil- benzotiazolin-6 sulfónico). 37	
5.13. Análisis estadístico	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	38
6.1. Solubilidad de curcumina.....	38
6.2. Caracterización de nanoemulsiones.....	40
6.2.1. Eficiencia de incorporación de curcumina con diferentes concentraciones de NaCl y Tween 80.....	40
6.2.2. Eficiencia de incorporación de curcumina utilizando el método de ultrasonido (US).	42
6.2.3. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de las nanoemulsiones elaboradas con curcumina.	43
6.3. Determinación de la absorción de curcumina en suero de rata.	47
6.3.1. Estimación del tiempo de absorción de curcumina en suero de rata. ...	47

6.3.2. Concentración de polifenoles en suero de nanoemulsiones preparadas con diferentes concentraciones de tween 80 y sales	48
6.4. Microencapsulación de curcumina.....	53
6.4.2. Índice de solubilidad e índice de dispersión de microencapsulado (suplemento).....	56
6.4.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersidad de las nanoemulsiones y microencapsulado (suplemento).....	58
6.6. Concentración de curcumina en suero de animales tratados con nanoemulsión y microencapsulado (suplemento) de curcumina	60
6.7. Capacidad antioxidante DPPH y ABTS	62
6. CONCLUSIONES	65
7. REFERENCIAS.....	66

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Página
1. Diseño experimental factorial para la preparación de emulsiones utilizando diferentes concentraciones de NaCl y tween 80.	29
2. Diseño experimental factorial para la preparación de emulsiones utilizando diferentes concentraciones de MgCl ₂ y tween 80.	30
3. Espectro FTIR y picos asignados en las nanoemulsiones preparadas por temperatura de inversión de fase y ultrasonido.	46
4. Concentración de compuestos fenólicos en suero de rata tratadas con diferentes presentaciones de curcumina.	52
5. Fórmulas de microencapsulado de nanoemulsiones de curcumina.	54

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Página
1. a) Estructura de la articulación, b) Cartílago sano y cartílago con osteoartritis (OA).	17
2. Vías de señalización y cambios estructurales en el desarrollo de la osteoartritis. ADAMTS = a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs. IL = interleucina. MMP = metaloproteinasa de matriz. TNF = factor de necrosis tumoral. IFN = interferón. IGF = factor de crecimiento similar a la insulina. TGF = factor de crecimiento transformante. VEGF = factor de crecimiento endotelial vascular.	18
3. Estructura química de la curcumina en su forma ceto y forma enol.	23
4. Ruta metabólica de la ingesta oral de curcumina.	24
5. Esquema del método de nanoemulsión de baja energía. Método de temperatura de inversión de fase (TIF).	25
6. Solubilidad de curcumina en tres diferentes aceites.	39
7. Interacción dipolo - dipolo entre el grupo fenólico de la curcumina y el grupo carboxilo del ácido láurico.	39
8. Efecto de diferente concentración de NaCl (a), MgCl ₂ (b) y Tween 80 sobre el porcentaje de eficiencia de incorporación de curcumina en la emulsión utilizando el método de temperatura de inversión de fases.	42
9. Porcentaje de eficiencia de incorporación de curcumina en la emulsión a una concentración 5.3 mM de MgCl ₂ , utilizando el método de ultrasonido (US) a diferentes tiempos y comparando con el método de TIF.	43
10. Espectro FTIR de nanoemulsiones preparadas por TIF, US, curcumina pura, aceite de coco, tween 80 y curcumina en aceite.	45
11. Nanoemulsión de curcumina por temperatura de inversión de fase.	47

12. Concentración de polifenoles en suero después de la administración de nanoemulsión de curcumina a una dosis de 100 mg/kg. 48
13. Polifenoles totales en suero de ratas tratadas con nanoemulsiones preparadas con diferentes concentraciones de sales y tween 80. 50
14. Concentración de polifenoles totales en suero de ratas tratadas con diferentes nanoemulsiones de curcumina preparadas con el método de temperatura de inversión de fase (TIF) y ultrasonido (US) durante 9 minutos. 52
15. Índice de solubilidad de la (a) e índice de dispersabilidad (b) de curcumina microencapsulada (suplemento) utilizando diferentes materiales de pared. 57
16. Tamaño de partícula (a) y porcentaje de índice de polidispersidad (b) de las nanoemulsiones y del microencapsulado (suplemento) de curcumina. 60
17. Concentración de compuestos fenólicos en suero de curcumina en nanoemulsión y microencapsulada. 61
18. Capacidad antioxidante medida por los ensayos DPPH (a) y ABTS (b) de la curcumina en nanoemulsiones y suplemento, así como en suero de ratas tratadas con estos productos. 65

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1. INTRODUCCIÓN

En México las enfermedades reumatoides se ubican dentro de las 10 primeras causas de invalidez y se presentan principalmente en adultos mayores con una prevalencia del 10.5%, de las cuales del 50 al 80 % de personas con la enfermedad son mujeres mayores a 45 años y dicha patología incrementa con la edad (Peláez-Ballestas *et al.*, 2011).

La osteoartritis es una enfermedad del cartílago articular y de la célula que lo produce, el condrocito. El cartílago está constituido por condrocitos y por una matriz extracelular (ME) que es una red de colágena (II, IX y XI) y proteoglicanos. El daño al cartílago se debe a la tensión mecánica, así como a la actividad enzimática de las metaloproteasas (principalmente MMP-2,-3,-13) que degradan a los componentes estructurales de la ME. Se ha sugerido que las citocinas proinflamatorias participan en el daño inicial al cartílago al inhibir la expresión del colágeno tipo II, al inducir la síntesis de metaloproteasas y al promover la apoptosis de condrocitos (Peláez-Ballestas *et al.*, 2011; Espinosa- Morales *et al.*, 2018).

Por lo tanto, al inhibir cualquiera de estos procesos se produce una mejoría en el control de la enfermedad, y esto se ha utilizado como base para el desarrollo de suplementos. Dentro de los activos importantes utilizados en los suplementos para osteoartritis que contribuyen en la disminución del dolor y en la regeneración articular se encuentran la glucosamina, condroitina e hidrolizado de colágeno, siendo esta proteína muy abundante en las articulaciones, comparado con la glucosamina (Kisling *et al.*, 2019; Chen & Brown, 2020). Se ha demostrado que el hidrolizado de colágeno presenta mayores beneficios a la salud, comparado con la glucosamina (Puigdellivol *et al.*, 2018). Los hidrolizados de colágeno contienen una gran cantidad de aminoácidos de glicina y prolina, dos aminoácidos esenciales para la estabilidad y regeneración del cartílago; la administración de este agente estimula a los condrocitos para sintetizar la matriz de colágeno en la ME (Lim *et al.*, 2019).

Las vitaminas también son adicionadas a los suplementos; como es el caso de la vitamina C, la cual también actúa como coenzima para la reticulación dependiente de la prolina y la glicina del colágeno en el cartílago y ME de tejido

conectivo (López *et al.*, 2012). De los minerales, el magnesio (Mg) es uno más utilizados en los suplementos; tiene la capacidad de disminuir los niveles de citocinas y neurotransmisores inflamatorios. Se ha detectado que la deficiencia de Mg provoca una reducción en la cantidad de proteoglicanos y en el tamaño de los condrocitos articulares con una disminución significativa en el ancho del cartílago articular (Zhang *et al.*, 2016).

Dentro de los compuestos recomendados con efectos antiinflamatorios se encuentra la curcumina, también se ha reportado que es capaz de inhibir enzimas como la colagenasa, la elastasa y la hialuronidasa (Lim *et al.*, 2019). A pesar de que se ha demostrado los amplios beneficios de la curcumina, ésta presenta una limitada absorción intestinal (alrededor del 2%) y la mayor parte de la curcumina ingerida se excreta a través de las heces; por lo tanto, mejorar su biodisponibilidad resulta de gran relevancia para sus beneficios a la salud.

Existen diferentes estrategias propuestas para aumentar la absorción intestinal, por ejemplo, formación de liposomas, nanopartículas de curcumina y nanoemulsiones de curcumina con las cuales se ha incrementado hasta 19.2 veces su absorción (Jäger *et al.*, 2014). Las nanoemulsiones, con diámetros de gota inferiores a 100 nm, son la formación espontánea de micelas estables que consisten en agua, aceite y tensoactivos. Las nanoemulsiones ofrecen ventajas de transparencia óptica, estabilidad termodinámica, estabilidad a largo plazo y facilidad de preparación (Lin *et al.*, 2014). Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto de investigación fue desarrollar un suplemento con mejor biodisponibilidad de curcumina y adicionado con ingredientes funcionales que podrían contribuir en el control de la osteoartritis.

2. ANTECEDENTES

2.1. Osteoartritis

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular degenerativa caracterizada por alteraciones en la integridad del cartílago y el hueso subcondral. La OA no solo es una enfermedad de degradación del cartílago puramente mecánica, es una condición compleja que afecta a toda la articulación y la activación de las proteasas de la ME tiene un papel fundamental. Su patogenia es compleja debido a que factores genéticos, metabólicos y locales interactúan y originan un proceso de deterioro del cartílago, del hueso subcondral e inflamación sinovial. Los factores que tienen relevancia en el desarrollo de esta enfermedad son varios, entre los que se encuentran la edad, el sexo, el estilo de vida, la obesidad, la ocupación profesional o la genética (Loeser *et al.*, 2017).

2.1.1. Cartílago

La Figura 1 ilustra de forma muy general la estructura de unión de los huesos y las articulaciones, e ilustra una articulación sana (a) y una articulación con OA (b).

La principal proteína estructural del cartílago es el colágeno tipo II, el cartílago forma fibrillas finas de 10 a 20 nanómetros, constituidas por tres cadenas alfa 2 de un único tipo. El colágeno es sintetizado por el condroblasto, forma una malla que es estabilizada por otros tipos de colágeno y proteínas no colágenas, como la proteína de matriz oligomérica del cartílago, y proporciona resistencia y elasticidad al cartílago (Loeser *et al.*, 2017). Los agreganos (proteína central proteoglicada cartílago-específica, formada por 2316 aminoácidos, recibe el nombre de agregano por su propiedad de agregación) y otros proteoglucanos también participan en este proceso; estas atraen agua hacia el cartílago, proporcionando resistencia a la compresión (Glyn-Jones *et al.*, 2015).

El cartílago proporciona una superficie lisa con un coeficiente de fricción muy bajo, lo que permite un movimiento de deslizamiento eficiente durante el movimiento de la articulación. Esto se ve facilitado por una capa límite de lubricantes en la

superficie articular proporcionada por la lubricina y el ácido hialurónico, que son producidos por los condrocitos y las células sinoviales (Loeser *et al.*, 2017).

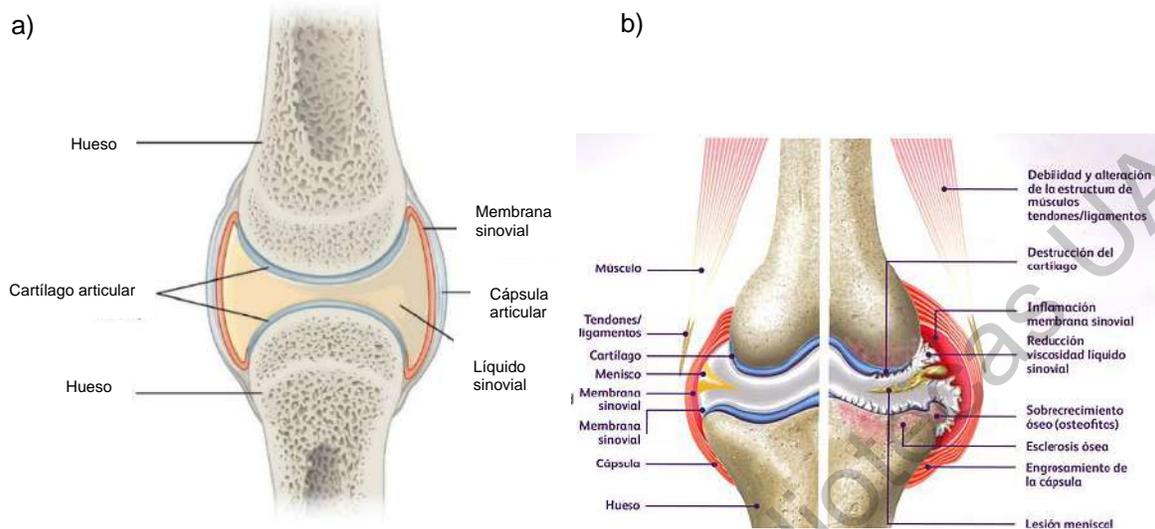


Figura 1. Estructura de la articulación: cartílago sano (a) y cartílago con osteoartritis (b) (<https://www.douglaslabs.es/blog/artritis-artrosis-artritis-reumatoide-y-otras-artritis/>).

La estructura del cartílago y su composición bioquímica están reguladas por los condrocitos; que en la OA producen varias proteínas de respuesta inflamatoria, como las citocinas, incluidas la IL-1 β , la IL-6 y el TNF- α que participan en el metabolismo de los condrocitos, y estimulan la síntesis y activación de las colagenasas (MMP-1, 3 y 13) y agrecanasas que su vez degradan la ME del cartílago y provocan la muerte de los condrocitos (Espinosa *et al.*, 2018). A su vez, las metaloproteinasas MMP-3 y las agrecanasas ADAMTS 5 (una desintegrina y metaloproteína con motivos de trombospondina 5) degradan el agrecano, seguido de una mayor actividad de la colagenasa MMP-13 que degradan el colágeno tipo II. Una vez que la red de colágeno se degrada se alcanza un estado que no se puede revertir (Figura 2) (Loeser *et al.*, 2017).

Se requiere la activación de la señalización de NF κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B) (p65/p50) para que los condrocitos expresen MMP-13, NOS, COX-2 e IL-1. Tras la activación, las cascadas ERK, JNK y p38 inducen y activan factores de transcripción, como la proteína

activadora 1 (cFos/cJun), Ets y la proteína de unión β CCAAT/potenciador, que regulan la expresión de genes implicados en eventos catabólicos e inflamatorios (Loeser *et al.*, 2017).

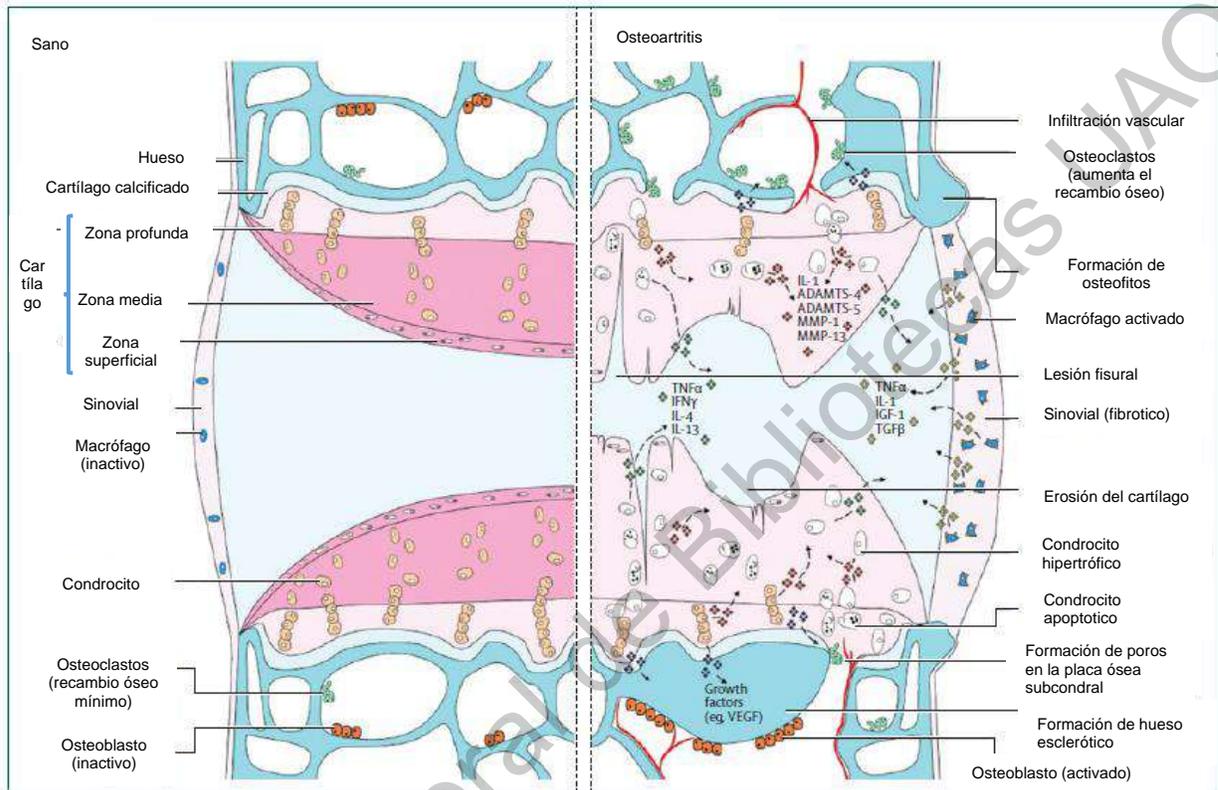


Figura 2. Vías de señalización y cambios estructurales en el desarrollo de la osteoartritis. ADAMTS. IL: interleucina. MMP; metaloproteína de matriz. TNF: Factor de Necrosis Tumoral. IFN: interferón. IGF: Factor de Crecimiento Similar a la Insulina. TGF; Factor de Crecimiento Transformante. VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (Figura adaptada de Glyn-Jones *et al.*, 2015).

2.1.2. Membrana sinovial

En la OA, la proliferación de sinoviocitos y la hipertrofia tisular son notables en la membrana sinovial con un aumento de la vascularización. Los sinoviocitos sintetizan lubricantes como el ácido hialurónico y la lubricina; estos contribuyen a una función articular óptima, pero muestran una capacidad lubricante reducida en la OA. Los sinoviocitos, como los condrocitos y los osteoblastos, también liberan mediadores inflamatorios y enzimas degradativas. La activación es probablemente

secundaria a mediadores inflamatorios y moléculas de la matriz del cartílago liberadas al inicio; después de lo cual, el tejido sinovial impulsa la degeneración progresiva de la articulación en un ciclo de retroalimentación positiva (Glyn-Jones *et al.*, 2015).

La presencia de inflamación en la membrana sinovial en la OA puede ser de suma importancia en el proceso de deterioro del cartílago articular, dado que la membrana sinovial activada sintetiza y libera al medio múltiples mediadores de inflamación, como proteasas, citocinas catabólicas proinflamatorias, mediadores lipídicos y radicales libres, que intervienen y modulan el metabolismo condrocitario, con un claro predominio de los fenómenos catabólicos. Entre todos los mediadores de inflamación que intervienen en el catabolismo del cartílago articular, cabe destacar el papel de algunas MMP (colagenasas 1 y 3) y citocinas catabólicas de la familia de la IL-1 (IL-1, IL-1 β y IL-1Ra) y el TNF, radicales libres como el ON y eicosanoides como PGE₂, E-2 y LTB₄. Posteriormente, se origina un círculo que conduce a un mayor deterioro del cartílago, liberación de más mediadores proinflamatorios y destrucción progresiva de la ME. El tejido sinovial es capaz también de sintetizar IL-6, importante factor responsable de la destrucción ósea (Espinosa *et al.*, 2018).

2.2. Suplementos para la osteoartritis.

En el mercado existen una gran cantidad de suplementos dietéticos para pacientes con OA. Se han probado varios suplementos en ensayos clínicos y se ha demostrado que son tan efectivos como los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para disminuir los síntomas de la OA; ejercen efectos antioxidantes, antiinflamatorios o condroprotectores que pueden reducir el dolor crónico y el progreso de la enfermedad. Entre los más comunes se incluyen los suplementos que contienen condroitina y la glucosamina. Estos compuestos son precursores de tejidos articulares utilizados para disminuir la destrucción del cartílago causada por la OA (Lim *et al.*, 2019).

Liu *et al.* (2018) estudiaron 20 suplementos dirigidos para el control de la osteoartritis, dentro de su composición contenían como ingredientes funcionales

hidrolizado de colágeno, extracto de cáscara de maracuyá, extracto de *Boswellia serrata*, curcumina, picrogenol, L-carnitina, insaponificables de aguacate y soya, metilsulfonilmetanol, magnesio, vitamina C y vitamina D, estos suplementos demostraron tener efectos clínicamente importantes para la reducción del dolor y mejora de la actividad física a corto plazo en pacientes con OA. El estudio menciona que la glucosamina y condroitina, a pesar de que son los compuestos más utilizados en los suplementos, no proporcionan un efecto clínicamente importante sobre la OA, mientras que, algunos suplementos con hidrolizado de colágeno y curcumina parecen tener mayores efectos positivos a corto plazo sobre la OA.

En una revisión realizada por Grover y Samsom (2015), mencionan que los suplementos con antioxidantes presentan mayor evidencia de beneficio para el alivio del dolor y la función en la OA de rodilla, estos contienen compuestos insaponificables de aguacate, curcumina, vitamina C y frijol de soya.

2.3. Vitamina C

Existe evidencia que las células dentro de las articulaciones producen especies reactivas de oxígeno (ERO) y que el daño oxidativo es fisiológicamente importante. En estudios se ha encontrado que los condrocitos humanos y animales son fuentes potentes de ERO. La producción de peróxido de hidrógeno se ha demostrado en condrocitos humanos de edad avanzada después de la exposición a IL-1 o TNF- α . Se ha demostrado *in vitro* que el anión superóxido afecta negativamente a la estructura y la integridad del colágeno e *in vivo* parece ser responsable de la despolimerización de hialuronato del líquido sinovial. La vitamina C como antioxidante tiene un papel importante, particularmente en el espacio extracelular, donde las enzimas antioxidantes son escasas. La vitamina C proporciona una mayor defensa contra la lesión tisular cuando las enzimas intracelulares están saturadas para proteger contra los trastornos relacionados con la edad (Chui *et al.*, 2017).

La vitamina C, además de ser un antioxidante, realiza funciones bioquímicas que podrían ser clínicamente importantes en la OA. En primer lugar, la enzima lisilhidroxilasa es dependiente de la vitamina C, esta realiza la hidroxilación de

residuos específicos de prolina y lisina en el procolágeno, una modificación esencial para la estabilización de la fibrilla de colágeno madura. Además, la vitamina C es portadora de grupos sulfato, necesaria para la síntesis de glucosaminoglicanos (McAlindon & Felson, 1997; Chui *et al.*, 2017).

2.4. Magnesio

El magnesio es el segundo catión intracelular más abundante y actúa como un antagonista de los canales de calcio, desempeña un papel importante en las actividades reguladas por los flujos de concentración de calcio intracelular, es un mediador del dolor y tiene la capacidad de alterar los niveles de citocinas y neurotransmisores inflamatorios en humanos y animales (Shmagel *et al.*, 2018).

La ingesta de magnesio normalmente proviene de alimentos y agua ingeridos. Una mayor ingesta de magnesio se asocia con una menor prevalencia de artrosis de rodilla y estrechamiento del espacio articular (Lim *et al.*, 2019). Se considera que el magnesio existe en la matriz de cartílago hialino como fosfato tricálcico sustituido con Mg [(Ca, Mg)₃ (PO₄)₂]. Estudios han reportado que la deficiencia de Mg en roedores jóvenes provocó una disminución aparente en el número y el tamaño de los condrocitos articulares tibiales, con una disminución significativa en el ancho del cartílago articular. También se ha demostrado una reducción en la cantidad de proteoglicanos (Zhang *et al.*, 2016). Un estudio realizado a 2548 personas que tenían OA de rodilla demostró que una ingesta pobre de Mg se asocia con un mayor dolor y disfunción en la artrosis de rodilla (Shmagel *et al.*, 2018).

2.5. Colágeno hidrolizado

El colágeno hidrolizado (CH) consiste en una mezcla de diferentes péptidos obtenidos a partir de tejidos que contienen colágeno como huesos y la piel, o de las escamas y aletas de varios vertebrados, y se obtiene por la degradación hidrolítica y/o enzimática (Simons *et al.*, 2018). El CH tiene una composición de aminoácidos alta en glicina, prolina, hidroxilisina e hidroxiprolina, que son aminoácidos importantes en el cartílago. Se ha demostrado que el colágeno hidrolizado mejora

la función articular y es efectivo en el manejo de los síntomas asociados con la OA (Puigdellivol *et al.*, 2018). Los hidrolizados de colágeno pueden tener un efecto analgésico directo o proporcionar un conjunto de aminoácidos en el cuerpo que mejora la estructura de la ME (Ragle & Sawitzke, 2012).

Los estudios *in vitro* sugieren que un posible mecanismo de acción del CH es que aumenta la síntesis de proteoglicanos y colágeno tipo II (Ragle & Sawitzke, 2012). También participan en la inhibición de la pérdida de proteoglicano del cartílago, inhibición de la señalización de IL-6, las agregasas y MMP que median la degradación del cartílago en OA (Schadow *et al.*, 2017).

2.6. Curcumina

La curcumina (diferoluilmetano) es extraída del rizoma de la *Curcuma longa*, este es un polifenol de bajo peso molecular ($368.37 \text{ g mol}^{-1}$) (Araiza *et al.*, 2018). La curcumina ha sido estudiada por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales y analgésicas (Henrotin *et al.*, 2010). Los curcuminoídeos son los componentes esenciales de la cúrcuma, dentro de ellos se incluye la curcumina (77%), demetoxicurcumina (17%), bisdemetoxicurcumina (3%) y ciclocurcumina (Tayyem *et al.*, 2006). La estructura química de la curcumina presenta anillos aromáticos con grupos metoxilo e hidroxilo en posición orto, conectados a través de una cadena de siete carbonos que consiste en α - β insaturado y β dicetona. Molecularmente, la curcumina existe en las formas ceto (en condiciones ligeramente ácidas o neutras) y enol (en condiciones alcalinas) debido a la transferencia intramolecular de átomos de hidrógeno en la cadena de β -dicetona de la curcumina (Figura 3) (Jiang *et al.*, 2020).

La curcumina es una molécula insoluble en agua y altamente soluble en lípidos, también es soluble en solventes como metanol, acetona, etanol y dimetil sulfóxido (DMSO), es sensible a las temperaturas elevadas, luz, pH extremo, humedad y oxígeno (Araiza *et al.*, 2018).

Dentro de los beneficios de la curcumina se incluyen; propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, antiartríticas,

entre otras. Respecto a sus propiedades antiinflamatorias, se han realizado estudios clínicos en pacientes con OA tratados con curcuminoides (1500 mg/día dividida en tres dosis), estos presentaron una disminución del dolor (Panahi *et al.*, 214). En un estudio realizado con 367 pacientes, la administración de extractos de cúrcuma (1500 mg/día durante 4 semanas) mejoró el índice de OA y se encontró que su eficacia era mejor comparado con la del ibuprofeno (Kuptniratsaikul *et al.* 2014).

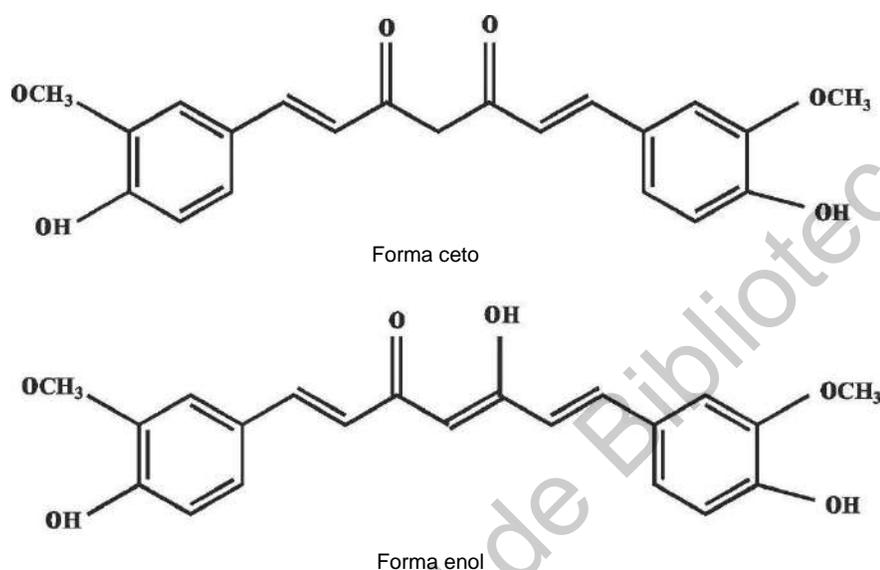


Figura 3. Estructura química de la curcumina en su forma ceto y forma enol (Adaptada de Jiang *et al.*, 2020).

La curcumina tiene un efecto inhibitorio en la OA en las sustancias involucradas en la vía inflamatoria, incluidas la lipoxigenasa, la COX2, la fosfolipasa, la colagenasa, la elastasa y la hialuronidasa. Además, la curcumina inhibe la activación de factores de transcripción activados por radicales libres como el NF kB y a la NOS (Bengmark, 2006). También reduce las citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-8 y MMP-13 (Kim *et al.*, 2012).

A pesar de los importantes beneficios de la curcumina, se ha demostrado que ésta presenta baja biodisponibilidad debido a que la mayor parte de la curcumina ingerida se excreta a través de las heces sin metabolizar, esto es debido a su baja solubilidad en agua, absorción en el intestino y al rápido metabolismo (Prasad *et al.*, 2014). Aunado a lo anterior, la pequeña parte que se absorbe se convierte en sus metabolitos, glucurónidos y sulfatos solubles en agua, este metabolismo se produce

activamente en el citosol intestinal y hepático. Por otro lado, también la curcumina tiene metabolismo alternativo por el microbiota intestinal que produce dihidrocurcumina y tetrahidrocurcumina a través de la reducción dependiente de NADPH (Figura 4) (Jäger *et al.*, 2014).

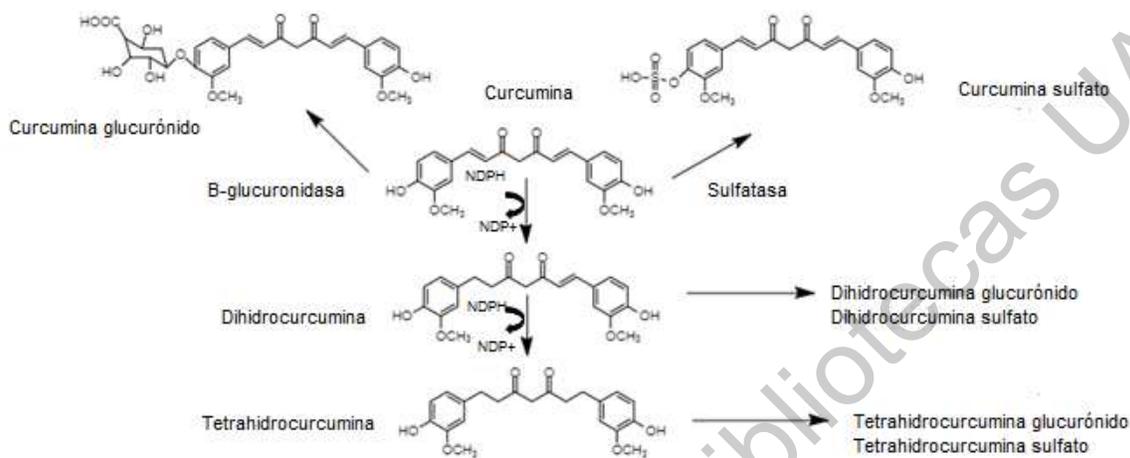


Figura 4. Ruta metabólica de la ingesta oral de curcumina (adaptada de Di Meo, *et al.*, 2019).

Con el objetivo de mejorar su absorción, diversos estudios han propuesto métodos de encapsulación de la curcumina utilizando sistemas de administración, como hidrogeles, nanopartículas y liposomas (Araiza-Calahorra *et al.*, 2018). Las nanoemulsiones, son excelentes acarreadores de curcumina, contribuyendo a la mejora de la biodisponibilidad aumentando su absorción en el intestino.

Métodos de alta y baja energía para elaborar nanoemulsiones resultan ser prometedores para mejorar la biodisponibilidad de la curcumina. Un método prometedor de baja energía para la preparación de nanoemulsiones se refiere a la de temperatura de inversión de fase TIF, ya que es de bajo costo operacional y no requiere de grandes inversiones (Jiang *et al.*, 2020). El método TIF se basa en una transición de fase por el cambio en la curvatura espontánea del tensoactivo no iónico inducido por la temperatura. A bajas temperaturas, los tensoactivos sensibles a la temperatura son hidrófilos y tienen una curvatura espontánea positiva. Por el contrario, los tensoactivos son más hidrófobos y la curvatura espontánea tiende a

volverse negativa con el aumento de la temperatura. A temperaturas intermedias (temperatura de equilibrio hidrofílico-lipofílico), las propiedades hidrofílicas y lipofílicas de los tensoactivos están equilibradas, y la curvatura espontánea media es cercana a cero (Ren *et al.*, 2019). La afinidad del tensoactivo por las fases acuosa y oleosa se intercambia variando la temperatura, produciendo un cambio de fase de agua en aceite (A/O) a aceite en agua (O/A) (Figura 5).

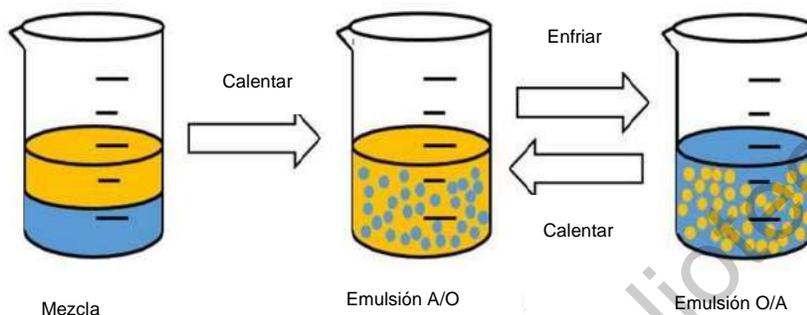


Figura 5. Esquema del método de nanoemulsión de baja energía. Método de temperatura de inversión de fase (TIF) (adaptada de Jiang *et al.*, 2020).

Por otro lado, un método de alta energía muy utilizado para crear nanoemulsiones, es el ultrasonido, el cual se basa en ondas de ultrasonido de alta intensidad para crear fuerzas de ruptura de la intensidad necesaria para romper las fases oleosa y acuosa en gotas muy pequeñas. La energía que se aplica se logra a través de una sonda de ultrasonido que contiene cristales de cuarzo que se expanden y contraen en respuesta a una alternancia del voltaje eléctrico. Se coloca la punta de la sonda dentro del líquido que será homogeneizado, donde genera vibraciones mecánicas intensas que llevan a un efecto de cavitación, es decir, la formación, crecimiento y colapso de pequeñas burbujas en el líquido, las cuales generarán intensas fuerzas de ruptura en la zona alrededor de la sonda del ultrasonido, lo cual lleva a la ruptura de la gota (McClements y Rao, 2011). La eficiencia de la homogeneización también estará en función del tipo y cantidad del emulsificante utilizado, así como de la viscosidad de las fases oleosa y acuosa.

En el presente trabajo se planteó emplear la temperatura de inversión de fase (TIF) y el ultrasonido para nanoemulsificar a la curcumina e incorporarla a un suplemento alimenticio diseñado para el control de la OA.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, la OA es considerada dentro de las 10 primeras causas de invalidez y se estima que afectan a 10 millones de personas en México. Esta enfermedad está asociada a la edad, el estilo de vida, el sexo, la obesidad, la ocupación profesional o la genética; siendo las mujeres las que padecen con mayor frecuencia esta patología. Al ser una enfermedad incapacitante es importante el desarrollo de nuevos suplementos alimenticios, formulados con ingredientes bioactivos que tengan una mayor biodisponibilidad, que permitan controlar el progreso de la enfermedad y que contribuyan en su prevención.

El hidrolizado de colágeno ha demostrado ser efectivo en la reestructuración del cartílago; por otro lado, la vitamina C es necesaria para la hidroxilación de aminoácidos indispensables (prolina y lisina) que contribuyen a la estabilización del colágeno. Así mismo, una ingesta adecuada de Mg en personas con OA puede ayudar a disminuir el dolor, así como, prevenir una pérdida de condrocitos lo que contribuiría a mantener en el grosor adecuado al cartílago y mitigar el avance de la enfermedad.

En el mercado existen múltiples suplementos que ayudan a controlar la enfermedad, en su mayoría son cápsulas de glucosamina y sulfato de condroitina, algunos añaden colágeno y *Curcuma longa*; sin embargo, las dosis que declaran de curcuminoides son inferiores a las dosis recomendadas para ejercer su efecto biológico (declaran 300 mg y la recomendada es 500 mg al día). Otro problema que presentan los curcuminoides es su baja biodisponibilidad debido a su limitada absorción y su rápido metabolismo. Por lo que es necesario nanoemulsificar.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Desarrollar un suplemento alimenticio con curcumina en nanoemulsión y microencapsulada para aumentar su absorción.

4.2. Objetivos específicos

- Generar una nanoemulsión con curcumina estabilizada con NaCl o MgCl₂, utilizando los métodos de temperatura de inversión de fase y ultrasonido.
- Microencapsular las nanoemulsiones con curcumina por secado por aspersion utilizando colágeno hidrolizado como material de pared.
- Elaborar un suplemento con vitamina C y curcumina microencapsulada y evaluar sus propiedades fisicoquímicas.
- Determinar *in vivo* la absorción de la curcumina del suplemento.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Los aceites utilizados fueron de marcas comerciales adquiridos en el supermercado; aceite de coco (Calahua®), aceite de oliva (Ragasa®) y aceite de soya (Soyaplus®). La DA251472 curcumina con un 95 % de pureza fue proporcionada por la empresa Naturex INC (New Jersey, USA). El cloruro de magnesio, la goma arábica, la maltodextrina, la vitamina C y el colágeno hidrolizado fueron adquiridos de la Droguería Cosmopolita S.A de C.V (Ciudad de México, México) y el tween 80 orgánico marca Meyer se adquirió de Comercializadora Rivas (Querétaro, México).

5.2. Solubilidad de curcumina.

La determinación de la solubilidad de curcumina se basó en el método de Jintapattanakit y colaboradores (2018). Se seleccionó el aceite vegetal con mayor

solubilidad de curcumina. Para ello se probaron tres diferentes aceites comerciales; aceite de coco (Calahua®), aceite de oliva (Ragasa®) y aceite de soya (Soyaplus®).

La técnica consistió en añadir 2 g de cada aceite por separado con 10 mg de curcumina. La mezcla se calentó a 60 °C en un baño de agua con agitación magnética durante 60 min para facilitar su solubilidad, posteriormente la mezcla se agitó a 30 °C durante 24 h. Después de este tiempo, la muestra se centrifugó a 1384 g durante 5 min, se tomó una alícuota del sobrenadante y se diluyó con etanol para la cuantificación de curcumina en el espectrómetro UV VIS (Thermo scientific multiskan go) a 425 nm. La concentración de curcumina se determinó utilizando una curva de calibración.

El aceite con la mejor solubilidad se utilizó para la preparación de las nanoemulsiones.

5.3. Preparación de nanoemulsiones cargadas con curcumina.

5.3.1. Método de temperatura de inversión de fase.

Las nanoemulsiones preparadas por el método de temperatura de inversión de fase se realizaron siguiendo los métodos de Jintapattanakit y colaboradores (2018) y Calligaris y colaboradores (2017). Se utilizó el tween 80 como tensoactivo a diferentes concentraciones (10, 15 y 20%), el cual se mezcló con el aceite de coco (5%), que mostró tener mayor solubilidad, se adicionaron 700 mg de curcumina (0.7%) y una solución acuosa de NaCl a diferentes concentraciones (0.2 y 0.4 M) o MgCl₂ a diferentes concentraciones (3.1 y 5.3 mM) (Dosis basada en el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios, capítulo XVII. Suplementos alimenticios, que establece límites de consumo).

Se llevó a cabo un diseño experimental factorial 2 x 3 para seleccionar la concentración de NaCl, MgCl₂ y de tween 80 utilizando el porcentaje de eficiencia de incorporación como variable respuesta.

El método de temperatura de inversión de fase (TIF) consistió en calentar la mezcla lentamente a 90 °C con agitación continua y posterior enfriamiento hasta 60 °C. Para realizar el proceso de inversión, se aplicaron 3 ciclos de temperatura (90-

60-90-60-90 °C). Durante el tercer ciclo, cuando la temperatura disminuyó a 75 °C y el sistema se observó translúcido, la nanoemulsión se enfrió rápidamente sumergiendo en agua con hielo hasta bajar la temperatura a 20 °C.

Cuadro 1. Diseño experimental factorial para la preparación de emulsiones utilizando diferentes concentraciones de NaCl y tween 80.

Tratamientos	Concentración de NaCl	Concentración de Tween 80	Variable respuesta
1	0.2 M	10 %	% Eficiencia de incorporación de curcumina
2	0.4 M	10 %	
3	0.2 M	15 %	
4	0.4 M	15 %	
5	0.2 M	20 %	
6	0.4 M	20 %	

5.3.2. Método de ultrasonido.

Las nanoemulsiones preparadas por el método de ultrasonido se realizaron siguiendo la metodología publicada por Aditya y colaboradores (2015). Se utilizó el tween 80 como tensoactivo a diferentes concentraciones (10, 15 y 20%), se mezcló con el aceite de coco, 700 mg de curcumina y con una solución acuosa de MgCl₂ a diferentes concentraciones (3.1 mM y 5.3 mM). La emulsión se mezcló con agitación constante y se calentó a 60 °C, posteriormente la mezcla se homogenizó en un ultrasonido portátil (Heilscher UP200Ht) a una frecuencia de 26 kHz, 200 W y una amplitud del 40% por diferentes tiempos (3, 6, 9 y 12 min); la eficiencia de encapsulación se midió como variable respuesta.

Cuadro 2. Diseño experimental factorial para la preparación de emulsiones utilizando diferentes concentraciones de MgCl₂ y tween 80.

Tratamientos	Concentración de MgCl ₂	Concentración de Tween 80	Variable respuesta
1	3.1 mM	10 %	% Eficiencia de incorporación de curcumina
2	5.3 mM	10 %	
3	3.1 mM	15 %	
4	5.3 mM	15 %	
5	3.1 mM	20 %	
6	5.3 mM	20 %	

5.4. Caracterización de la nanoemulsiones cargadas con curcumina.

5.4.1. Porcentaje de eficiencia de incorporación de curcumina.

La eficiencia de incorporación de curcumina en todas las nanoemulsiones preparadas se basó en la metodología de Jintapattanakit y colaboradores (2018). Se analizó inmediatamente después de la preparación de la nanoemulsión. La técnica consistió en tomar 2 µL de la nanoemulsión y diluirla en 298 µL De etanol absoluto. La cantidad de curcumina se determinó en el espectrómetro UV VIS, a 425 nm utilizando una curva de calibración. Para calcular la eficiencia de incorporación de curcumina (%EI) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%EI = \frac{\text{Cantidad medida de curcumina}}{\text{Total de curcumina agregada a la mezcla}} \times 100 \quad (1)$$

5.4.2. Espectro infrarrojo trasformada de Fourier (FTIR).

Para detectar la presencia de grupos funcionales y posibles enlaces en las nanoemulsiones preparadas tanto por el método de temperatura de inversión de fase como ultrasonido como se describe en el punto 5.3.1 y 5.3.2 y de los

ingredientes que componen las nanoemulsiones (curcumina pura, aceite de coco y tween 80); los ingredientes fueron colocados en el equipo directamente y de forma independiente sin ninguna preparación. Estas se caracterizaron usando un espectrofotómetro con transformada de Fourier (FTIR) (PerkinElmer, Spectrum, Llantrisant, UK) empleando un rango de 400 – 4000 cm⁻¹. Los datos se compararon con resultados reportados en bibliografía.

5.5. Microencapsulación de la nanoemulsión de curcumina.

La microencapsulación de la nanoemulsión de curcumina se realizó mediante un secado por aspersión Spray Dryer (Büchi B191, Suiza), con condiciones de temperatura de entrada de 160 °C y un flujo de alimentación de 7 min, flujo de aspiración (aire) de 473 l/h con 100% de aspiración (35 m³/h). Se adicionó colágeno hidrolizado o una mezcla 50:50 de goma arábiga y maltodextrina (equivalente DE 10) como materiales de pared, con un valor de °Brix alrededor de 35–37.

5.5.1. Porcentaje de eficiencia de microencapsulación (%EM).

El porcentaje de eficiencia de microencapsulación se realizó basado en el método de Ferreira y colaboradores (2019), el cual expresa la cantidad de curcumina retenida. En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 10 mg del microencapsulado, el volumen se completó con metanol, la solución se homogenizó en un vortex por 5 min, posteriormente se centrifugó a 750 g por 10 min. La curcumina del sobrenadante se cuantificó midiendo la absorbancia a 425 nm y utilizando una curva de calibración. Finalmente se calculó el porcentaje de eficiencia mediante la siguiente fórmula:

$$\%EM = \frac{CF}{C0} \times 100 \quad (2)$$

Donde CF es la concentración de curcumina (mg g⁻¹) del polvo (microencapsulado) y C0 (mg g⁻¹) es la concentración de curcumina en la nanoemulsión antes de ser secada por aspersión.

$$\%EM = \frac{CF \times \text{Total de polvo obtenido}}{C0} \times 100 \quad (2)$$

Donde CF es la concentración de curcumina (mg g^{-1}) del polvo (microencapsulado) y C0 (mg g^{-1}) es el total de curcumina en el volumen secado.

5.6. Elaboración del suplemento.

La elaboración del suplemento se realizó adicionando al microencapsulado vitamina C, considerando que la composición de microencapsulado consistió en nanoemulsión con curcumina estabilizada con cloruro de magnesio y encapsulada en colágeno hidrolizado.

5.7. Índice de solubilidad.

El índice de solubilidad en agua se realizó de acuerdo con lo descrito por Anderson y colaboradores (1970). Se suspendió una muestra de 2.5 g de producto (suplemento) en 30 mL de agua a 30 °C en un tubo de centrifuga de 50 mL, Se agitó de forma intermitente durante un período de 30 min y se centrifugó a 3,000 g durante 10 min. El sobrenadante se vertió cuidadosamente en un plato de evaporación previamente tarado y secar a 100 °C por 24 h; la cantidad de sólidos secos recuperados por evaporación del sobrenadante se expresaron como porcentaje de sólidos secos en la muestra.

$$\% \text{ ISA} = \frac{\text{Peso del residuo de evaporación}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad (3)$$

5.8. Índice de dispersabilidad.

El índice de dispersabilidad (ID) se realizó de acuerdo con lo descrito por Ji y colaboradores (2016). El ID se define como el porcentaje (%) de materia seca que pasa a través de un tamiz después de mezclarlo durante un breve período de tiempo con una espátula. El tamiz con un tamaño de malla de 250 μm se utilizó para separar las partículas dispersas de la suspensión en función del grado de dispersión. Se mezclaron 10 g de polvo con 100 mL de agua desionizada a 25 °C y luego se mezcló vigorosamente con una espátula durante 15 s para realizar 25 movimientos de agitación en círculo completos a lo largo del diámetro del vaso de precipitados.

Después de eso, las muestras reconstituidas se vertieron en el tamiz de 250 micras para separar las partículas dispersas en la suspensión en función del grado de dispersión, y las muestras que pasaron a través del tamiz se recogieron en una botella para un secado adicional a 105 °C de temperatura toda la noche. La materia seca extraída se pesó y se usó para calcular el ID de la siguiente manera:

$$ID = \frac{Wd(100 + w)}{w * \left(\frac{100 - Wm}{100}\right)} \quad (4)$$

Donde w es el peso de la muestra, Wd (% w / w) es la materia seca después de tamizado, Wm (% p/p) es el contenido de humedad del polvo.

5.9. Tamaño de partícula y índice de polidispersidad de nanoemulsiones y suplemento.

Se determinó el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad de las nanoemulsiones preparadas por el método de temperatura de inversión de fase y por el método de ultrasonido, así como de la emulsión sin ser procesada por algunos de los dos métodos mencionados (emulsión control) y del suplemento correspondiente al microencapsulado con colágeno y reconstituido en agua. La determinación se realizó en un instrumento de dispersión dinámica de luz (DLS), Anton Paar Litesizer 500. Las muestras se midieron a una temperatura de 25°C tomando 1 mL de muestra a una viscosidad de 10 cp y un índice de refracción entre 1.33 y 1.36. El software Kalliope™ ajusta automáticamente los parámetros ópticos (ángulo de medición, densidad óptica del filtro y posición de enfoque), realizando mediciones con un láser semiconductor de 658 nm de 40 mW.

5.10. Estudios de la absorción de curcumina nanoemulsificada y microencapsulada.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar hembras de 240 a 250 g de peso corporal. Los animales se adquirieron en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla. Los experimentos con animales se diseñaron de acuerdo con el protocolo de cuidado y uso de animales de la Universidad Autónoma de Querétaro, siguiendo los lineamientos estipulados en la NOM-062-ZOO-1999. El

protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro con el número de oficio CBQ20/062.

Los animales se alojaron en jaulas individuales (258 cm²) de acero inoxidable, las cuales permitieron la entrada de aire y luz. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad (50 ± 10%), temperatura (23 ± 2 °C), ciclos luz/oscuridad (12/12 h) y ventilación constante de acuerdo con la NOM-062-Z00-1999 y se alimentaron con croqueta comercial para rata marca Rodent Laboratory Chow de Purina y con agua *ad libitum*.

Para medir el tiempo en el que mayor absorción de la curcumina presentó el suero de rata se basó en el método de Maiti y colaboradores (2007). Se utilizaron 24 ratas, 6 por cada grupo. Los tratamientos se administraron en una dosis equivalente de 100 mg/kg de curcumina por canulación (aproximadamente 4.5 mL del tratamiento); 1) Grupo 1, control que recibió solo agua destilada. 2) Grupo 2, curcumina sin emulsión (curcumina en agua). 3) Grupo 3, nanoemulsión con curcumina. Se recolectaron muestras de sangre después de una 0, 1, 2, 4 y 6 h.

Los animales se colocaron en un restrainer inmovilizador para obtener las muestras de sangre de la vena ubicada en la cola, previamente desinfectada la zona de extracción, la cantidad de muestra obtenida fue de 300-500 µL; posteriormente la muestra se centrifugó durante 10 min a 5,530 g para obtener el suero. Las jeringas utilizadas para la obtención de las muestras de sangre se colocaron en un bote rojo de polipropileno especial para objetos punzocortantes con una leyenda que indique “residuos punzocortantes biológico-infecciosos” y se almacenaron a -20 °C hasta su recolección por la empresa Servicios Especializados en Residuos S.A. de C.V. El material quirúrgico utilizado se remojó con cloro por 12 h, se lavó y se esterilizó para su posterior almacenamiento. Los animales fueron sacrificados con sobredosis de pentobarbital (0.5 mL) vía intraperitoneal, se colocaron en bolsas amarillas de residuos peligrosos, sólidos biológico infecciosos y se colocaron en congelación -20 °C hasta su recolección por la empresa Servicios Especializados en Residuos S.A. de C.V.

La extracción de la curcumina del suero se realizó utilizando 150 μ L de muestra de suero, después de equilibrarlo a temperatura ambiente, se transfirió a un tubo eppendorf y se añadió 150 μ L de metanol. El contenido se agitó vigorosamente y se centrifugó a 15,373 g durante 10 min y se separó el sobrenadante. Los polifenoles totales se cuantificaron en el sobrenadante.

Los experimentos posteriores se realizaron recolectando muestras de sangre al tiempo definido en el experimento previo, en el que se detectó mayor concentración de compuestos fenólicos.

5.10.1. Absorción de polifenoles en suero de nanoemulsiones preparadas con diferentes concentraciones de tween 80 y sales.

La absorción de curcumina en suero de ratas se evaluó con seis diferentes tratamientos ($n = 6$). Brevemente, la curcumina se administró vía intragástrica a una dosis equivalente de 100 mg/kg con base al peso de la rata. Los tratamientos consistieron en administrar la curcumina en agua, curcumina en aceite, curcumina en nanoemulsión con una concentración de tween 80 al 15 % y con dos diferentes sales, NaCl al 0.4 M y $MgCl_2$ al 5.3 mM y curcumina en nanoemulsión con 20% de tween 80, NaCl al 0.4 M y $MgCl_2$ al 5.3 mM.

La preparación de los tratamientos se realizó un día antes de la administración, siguiendo las buenas prácticas de manufactura y calculando la cantidad de producto a administrar a través del proceso de canulación. Después de la administración del tratamiento y del tiempo definido para la extracción de sangre, los animales se manejaron de la misma forma que se describe en el punto anterior al igual que el tratamiento del suero.

5.10.2. Absorción de polifenoles en suero comparando el método de temperatura de inversión de fase y ultrasonido.

La curcumina se administró en forma de nanoemulsión preparadas con los dos métodos; temperatura de inversión de fase (TIF) y ultrasonido con 9 min (US9), manteniendo la concentración del $MgCl_2$ al 5.3 mM y variando las concentraciones de tween 80 a 15 y 20 %. Los tratamientos se prepararon un día antes de la

administración siguiendo las buenas prácticas de manufactura, la toma de muestra se realizó después del tiempo definido y el manejo de los animales, así como el tratamiento del suero se realizó como se describe en el punto 5.4.1.

5.10.3. Absorción de polifenoles en suero del microencapsulado.

La curcumina se administró a través de canulación en una dosis equivalente a 100 mg/kg en su forma simple (curcumina en agua), curcumina en aceite, curcumina en nanoemulsión con 20 % de tween 80 y 5.3 mM de MgCl₂ y curcumina nanoemulsificada y microencapsulada en colágeno hidrolizado. El microencapsulado se reconstituyó con agua para su administración. Después del tiempo definido se realizaron las extracciones de sangre, el manejo de los animales y el tratamiento del suero se realizó como se describe en el punto 5.4.1.

5.11 Cuantificación de compuestos fenólicos totales en suero.

La cuantificación de compuestos fenólicos totales se realizó siguiendo la metodología de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se mezclaron 10 µL del suero, 65 µL de agua destilada y 37.5 µL de reactivo Folin 1 N, se agitaron y dejaron reaccionar durante 5 min, posteriormente se les agregó 187.5 µL de una solución de carbonato de sodio al 20% y se dejó reaccionar durante 20 min protegido de la luz, para finalmente medir la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific), Se realizó una curva de calibración con ácido gálico y los resultados se expresaron como mg ácido gálico/mL del suero.

5.12 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo DPPH y ABTS.

La capacidad antioxidante se determinó utilizando el ensayo de DPPH y ABTS en las nanoemulsiones y suplemento, así como en el suero de ratas tratadas con estos productos a dosis equivalente de curcumina de 100 mg/kg.

5.12.1 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Para la formación del radical DPPH^{*}, 8 mg del radical se mezclaron con 100 mL de metanol, se agitó y se leyó a 517 nm la absorbancia hasta lograr valores de 0.75-0.78. El radical se preparó en el momento que se usó y se protegió de la luz. Posteriormente, 10-20 µL de muestra se ajustó a 20 µL con agua y se mezcló con 200 µL del radical. El control consistió de 20 µL de metanol con 200 µL de radical, el blanco fue 20 µL agua con 200 µL del radical. Después, las muestras se agitaron durante 6 min y la absorbancia se leyó a 517 nm (Brand *et al.*, 1995). Finalmente, se calculó el porcentaje de inhibición del radical de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Abs c} - \text{Abs b}) - (\text{Abs m} - \text{Abs b})}{\text{Abs c} - \text{Abs b}} * 100 \quad (5)$$

Donde:

Abs c = absorbancia del control

Abs b = absorbancia del blanco

Abs m = absorbancia de la muestra

Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición.

5.12.2. Método ABTS (ácido 2, 2' azinobis-3-etil- benzotiazolin-6 sulfónico).

Para la formación del radical ABTS^{•+} se mezclaron 88 µL de una solución 140 mM de persulfato de potasio con 5 mL de una solución acuosa 7 mM de ABTS. La solución se agitó y se dejó en reposo durante 12 h en oscuridad y a temperatura ambiente para generar el radical. La mezcla se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm. Posteriormente, 10-20 µL de cada muestra se ajustó a 20 µL con agua destilada y se mezcló con 230 µL del radical (Re *et al.*, 1999).

El blanco 1 fue una mezcla de 20 µL de etanol y 230 µL de agua, el blanco 2 fue 20 µL de agua con 230 µL de etanol. Para el control 1 se mezcló 20 µL de etanol con 230 µL de radical, el control 2 se obtuvo mezclando 20 µL de agua con 230 µL de radical. Finalmente, las muestras se agitaron durante 6 min y la absorbancia se leyó a 734 nm (Re *et al.*, 1999)

El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Abs } c - \text{Abs } b) - (\text{Abs } m - \text{Abs } b)}{\text{Abs } c - \text{Abs } b} * 100 \quad (6)$$

Donde:

Abs c = absorbancia promedio de los controles

Abs b = absorbancia promedio de los blancos

Abs m = absorbancia de la muestra

Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición.

5.13. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar (EE). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. El análisis de comparación de medias entre los tratamientos se realizó usando una prueba de Tukey. Se procesaron mediante el programa JMP 11.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

6.1. Solubilidad de curcumina.

Se evaluó la solubilidad de la curcumina en tres diferentes aceites (aceite de coco, oliva y soya). En la Figura 6 se observa que el aceite de coco presenta la mayor solubilidad de curcumina hasta 2.9 veces comparado con el aceite de soya, que presentó la menor solubilidad. Jintapatanakit *et al.* (2017) evaluaron diferentes aceites vegetales y encontraron que la curcumina presentó mayor solubilidad en el aceite de coco en comparación con el aceite de soya y oliva, lo que concuerda con nuestros resultados.

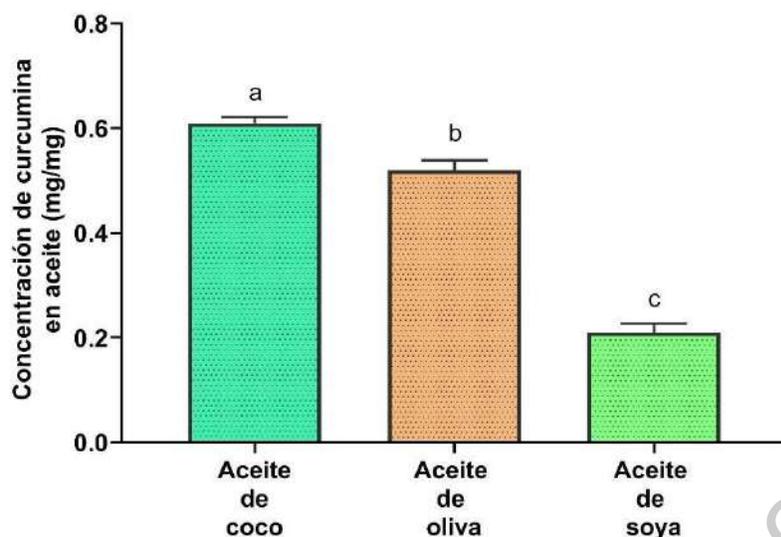


Figura 6. Solubilidad de curcumina en tres diferentes aceites. Resultados en media \pm DE (n = 3). Valores con diferente letra indican diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer).

La razón por la que el aceite de coco presentó la mayor solubilidad podría atribuirse a sus principales componentes, que incluyen ácidos grasos de cadena media (C5-C12, >50%), siendo el ácido láurico el más abundante; mientras que, el aceite de oliva (C18, >50 % ácido oleico) y soya (C18, >50 % ácido linolénico) contienen ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos de cadena media promueven las interacciones dipolo-dipolo entre el aceite y las moléculas de la curcumina (Jintapatanakit *et al.*, 2017). El aceite de coco y la curcumina tienen en su estructura partes polares, el extremo carboxilo del aceite de coco y los anillos fenólicos de la curcumina, por lo que podrían presentarse interacciones dipolo-dipolo entre estos grupos favoreciendo la solubilidad. La Figura 7 representa una propuesta de esta interacción.

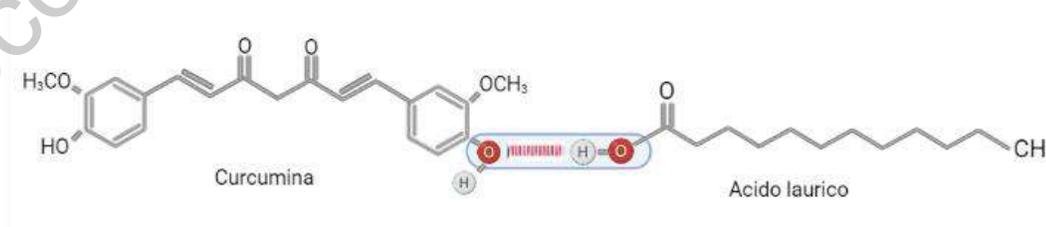


Figura 7. Interacción dipolo - dipolo entre el grupo fenólico de la curcumina y el grupo carboxilo del ácido láurico.

Con base en este resultado las nanoemulsiones en todos los experimentos se prepararon utilizando aceite de coco como fase lipídica.

6.2. Caracterización de nanoemulsiones.

6.2.1. Eficiencia de incorporación de curcumina con diferentes concentraciones de NaCl y Tween 80.

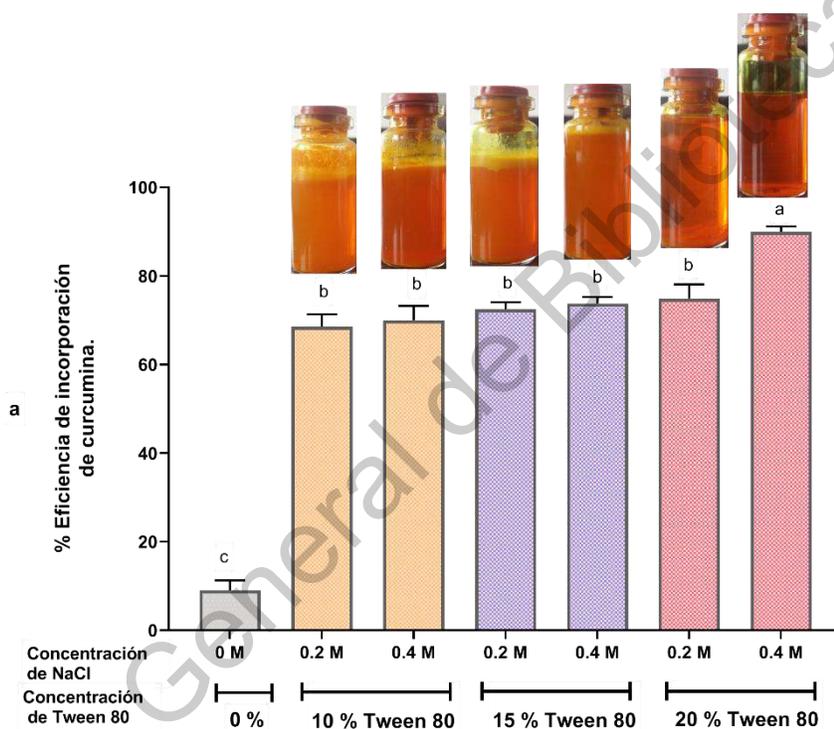
En las Figuras 8a y 8b se observan los resultados de nanoemulsiones preparadas con diferentes concentraciones de tween 80 (0, 10, 15 y 20 %), NaCl (0, 0.2 y 0.14 M) y MgCl₂. (0, 3.1 y 5.3 mM), utilizando el método de temperatura de inversión de fases. La nanoemulsión con tween 80 al 20 % mostró el mayor porcentaje de eficiencia de incorporación de curcumina, 90 % para las nanoemulsiones con NaCl y del 95 % para las que contenían MgCl₂. Además, se formaron nanoemulsiones traslúcidas y visiblemente estables, comparando con las nanoemulsiones que contenían 10 y 15 % de tween 80 (eficiencia de incorporación <80 %), obteniendo nanoemulsiones opacas e inestables, ya que presentaron una separación de fases.

Los principales mecanismos de inestabilidad de la nanoemulsión incluyen la coalescencia y la agregación, por lo que la influencia del tensoactivo depende de capacidad de reducir la tensión interfacial. El tween 80, al ser una molécula anfifílica, al adicionarse a una mezcla aceite y agua, la cabeza hidrofílica interacciona con la fase acuosa y la cola hidrofóbica en la fase oleosa, lo que resulta una reducción en la tendencia de separación de fases (aceite y agua). La estabilidad de la nanoemulsión se logra cuando las partículas del tensoactivo cubren toda la interfaz aceite/agua contribuyendo así a evitar la coalescencia de las gotas, por lo que a mayor concentración del tensoactivo mayor será la estabilidad.

Por otro lado, las nanoemulsiones con mayor concentración de NaCl (Figura 8a) mostraron una apariencia más traslúcida, presentando mejores características aquella que contenía NaCl a una concentración de 0.4 M. La Figura 8b muestra un fenómeno similar al evaluar diferentes concentraciones de MgCl₂, la concentración de 5.3 mM produjo una apariencia traslúcida. Las sales pueden facilitar la formación de la emulsión, debido a que pueden alterar el espacio entre las capas de la fase

cristalina líquidas formadas durante los pasos intermedios de emulsificación lo que puede conducir a la formación de partículas más finas (Li *et al.*, 2016, Wu *et al.*, 2017).

Basados en el objetivo de este proyecto de desarrollar un suplemento para el control de la osteoartritis con ingredientes que mejoren la salud y que las características de la emulsión entre el NaCl y MgCl₂ son similares, se decidió continuar los experimentos utilizando solamente MgCl₂, ya que el Mg es recomendado para el control de la OA.



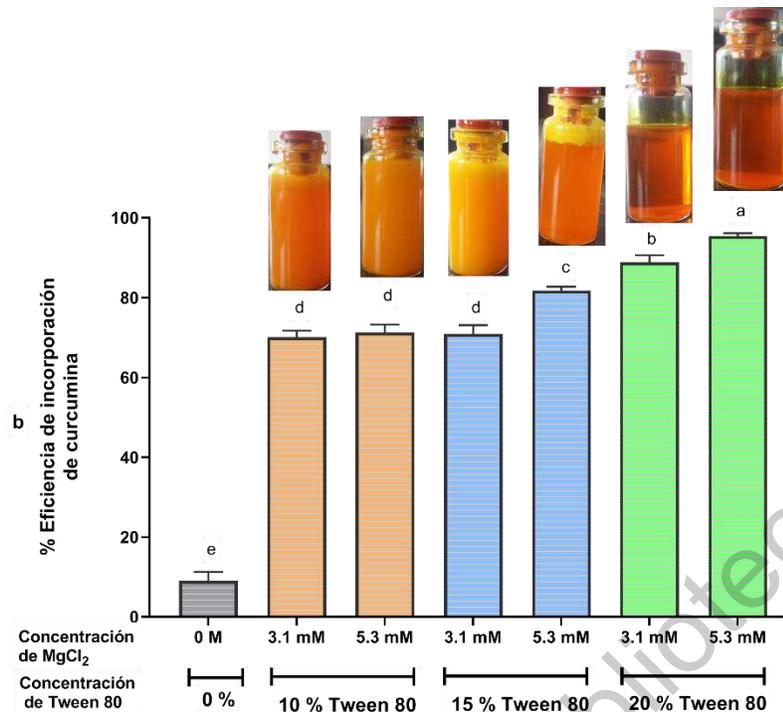


Figura 8. Efecto de diferente concentración de NaCl (a), MgCl₂ (b) y el porcentaje de eficiencia de incorporación de curcumina en la emulsión utilizando el método de temperatura de inversión de fases. Resultados en media \pm DE (n = 3). Valores con diferente letra indican diferencia significativa (p<0.05, prueba de Tukey-Kramer).

6.2.2. Eficiencia de incorporación de curcumina utilizando el método de ultrasonido (US).

Las nanoemulsiones se elaboraron utilizando el método de ultrasonido a diferentes tiempos 3, 6, 9 y 12 min y se comparó con el método TIF. En la Figura 9 se muestra la eficiencia de encapsulación de curcumina, observando que el porcentaje de eficiencia de incorporación entre los métodos TIF y US fue de 95 % y 93 %, respectivamente, por lo que no se observa diferencia significativa. Ambos métodos son eficientes para preparar nanoemulsiones, la diferencia entre ambos métodos es que el método TIF produce nanoemulsiones traslúcidas mientras que el US la nanoemulsiones son opacas (Figura 9).

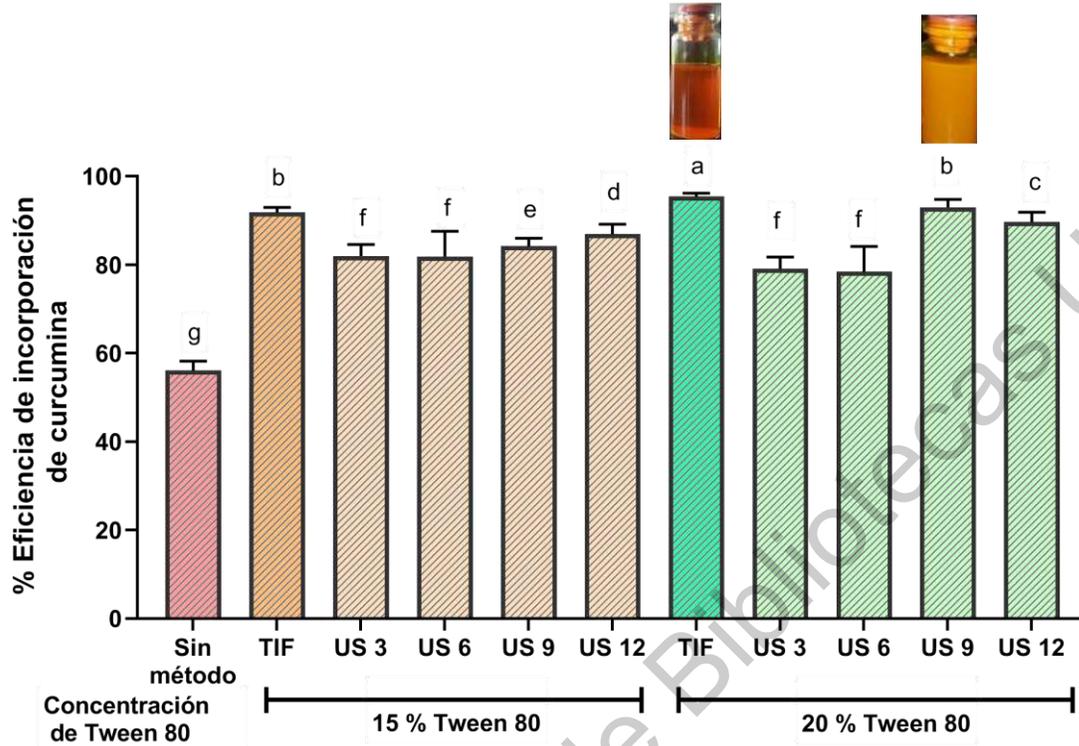


Figura 9. Porcentaje de eficiencia de incorporación de curcumina en la emulsión a una concentración 5.3 mM de $MgCl_2$, utilizando el método de ultrasonido (US) a diferentes tiempos y comparando con el método de temperatura de inversión de fase (TIF). Resultados mostrados como la media \pm DE. $n = 3$. Valores con diferente letra indican diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer).

6.2.3. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de las nanoemulsiones elaboradas con curcumina.

La Figura 10 y el cuadro 3 muestran el espectro FTIR y las vibraciones características de los principales grupos funcionales que componen la nanoemulsión. El objetivo de este análisis se basó en verificar la incorporación de la curcumina en la nanoemulsión y determinar los posibles enlaces formados.

Con respecto a los picos característicos de la curcumina pura, observamos las bandas FTIR de absorción características, que se encuentran en 3511 cm^{-1} para ν (OH), 1628 cm^{-1} ν (C = C), 1510 cm^{-1} ν (C = O), ν (C = O), δ (CCC), 1282 cm^{-1} δ (C-O-C), 887 cm^{-1} γ (CCH) 723 cm^{-1} δ (CCH).

El espectro del aceite de coco muestra la detección de picos duales en 2921 y 2860 cm^{-1} para el estiramiento asimétrico y simétrico de $\nu(\text{C-H})$, respectivamente. Los picos duales agudos indican que el aceite de coco consiste en una cadena de carbono lineal de ácidos grasos como los ácidos láurico, palmítico y esteárico. Otro pico agudo a 1742 cm^{-1} representa el éster carbonilo $\nu(\text{C=O})$, los picos asignados a 1462 y 1377 cm^{-1} corresponden a $\delta(\text{C-H})$, los picos asignados a 1165 y 1099 cm^{-1} corresponden al estiramiento C-O de los ácidos grasos.

Las bandas correspondientes al tween 80 muestran picos característicos en las regiones de 3461 cm^{-1} (ν) para OH, 2923 cm^{-1} y 2860 cm^{-1} (ν) para C-H, 1736 cm^{-1} (ν) para C=O, 1462 cm^{-1} (δ) para C-H y 1110 (ν) para C-O cm^{-1} .

La banda fuerte y ancha a 3346 cm^{-1} (ν) de O-H se debe a la presencia de grupos OH pertenecientes al agua que contienen las nanoemulsiones. Con respecto a las nanoemulsiones (TIF y US). Los espectros FTIR muestran la mayoría de los picos correspondientes al surfactante; por ejemplo, picos en 2923, 2860, 1736 y 1110 cm^{-1} , lo anterior podría indicar que los grupos activos se encuentran en la superficie de las nanopartículas. Por otro lado, no se observa formación de nuevos picos lo que se podría suponer que la nanoemulsión es estable.

Se observa la desaparición del pico de 3511 cm^{-1} en el espectro de las nanoemulsiones de curcumina lo que podía indicar la interacción del -OH fenólico de la curcumina con grupo carboxilo del aceite de coco C=O 1742 cm^{-1} , muy probablemente a través de enlaces de hidrógeno.

Los principales picos de absorción de la curcumina en la región de 1511 al 857 cm^{-1} se debilitaron y los picos cambiaron cuando se encapsularon en las nanoemulsiones, lo que sugiere que las moléculas de curcumina se ubicaron dentro de las micelas de la nanoemulsión ya que algunos picos se encuentran ocultos. Por lo tanto, se sugiere que la mezcla de aceite y curcumina se encuentra en el centro de la micela misma que es recubierta por el surfactante (Figura 11).

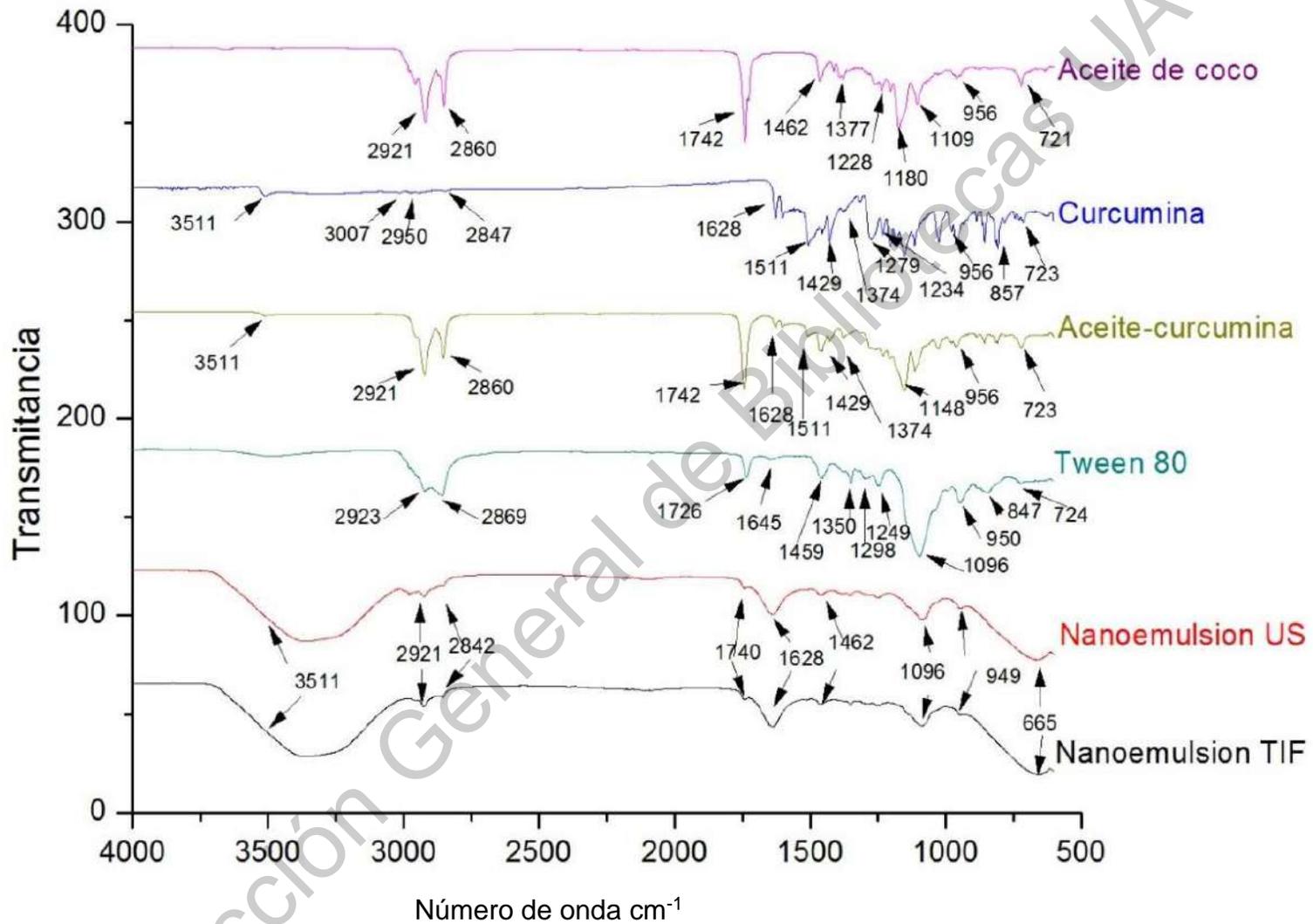


Figura 10. Espectro de FTIR de nanoemulsiones, curcumina pura, aceite de coco, tween 80 y curcumina en aceite.

Cuadro 3. Espectro FTIR y picos asignados en las nanoemulsiones temperatura de inversión de fase y ultrasonido.

Picos asignados*	Curcumina (cm ⁻¹)	Aceite de coco (cm ⁻¹)	Curcumina en aceite de coco (cm ⁻¹)	Tween 80 (cm ⁻¹)	Nanoemulsión TIF (cm ⁻¹)	Nanoemulsión US (cm ⁻¹)
v(O-H)	3511		3511	3461	3511	3511
v(C-H)		2921	2921	2923	2921	2921
		2860	2860	2860		
					2842	2842
v(C=O)		1742	1742	1736	1740	1740
Mezcla de vibraciones [v(C=C) y v(C=O)]	1628		1628		1628	1628
Mezcla de vibraciones [v(C=O), δ(CCC), δ(CC=O)]	1511		1511		1511	1511
δ (C-H)		1462	1462	1462	1462	1462
			1429			
		1377	1377		1374	1374
			1374			
v (C-O-C)	1282	1228	1279		1298	1298
			1234		1249	1249
			1228			
			1180			
δ (C=C-H)	1206	1180	1206			
			1180			
			1109			
v (C-O)	1148	1165	1148	1110	1084	1084
			1109			
		1099	1117		949	949
γ (CCH)	887		887			
	857		857			
	812		812			
δ (CCH)	723	721	723		665	665
			721			

*Vibraciones: v: Extensión; δ: doblado en el plano; γ: doblado fuera de plano.

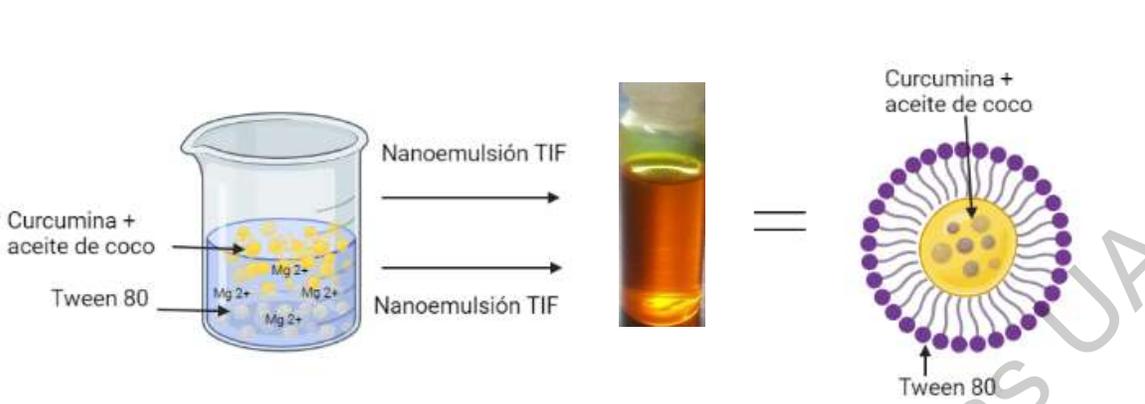


Figura 11. Nanoemulsión de curcumina preparada con el método de temperatura de inversión de fase.

6.3. Determinación de la absorción de curcumina en suero de rata.

6.3.1. Estimación del tiempo de absorción de curcumina en suero de rata.

La Figura 12 muestra el resultado de absorción de curcumina en suero de ratas, determinado mediante la cuantificación de compuestos fenólicos totales. La curcumina se administró a través de canulación a una dosis equivalente de 100 mg/kg en base al peso de la rata. Se administró en dos diferentes formas; curcumina sin emulsión (curcumina en agua) y curcumina incorporada en la nanoemulsión preparada con 20% de tween 80, NaCl al 0.4 M, aceite de coco y curcumina. Cuando se administró curcumina en agua, la concentración de curcumina en suero en la primera hora fue de 0.15 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, en el caso de la curcumina en la nanoemulsión se logró una concentración de 0.43 $\mu\text{g/mL}$ y la concentración máxima (0.64 $\mu\text{g/mL}$) apareció después de 2 h. La concentración fue 6.4 veces más alta en la curcumina administrada en la nanoemulsión que la curcumina en agua a las 2 h. La concentración de curcumina contenida en la nanoemulsión disminuyó con el tiempo; sin embargo, siempre se mantuvo más alta en comparación de la curcumina administrada en agua.

Con base en estos resultados, el suero de las ratas de los experimentos siguientes se recuperó a las dos horas de administrar los tratamientos.

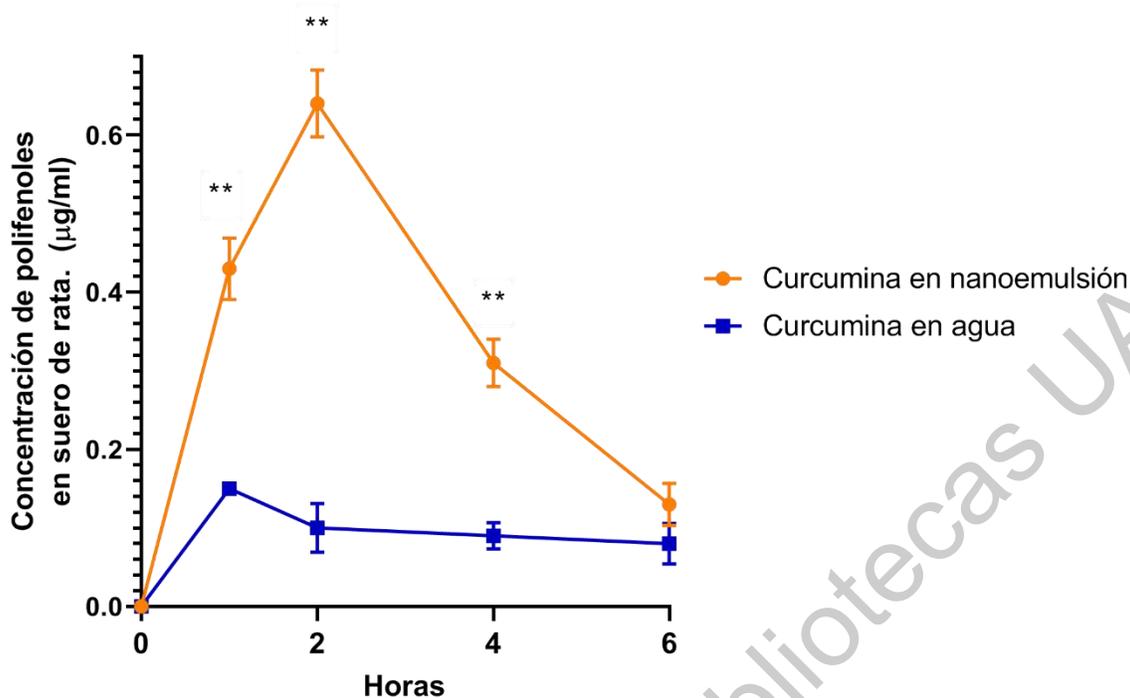


Figura 12. Concentración de polifenoles en suero después de la administración de la nanoemulsión con curcumina a una dosis de 100 mg/kg. **Valores indican diferencia significativa ($p < 0.05$) comparando cada punto de tiempo con los animales tratados con curcumina en agua (Prueba de Tukey-Kramer).

6.3.2. Concentración de polifenoles en suero de nanoemulsiones preparadas con diferentes concentraciones de tween 80 y sales

Se evaluó la absorción de curcumina en suero de ratas mediante la cuantificación de compuestos fenólicos totales en diferentes tratamientos. Brevemente, la curcumina se administró vía intragástrica a una dosis equivalente de 100 mg/kg con base al peso de la rata. Los tratamientos consistieron en administrar la curcumina en agua, curcumina en aceite de coco, curcumina en nanoemulsión con una concentración de tween 80 al 15 % y con dos diferentes sales, NaCl al 0.4 M y MgCl₂ al 5.3 mM y curcumina en nanoemulsión con 20% de tween 80, NaCl al 0.4 M y MgCl₂ al 5.3 mM. Con este experimento se pretendió determinar si hubo un efecto significativo sobre la absorción de curcumina en nanoemulsión utilizando diferentes concentraciones y tipo de sales, así como diversas concentraciones de tween 80.

Los resultados de la Figura 13 muestran la concentración de polifenoles totales en el suero de las ratas. Se observa que la concentración de polifenoles en suero aumentó 4 veces cuando la curcumina se administró disuelta en aceite comparada con la curcumina disuelta en agua, pero hubo un aumento más significativo de 2.7 y 3.5 veces cuando la curcumina se administró en forma de nanoemulsión preparada con 0.4 M de NaCl y 5.3 mM de MgCl₂, respectivamente, ambas utilizando una concentración del 15% de tween 80 comparada con la curcumina en aceite. Cuando la concentración de tween 80 se adicionó al 20%, se observó una concentración similar a la obtenida con ambas sales NaCl y MgCl₂ al 15 % de tween 80. Estos resultados indicaron que la formulación de las nanoemulsiones con 15 o 20 % de tween 80 mejoró significativamente la absorción de curcumina; pero no presentan diferencia significativa entre ellos.

La pobre absorción de curcumina se ha demostrado en diferentes estudios. Por lo que, la encapsulación de la curcumina en una nanoemulsión permite mejorar su absorción esto se logra debido a que al solubilizar a la curcumina en un medio lipídico y disminuir el tamaño de partícula permite que las pequeñas micelas se absorban con mayor facilidad a través de la mucosa intestinal (McClements *et al.*, 2015). Los principales picos de absorción de la curcumina en la región de 1511 al 857 cm⁻¹ se debilitaron y los picos cambiaron cuando se encapsularon en las nanoemulsiones, lo que sugiere que las moléculas de curcumina se ubicaron dentro de las micelas de la nanoemulsión ya que algunos picos se encuentran ocultos. Por lo tanto, la mezcla de aceite y curcumina se encuentra en el centro de la micela misma que es recubierta por el surfactante.

Se sabe que partículas mayores a 400 nm se dificulta su paso a través de dicha mucosa intestinal (McClements *et al.*, 2015). Por lo tanto, las nanoemulsiones con un diámetro de gota menor a 100 nm atraviesan con mayor facilidad, como es el caso de la nanoemulsiones aquí elaboradas, las cuales presentan un tamaño de partícula entre 56 y 78 nm.

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a lo reportado por otros autores. Yu *et al.* (2012) desarrollaron nanoemulsiones basadas en organogel, confirmando que la biodisponibilidad oral en ratas de la curcumina en la

nanoemulsión aumentó 9 veces en comparación con la curcumina no preparada. Takahashi *et al.* (2009) reportaron que, después de la administración oral en ratas de 100 mg/kg de curcumina encapsulada en liposomas, se observó un aumento de 9 veces en la biodisponibilidad oral en comparación con curcumina en su forma simple. Zhongfa *et al.* (2012) demostraron que las nanoemulsiones con un 20% de curcumina tuvieron un aumento de 40 veces en comparación con la curcumina en su forma simple en ratones.

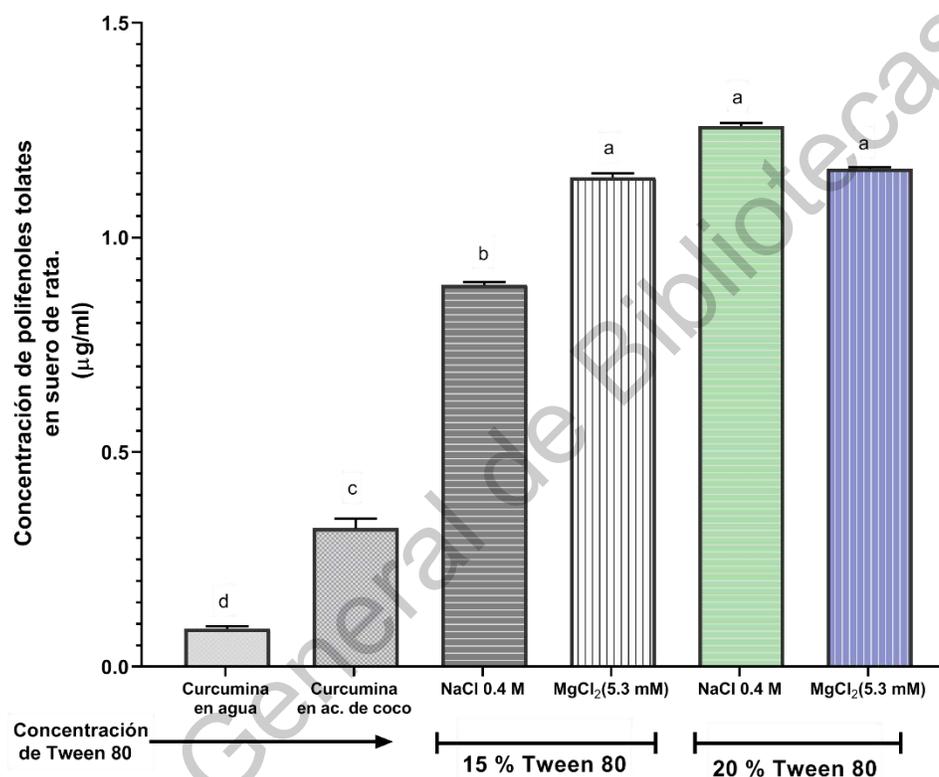


Figura 13. Polifenoles totales en suero de ratas tratadas con nanoemulsiones¹ preparadas con diferentes concentraciones de sales y tween 80. Resultados en media \pm DE. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer). ¹La medición se realizó 2 h después de la administración del tratamiento.

La Figura 14 muestra los resultados obtenidos de la concentración de polifenoles totales en suero después de administrar curcumina a las ratas por vía intragástrica a la dosis equivalente de 100 mg/kg con base al peso de la rata. La curcumina se administró en forma de nanoemulsión, las cuales se elaboraron con los dos métodos de temperatura de inversión de fase (TIF) y ultrasonido con 9 min (US9), manteniendo la concentración del MgCl₂ al 5.3 mM y variando las

concentraciones de tween 80 a 15 y 20 %. El objetivo se basó en determinar el efecto de la concentración de tween 80, ya que este ingrediente, si bien es grado alimenticio, está regulado por la normatividad mexicana, así como comparar ambos métodos.

Los resultados muestran que ambos métodos y ambas concentraciones de tween 80 tienen la misma capacidad de absorción, obteniendo concentraciones de polifenoles totales similares de 1.14-1.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para 15% tween 80, y de 1.23-1.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 20% tween 80. Estos resultados demuestran que ambos métodos son igual de eficientes.

El Cuadro 4 muestra un resumen de los diferentes tratamientos y la concentración de compuestos fenólicos obtenida en el suero de ratas después de dos horas de administrar los tratamientos, así como, el número de veces que aumento la absorción con respecto a la curcumina en agua. Se observa que la absorción de compuestos fenólicos aumentó alrededor de 14 veces cuando la curcumina está en nanoemulsión comparándola con la curcumina en agua. Para fines de este proyecto, cuyo objetivo principal se basa en desarrollar un suplemento que contribuya al control de la osteoartritis y basados en estos resultados, las nanoemulsiones seleccionadas corresponden a las que contienen 15 y 20 % de tween 80 con MgCl_2 al 5.3 mM, las cuales se sometieron al proceso de secado por aspersión.

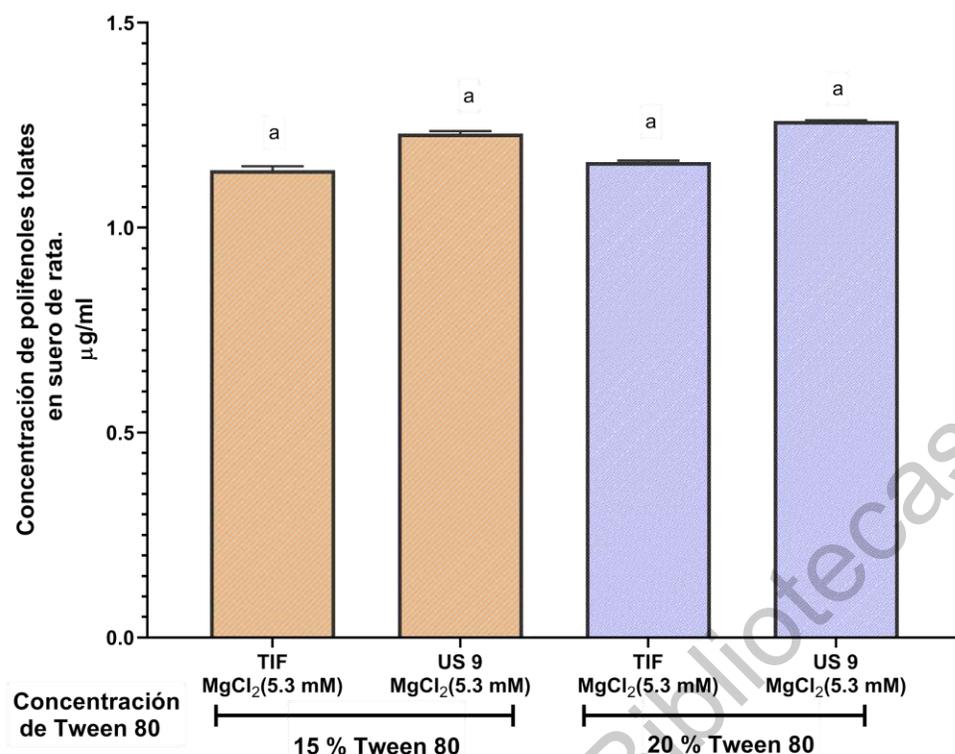


Figura 14. Concentración de polifenoles totales en suero de ratas tratadas con diferentes nanoemulsiones de curcumina¹ preparadas con el método de temperatura de inversión de fase (TIF) y ultrasonido (US) durante 9 min. Resultados en media \pm DE. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer). ¹Dosis equivalente a 100 mg/kg de curcumina y la medición se realizó 2 h después de la administración del tratamiento.

Cuadro 4. Concentración de compuestos fenólicos en suero de rata tratadas con diferentes presentaciones de curcumina.

Tratamiento	Concentración de compuestos fenólicos $\mu\text{g/mL}$		Veces de aumento en la absorción
	Concentración	\pm DE	
Curcumina en agua	0.09	± 0.006	-
Curcumina en aceite	0.32	± 0.02	3.55
NaCl 0.4 M, Tween 20%	1.26407	± 0.007	14.23
NaCl 0.4 M, Tween 15%	0.89	± 0.007	10.03
MgCl ₂ (3.1 mM), Tween 20%	0.89	± 0.008	10
MgCl ₂ (3.1 mM), Tween 15%	0.88	± 0.004	9.96
TIF MgCl ₂ 5.3 mM), Tween 20%	1.16	± 0.004	13.12

TIF MgCl ₂ (5.3 mM), Tween 15%	1.14	±0.010	12.82
US 9 MgCl ₂ (5.3 mM), Tween 20%	1.26	±0.002	14.16
US 9 MgCl ₂ (5.3 mM), Tween 15%	1.23	±0.006	13.87

6.4. Microencapsulación de curcumina

Se realizaron diferentes formulaciones para microencapsular a las nanoemulsiones con curcumina y los resultados se muestran en el Cuadro 5. Se utilizaron diferentes materiales de encapsulación como la goma arábica, la maltodextrina, el suero de leche y el colágeno hidrolizado. El objetivo fue identificar los materiales con mayor eficiencia de microencapsulación.

En el Cuadro 5 se observan las fórmulas F1, F2 y F3 presentaron un mayor porcentaje de eficiencia de microencapsulación; la F1 fue la que tuvo el valor más alto (59%); sin embargo, el producto tuvo una consistencia pastosa y apariencia poco seca. La fórmula con colágeno hidrolizado F3 dio una eficiencia del 54 %, seguida por la fórmula de la mezcla 1:1 de goma arábica con maltodextrina con un 52 %. La fórmula F4 presentó el menor porcentaje de eficiencia obteniendo un resultado del 48 %. En particular, en esta fórmula se presentaron complicaciones en el proceso de operación debido a que constantemente la aguja de aspersion se tapaba, por lo que fue necesario disminuir la temperatura a 130 °C; sin embargo, presentaba humedad. Posteriormente, se elevó la temperatura a 140 °C y se obtuvo un mejor secado, pero las complicaciones con la operación persistieron.

Con los resultados anteriores se seleccionaron las fórmulas F2 y F3 para la encapsulación de las nanoemulsiones.

Por otro lado, las nanoemulsiones que contenían un 15 % de tween 80 se sometieron a pruebas de secado utilizando colágeno hidrolizado como material de pared, para evaluar el efecto del tween 80 en la microencapsulación; así como, comparar los dos métodos de preparación TIF y US. Dichas nanoemulsiones corresponden a las fórmulas F5 y F6 y se compararon con la F7 que corresponde a

una nanoemulsión formulada con 20 % y elaborada con el método TIF. Se observa que en ambas formulas (F5 y F6), el porcentaje de microencapsulación fue muy bajo 16 % y 6 %, respectivamente. A pesar de que en las Figuras 8 y 14 se muestra que no hay diferencia significativa en los porcentajes de incorporación de curcumina en las nanoemulsiones y que ambas presentaron un importante incremento en la absorción de curcumina. Al momento de someterlas al secado por aspersion se observan que son nanoemulsiones muy inestables y frágiles, ya que, al incorporar el material de pared, la nanoemulsión se rompe con facilidad, por lo que, resulta un bajo porcentaje en la eficiencia de microencapsulación.

Cuadro 5. Fórmulas de microencapsulado de nanoemulsiones con curcumina.

	Fórmula	°Brix	Porcentaje de eficiencia de encapsulación	Porcentaje de recuperación	Características
F1	31 % Nanoemulsión 23 % Goma arábica 46 % Agua	36.5	59 %	39 %	 La muestra no está completamente seca, apariencia grasosa
F2	31 % Nanoemulsión 11.54 % Goma arábica 11.54 % Maltodextrina 46 % Agua	37	52 %	41 %	 La apariencia de la muestra está completamente seca con un color amarillo brillante.
F3	31 % Nanoemulsión 30 % colágeno 39 % Agua	37.5	54 %	43%	 La apariencia de la muestra está

					completamente seca con un color amarillo brillante.
F4	31% NE 23 % Suero de leche 46 % Agua	37.5	48 %	36 %	 La apariencia de la muestra está completamente seca con un color amarillo opaco.
F5	31 % Nanoemulsión (15% Tween 80, método TIF) 30 % colágeno 39 % Agua	36.5	16 %	33 %	 La apariencia de la muestra está completamente seca con un color amarillo claro.
F6	31% Nanoemulsión (15% Tween 80, método US) 30% colágeno 39 % Agua	38.7	6 %	36 %	 La apariencia de la muestra está completamente seca con un color amarillo muy tenue.
F7	31% Nanoemulsión (20% Tween 80, método TIF) 30% colágeno 39 % Agua	36.7	58 %	45 %	 La apariencia de la muestra está completamente seca con un color amarillo brillante.

La recuperación de sólidos representa el rendimiento del proceso, una variable directamente relacionada con el costo total de producción. En este trabajo, la recuperación de sólidos osciló entre 33 y 45 %. El uso de colágeno hidrolizado como agente encapsulante en el secado por aspersión tuvo un aumento en la recuperación de sólidos de un 45 %. Según Moser *et al.* (2017) y Muzaffar *et al.* (2016), durante el secado de las gotas atomizadas, las moléculas de proteína pueden migrar a la interfaz líquido-aire de las gotas, generando una película rica en proteínas que se convierte en una capa vítrea cuando se somete a aire caliente. Por tanto, las proteínas pueden cubrir ampliamente las superficies de las partículas, impidiendo así la aglomeración, disminuyendo la adherencia a la cámara de secado y, por tanto, mejorando la recuperación de sólidos, incluso en pequeñas cantidades.

Estudios realizados por Vargas *et al.* (2020) indicaron que el colágeno hidrolizado mejora la eficiencia de encapsulación y el porcentaje de recuperación, el uso del colágeno hidrolizado brinda protección del cartílago articular y consecuentemente hay una reducción de los síntomas de la osteoartritis.

Como parte de los objetivos de este proyecto, los cuales se basaron en desarrollar un suplemento que contenga todos los ingredientes funcionales para el control de la osteoartritis. El suplemento finalmente consistió una nanoemulsión con curcumina estabilizada con magnesio y microencapsulada en colágeno hidrolizado y fortificado con vitamina C. El producto obtenido podría ser una buena alternativa para el control de esta enfermedad

6.4.2. Índice de solubilidad e índice de dispersión de microencapsulado (suplemento).

El comportamiento del índice de solubilidad (Figura 15a) y dispersabilidad (Figura 15b) es similar en las formulaciones realizadas, tanto con colágeno hidrolizado como con la mezcla de maltodextrina y goma arábiga. No se observó diferencia significativa, obteniéndose valores de 86 y 84%, respectivamente, para el índice de solubilidad y 81 y 89 %, respectivamente, para el índice de dispersabilidad, lo que es positivo para las formulaciones ya que sugiere que ambas nanoemulsiones microencapsuladas en estas matrices son altamente solubles.

Durante este proceso de microencapsulación se generó el suplemento final, el cual consistió en adicionarle al microencapsulado la vitamina C a una concentración de 0.65 % p/p.

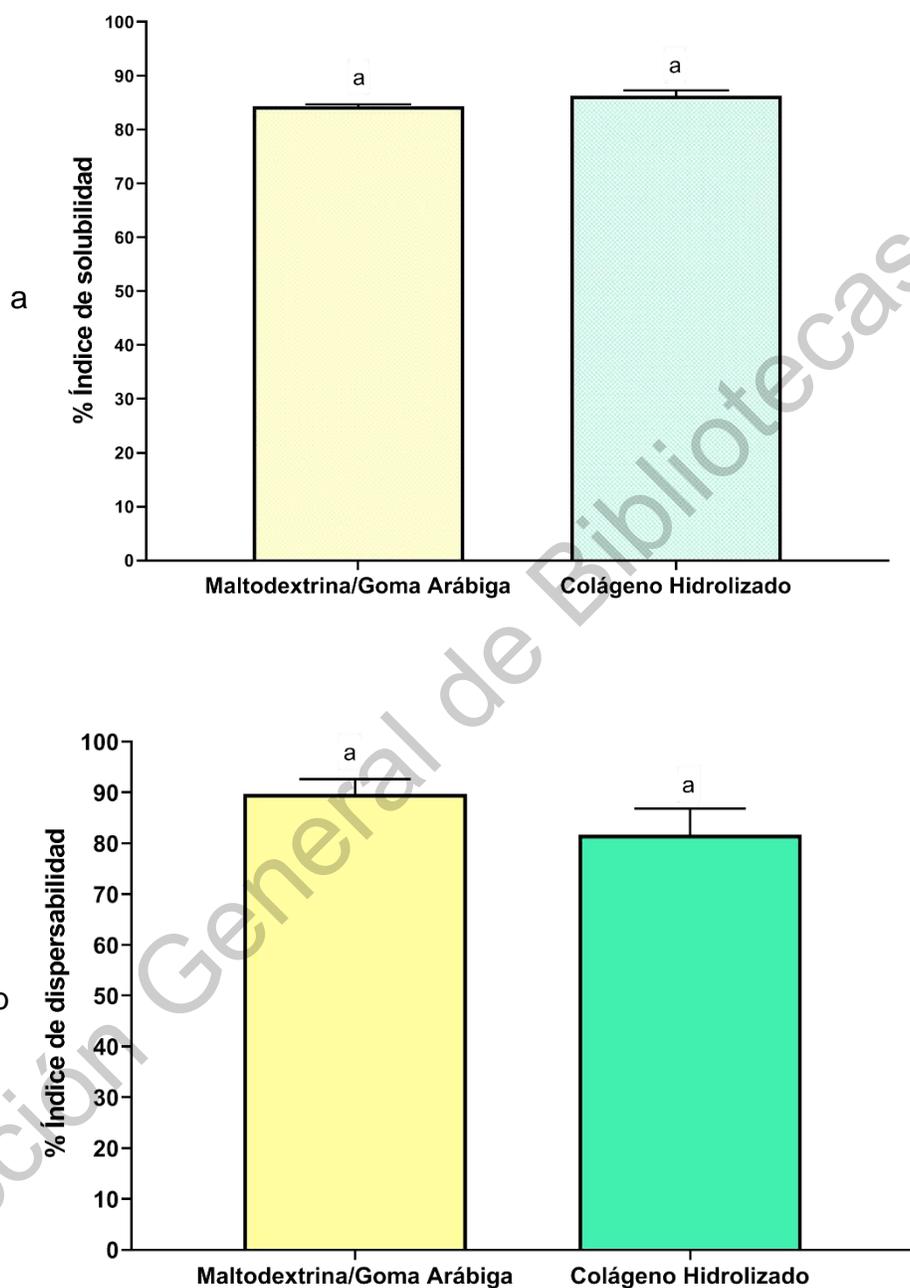


Figura 15. Índice de solubilidad (a) e índice de dispersabilidad (b) de la curcumina microencapsulada (suplemento) utilizando diferentes materiales de pared. Dos réplicas con análisis por triplicado. Resultados en media \pm DE, n = 3. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer).

6.4.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersidad de las nanoemulsiones y microencapsulado (suplemento)

La Figura 16 (a) muestra el tamaño de partícula de la emulsión control, de las nanoemulsiones elaboradas tanto por el método de temperatura de inversión de fase (TIF) como ultrasonido (US) y del microencapsulado. Las nanoemulsiones tuvieron un tamaño de partícula de 56, 78 nm y 216 nm, respectivamente. Las nanoemulsiones fueron estadísticamente más pequeñas en comparación con la emulsión control cuyo tamaño de partícula fue de 380 nm. Jintapattanakit *et al.* (2017) trabajaron con sistemas de nanoemulsiones por el método TIF utilizando aceite de coco y polietilenglicol hidrogenado como agente surfactante obteniendo tamaños de partícula entre 33 y 78 nm (PDI <0.1), lo que concuerda con estos resultados.

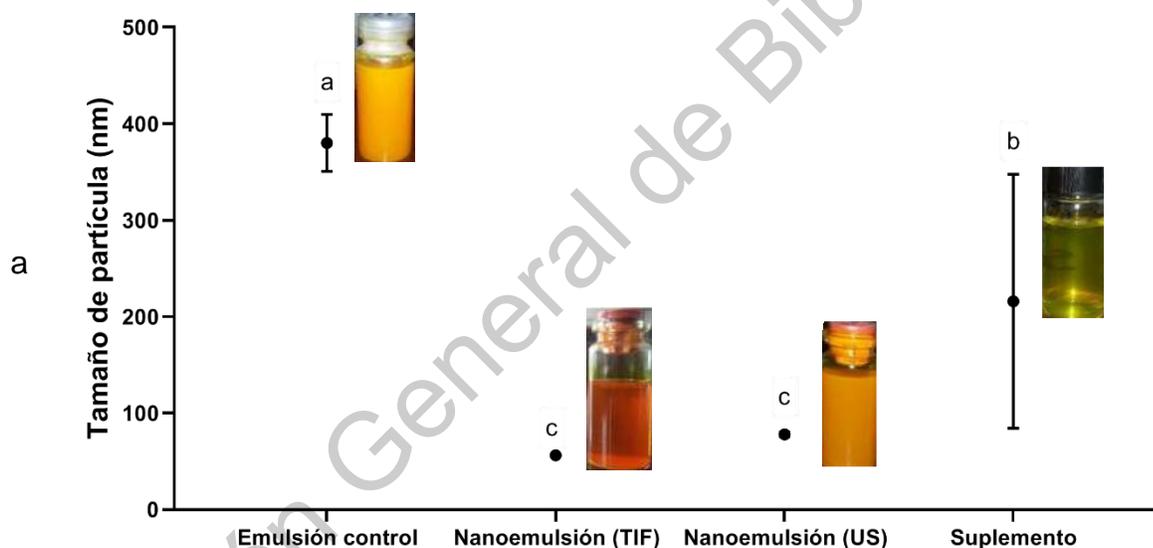
El microencapsulado presentó un tamaño de partícula 8 veces mayor que las nanoemulsiones, esto podría deberse a que, al secar a la nanoemulsión de curcumina en el secador por aspersion, utilizando colágeno hidrolizado como material de pared, se obtuvo como producto un microencapsulado que contenía a la nanoemulsión.

Por otro lado, el porcentaje de índice de polidispersidad (Figura 16 b) no muestra diferencias significativas entre las muestras, lo que indica que las tres emulsiones son uniformes en una distribución del tamaño de partícula. El tamaño de partícula menor y el bajo índice de polidispersidad puede deberse a la alta cantidad de surfactante ya que se sabe que la absorción del surfactante en la interfase aceite-agua promueve la formación de pequeñas gotas y la estabilidad se logra debido a la reducción de la tensión superficial que previene la ruptura de éstas (Ma *et al.*, 2018).

El valor relativamente más bajo de polidispersidad puede correlacionarse con mayor estabilidad durante el almacenamiento, esto se puede apreciar en las nanoemulsiones elaboradas por ambos métodos tanto TIF como US que resultaron ser emulsiones muy estables. Los tensoactivos de bajo peso molecular como el tween 80 tienden a disminuir la tensión superficial e interfacial, esto es debido a que

toda la molécula se absorbe y se orienta instantáneamente por si sola y esta partición de la molécula facilita la reducción de la tensión interfacial. El surfactante se absorbe en la superficie de las gotitas de aceite para formar una capa protectora que inhibe la agregación de las partículas, con la disminución del tamaño de partícula aumenta el área de superficie de una emulsión, por lo que se necesita mayor surfactante para estabilizar las gotitas formadas, como puede verse en la Figura 8 que a menor surfactante menor estabilidad de la emulsión.

Kim *et al.* (2012) reportaron que valores de IPD entre 0.1 y 0.4 para una nanoemulsión se puede correlacionar con una mayor estabilidad durante su almacenamiento, ya que entre más partículas haya del mismo tamaño en una emulsión habrá menor probabilidad que se presente inestabilidad como aglomeración o coalescencia.



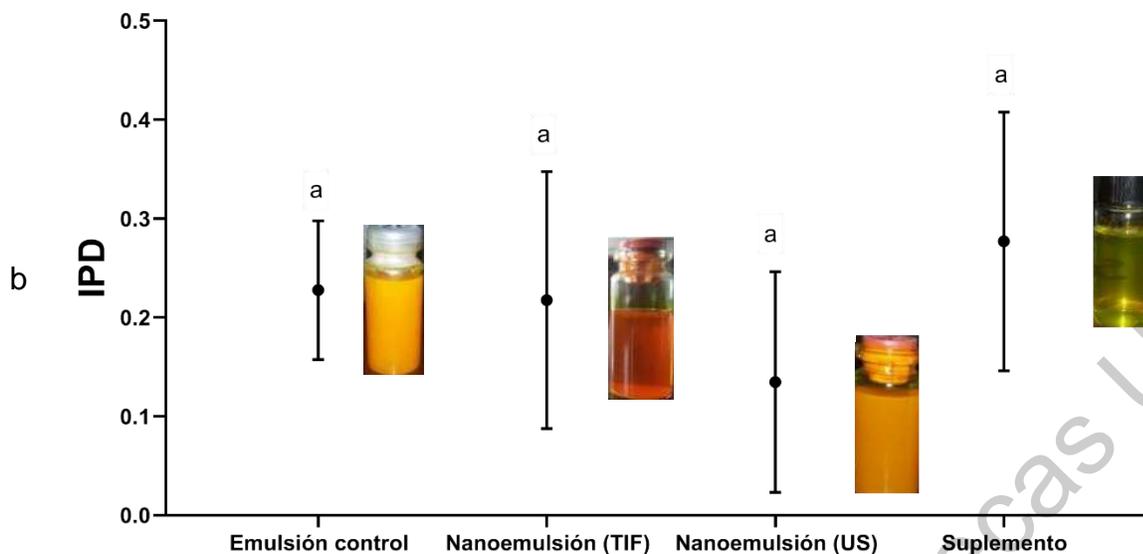


Figura 16. Tamaño de partícula (a) y porcentaje de índice de polidispersidad (b) de las nanoemulsiones y del microencapsulado (suplemento) de curcumina. Resultados son mostrados como la media \pm DE, n = 3. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$) y letras diferentes indican que hay diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer).

6.6. Concentración de curcumina en suero de animales tratados con nanoemulsión y microencapsulado (suplemento) de curcumina

Las Figura 17 muestra los resultados obtenidos de la concentración de compuestos fenólicos en suero después de administrar la curcumina a las ratas por vía intragástrica (100 mg/kg peso corporal). La curcumina se administró en forma simple (curcumina en agua), curcumina en aceite, curcumina en nanoemulsión con 20 % de tween 80 y 5.3 mM de $MgCl_2$ y curcumina nanoemulsificada y microencapsulada en colágeno hidrolizado (F3). El objetivo fue determinar la absorción de curcumina en nanoemulsión y microencapsulada comparándola con la curcumina en agua.

Los resultados muestran que, tanto la curcumina en nanoemulsión como la curcumina nanoemulsificada y microencapsulada (suplemento), aumentaron la concentración de curcumina en suero significativamente, desde 0.088 $\mu g/mL$ que corresponde a curcumina en agua, a 1.16 y 1.28 $\mu g/mL$, respectivamente.

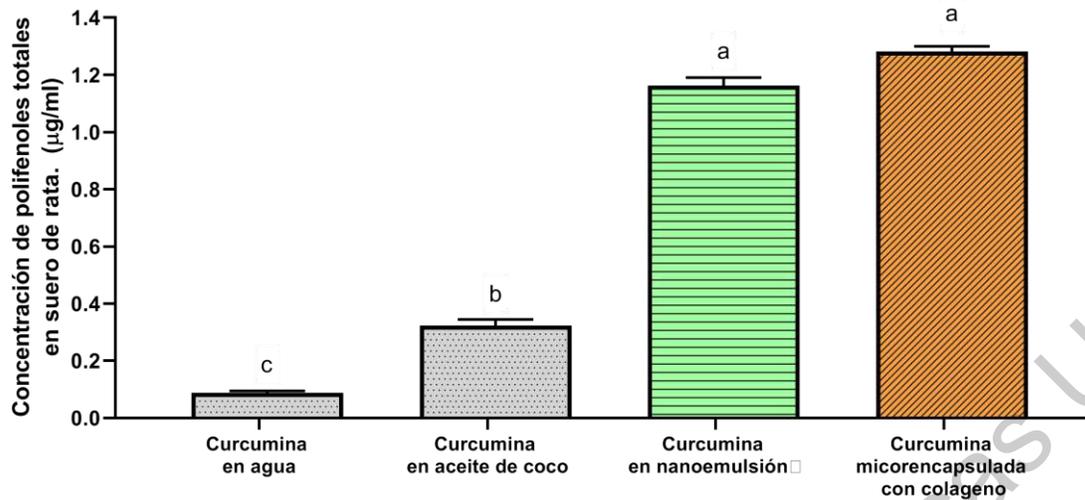


Figura 17. Concentración de compuestos fenólicos en suero de curcumina¹ en nanoemulsión y microencapsulada. Resultados en media \pm DE. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer). ¹Dosis equivalente a 100 mg/kg de curcumina y la medición se realizó 2 h después de la administración del tratamiento.

Se observa también que, a pesar de que la curcumina nanoemulsificada fue sometida a un proceso de secado por aspersión, no hubo degradación de curcumina quedando presente dentro de una doble encapsulación, primeramente, encapsulada en una nanoemulsión y segundo microencapsulada en colágeno hidrolizado. con un aumento entre 13 y 14 veces con relación a la curcumina en su forma simple.

Estudios realizados por Vargas *et al.* (2020) reportaron al colágeno hidrolizado como medio encapsulante de cocona que es una fruta amazónica, sugieren que el colágeno hidrolizado puede estar ubicado en la superficie de las partículas de la nanoemulsión. Esto podría darse por su preferencia de migrar a la interface aire-líquido de las gotas atomizadas durante el secado y por la flexibilidad de la película circundante que permite que las gotas se expandan, debido a la formación de vapor de agua en el interior, seguido luego por una contracción de las partículas sin ruptura. Por lo tanto, la proteína podría estar participando como formador de película, protegiendo la integridad de la nanoemulsión, por lo que, observamos que no hay diferencia significativa en cuanto a la absorción de curcumina comparando la administración de esta en forma de nanoemulsión o microencapsulada.

Con base en este resultado se podría concluir que la encapsulación de la nanoemulsión en colágeno hidrolizado podría ser una buena opción para formular un suplemento alimenticio y complementando con más estudios que avalen su funcionalidad podría proponerse como una opción para el control de la osteoartritis. Aunque es importante considerar que el costo del proceso puede verse incrementando ya que, si bien el colágeno es un buen medio de encapsulación, los porcentajes de eficiencia son alrededor del 50%, por lo que la concentración de curcumina se diluye a la mitad comparándola con la concentración de curcumina que hay en la nanoemulsión original.

6.7. Capacidad antioxidante DPPH y ABTS

En la Figura 18a y 18b se presentan los resultados de la capacidad antioxidante DPPH y ABTS de la curcumina en las diferentes preparaciones. El DPPH produce un color violeta en presencia de etanol y cuando el radical libre reacciona con un material antioxidante, su propiedad de radical libre se pierde y su color cambia a amarillo claro (Gangurde *et al.*, 2015).

La Figura 18a muestra la capacidad antioxidante de la curcumina en diferentes sistemas: curcumina en agua, curcumina en aceite, curcumina en nanoemulsión, curcumina microencapsulada (suplemento) y suero de ratas control administradas con curcumina en agua, nanoemulsión y microencapsulados (suplemento). Los resultados muestran que los porcentajes de inhibición fueron del 86.76 ± 0.46 , 90.10 ± 1.33 , 96.06 ± 3.11 , 94.92 ± 2.54 , 11.76 ± 1.36 , 34.55 ± 5.35 y 31.18 ± 4.09 , respectivamente.

Como observamos, la nanoemulsión y el suplemento mostraron una mayor capacidad antioxidante (>11 %) en comparación con la de la curcumina en agua. Lo anterior se puede atribuirse a su reducción de tamaño (mayor área de superficie) y la exposición de un número relativamente mayor de grupos OH de las moléculas de curcumina para reducir los radicales libres (Rao & Khanum, 2016). Por otro lado, los sueros mostraron un resultado muy bajo de porcentaje de inhibición, esto puede deberse en gran medida a la baja concentración de curcumina en suero comparada con la nanoemulsión o en el suplemento. Si bien, la concentración de curcumina es

más baja en el suplemento que en la nanoemulsión, el alto valor de porcentaje de inhibición puede deberse también a la presencia de la vitamina C en el suplemento.

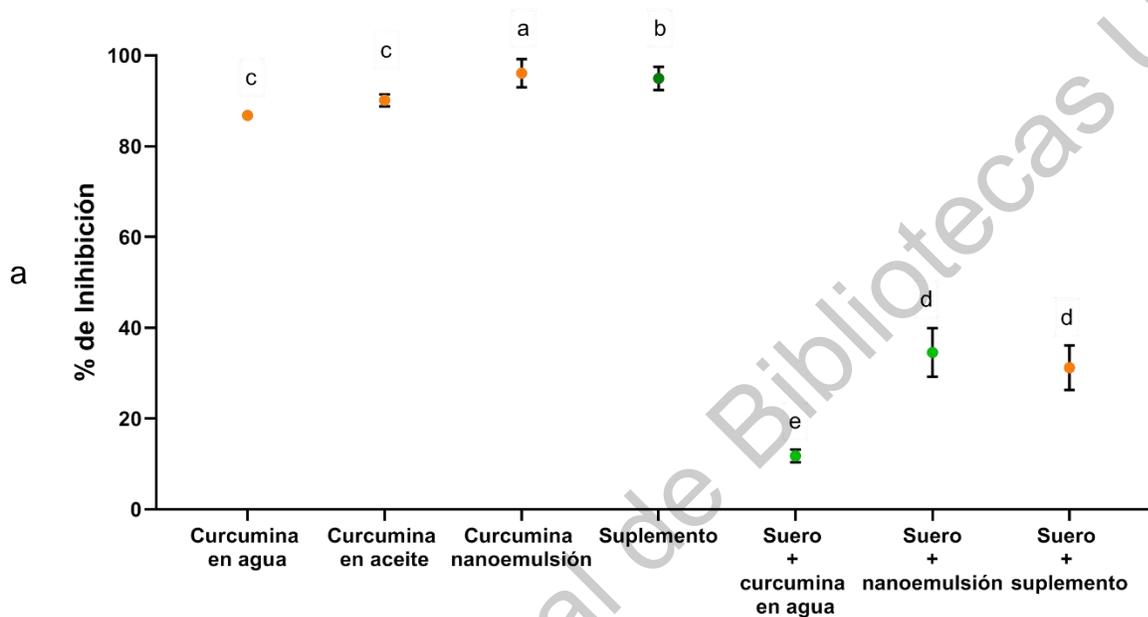
Por otro lado, el ensayo de ABTS se basa en la reducción del catión radical preformado ABTS mediante la adición de antioxidantes (Gounder y Lingamallu, 2012). La Figura 18b muestra la capacidad antioxidante por medio del ensayo de ABTS de la curcumina en los diferentes sistemas: curcumina en agua, curcumina en aceite, curcumina en nanoemulsión, curcumina microencapsulada (suplemento) y suero de ratas control administradas con curcumina en agua, nanoemulsión y microencapsulado (suplemento). Los resultados indican que los porcentajes de inhibición para DPPH fueron del 51.79 ± 3.76 , 58.34 ± 6.89 , 65.88 ± 3.30 , 70.19 ± 4.47 , 11.27 ± 1.47 , 34.87 ± 4.24 y 36.54 ± 3.28 %, respectivamente. La nanoemulsión y el suplemento mostraron 27 % y 35 % mayor efecto antioxidante en relación con la curcumina en agua, debido a que la nanoemulsión aumenta la curcumina disponible por lo que mejora su capacidad antioxidante.

Con respecto a la capacidad antioxidante medida en suero, aunque el resultado muestra una diferencia significativamente menor comparando con el resultado de las nanoemulsiones y del suplemento, se mejoró el porcentaje de inhibición, resultados similares a los obtenidos para DPPH.

En ambos casos (DPPH y ABTS), la nanoemulsión y el suplemento tuvieron un incremento en el efecto antioxidante en comparación con la curcumina en agua, debido a que el tween 80 contribuye a facilitar la disolución de la curcumina en la fase oleica lo que conduce a una mayor capacidad antioxidante. Joung *et al.* (2016) demostraron que tanto el aceite como el tensoactivo mejoran la actividad de eliminación de radicales en las nanoemulsiones al influir en la cantidad de curcumina solubilizada que actúa como antioxidante.

Es importante indicar que el efecto antioxidante es similar para ambos ensayos, lo que sugiere que este efecto es atribuido a compuestos antioxidantes polares, medido por el método ABTS y algunos menos polares, determinado por DPPH. Por lo tanto, además de la curcumina existen otros compuestos más como la vitamina C, la que pudiera también contribuir a esta propiedad.

Con todos estos resultados se logró el diseño del suplemento y, de acuerdo con las dosis recomendadas en diferentes estudios de los compuestos bioactivos que contribuyen en el control de la osteoartritis, se podría recomendar una ingesta diaria de 10 g del suplemento dos a tres veces al día. Sin embargo, se requiere realizar estudios que demuestren su beneficio en un estado de osteoartritis.



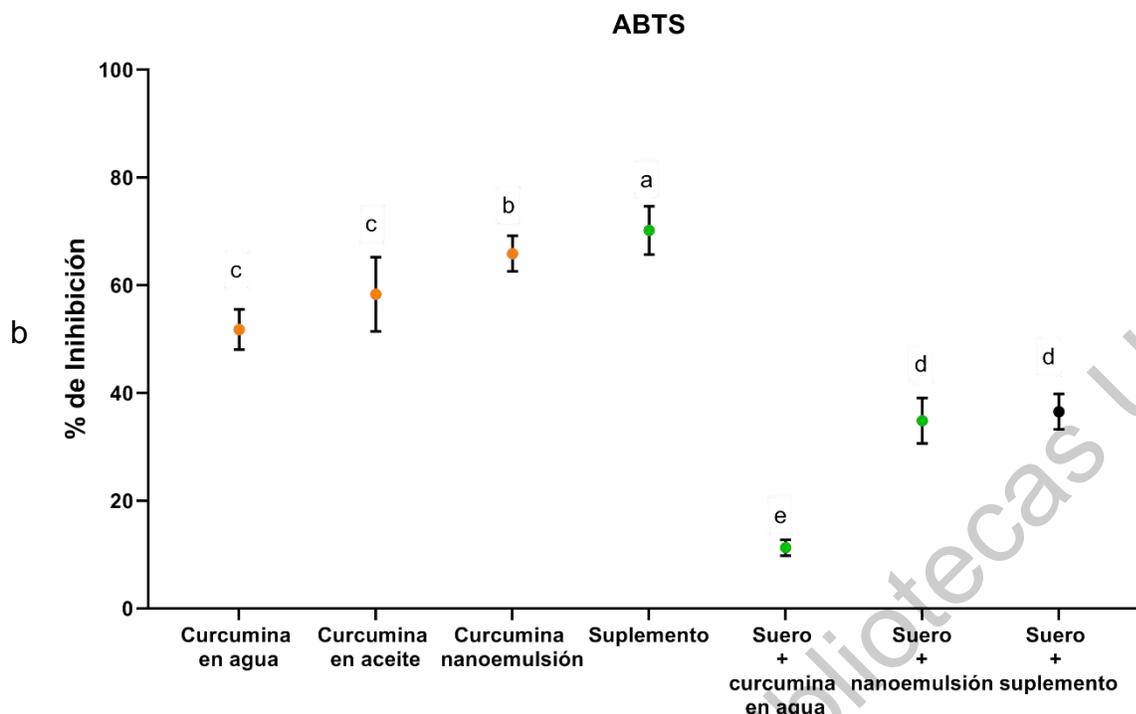


Figura 18. Capacidad antioxidante medida por los ensayos DPPH (a) y ABTS (b) de la curcumina en nanoemulsiones y suplemento, así como en suero de ratas tratadas con estos productos después de 2 h de administración del tratamiento. Resultados en media \pm DE n = 3. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer).

6. CONCLUSIONES

La curcumina es un compuesto hidrofóbico, lo que dificulta su absorción; sin embargo, al incorporarlo en una matriz lipídica como el aceite de coco mejora de forma significativa su solubilidad, contribuyendo a una mejor absorción.

Incorporar a la curcumina en una nanoemulsión resulta de gran relevancia para mejorar su absorción. Los métodos de temperatura de inversión de fase y ultrasonido generaron nanoemulsiones de curcumina con alta eficiencia de incorporación, destacando la importancia del surfactante tween 80 y del cloruro de magnesio sobre la mejora en la estabilidad de la emulsión.

El colágeno hidrolizado es un buen material encapsulante para las nanoemulsiones, ya que, además de mantener la concentración de la curcumina, presentó una buena solubilidad y un aumento significativo en la absorción de la

curcumina; sin embargo, se destaca la importancia de realizar más pruebas que optimicen el porcentaje de encapsulación.

Basados en estos resultados se podría sugerir que se obtuvo un producto que podría tener potencial como un suplemento que contribuya al control de la osteoartritis, con capacidad antioxidante; sin embargo, se destaca la importancia de realizar más estudios que comprueben la funcionalidad del producto sobre la enfermedad de osteoartritis.

7. REFERENCIAS

- Aditya, N. P., Aditya, S., Yang, H., Kim, H. W., Park, S. O., & Ko, S. (2015). Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. *Food Chemistry*, 173, 7-13.
- Anderson, R. A., Conway, H., & Peplinski, A. J. (1970). Gelatinization of corn grits by roll cooking, extrusion cooking and steaming. *Starch-Stärke*, 22(4), 130-135.
- Araiza, A., Akhtar, M., & Sarkar, A. (2018). Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: from encapsulation to bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 155-169.
- Bengmark, S. (2006). Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFκB, cyclooxygenase 2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 30(1), 45-51.
- Brand, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Calligaris, S., Valoppi, F., Barba, L., Pizzale, L., Anese, M., Conte, L., & Nicoli, M. C. (2017). Development of transparent curcumin loaded nanoemulsions by phase inversion temperature (PIT) method: effect of lipid type and physical state on curcumin stability. *Food Biophysics*, 12(1), 45-51.

- Chen, Y., and Brown, C. (2020). Embrittlement of collagen in early-stage human osteoarthritis. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 104, 103663.
- Chiu, P. R., Hu, Y. C., Huang, T. C., Hsieh, B. S., Yeh, J. P., Cheng, H. L & Chang, K. L. (2017). Vitamin C protects chondrocytes against monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis by multiple pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 38.
- Comblain, F., Sanchez, C., Lespoune, I., Balligand, M., Serisier, S., & Henrotin, Y. (2015). Curcuminoids extract, hydrolyzed collagen and green tea extract synergically inhibit inflammatory and catabolic mediator's synthesis by normal bovine and osteoarthritic human chondrocytes in monolayer. *PLoS One*, 10(3).
- Di Meo, F., Margarucci, S., Galderisi, U., Crispi, S., & Peluso, G. (2019). Curcumin, gut microbiota, and neuroprotection. *Nutrients*, 11(10), 2426.
- Espinosa, R., Alcántar-Ramírez, J., Arce-Salinas, C. A., Chávez-Espina, L. M., Esquivel-Valerio, J. A., Gutiérrez-Gómez, J. J., & Santillán-Barrera, E. (2018). Reunión multidisciplinaria de expertos para el diagnóstico y tratamiento de la osteoartritis. Actualización basada en evidencias. *Medicina Interna de México*, 34(3), 443-476.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139-8144.
- Fernández, M., Rego, I., & Blanco, F. J. (2007). Genética en la osteoartritis. *Reumatología Clínica*, 3, S13-S18.
- Ferreira, S., Malacrida, C. R., & Nicoletti, V. R. (2019). Influence of emulsification methods and spray drying parameters on the microencapsulation of turmeric oleoresin. *Journal of Food and Agriculture*, 491-500.

- Gangurde, A. B., Kundaikar, H. S., Javeer, S. D., Jaiswar, D. R., Degani, M. S., & Amin, P. D. (2015). Enhanced solubility and dissolution of curcumin by a hydrophilic polymer solid dispersion and its insilico molecular modeling studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 29, 226-237.
- Glyn, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H., & Carr, A. J. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, 386(9991), 376-387.
- Gounder, D. K., & Lingamallu, J. (2012). Comparison of chemical composition and antioxidant potential of volatile oil from fresh, dried and cured turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes. *Industrial Crops and Products*, 38, 124-131.
- Gupte, P. A., Giramkar, S. A., Harke, S. M., Kulkarni, S. K., Deshmukh, A. P., Hingorani, L. L., ... & Bhalerao, S. S. (2019). Evaluation of the efficacy and safety of Capsule Longvida® Optimized Curcumin (solid lipid curcumin particles) in knee osteoarthritis: a pilot clinical study. *Journal of Inflammation Research*, 12, 145-152.
- Henrotin, Y., Lambert, C., Couchourel, D., Ripoll, C., & Chiotelli, E. (2011). Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? a narrative review from the lessons taken with five products. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(1), 1-21.
- Jäger, R., Lowery, R. P., Calvanese, A. V., Joy, J. M., Purpura, M., & Wilson, J. M. (2014). Comparative absorption of curcumin formulations. *Nutrition Journal*, 13(1), 11-19
- Ji, J., Fitzpatrick, J., Cronin, K., Crean, A., & Miao, S. (2016). Assessment of measurement characteristics for rehydration of milk protein-based powders. *Food Hydrocolloids*, 54, 151-161.
- Jiang, T., Liao, W., & Charcosset, C. (2020). Recent advances in encapsulation of curcumin in nanoemulsions: a review of encapsulation technologies, bioaccessibility and applications. *Food Research International*, 132, 109035.

- Jintapattanakit, A., Hasan, H. M., & Junyaprasert, V. B. (2018). Vegetable oil-based nanoemulsions containing curcuminoids: formation optimization by phase inversion temperature method. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44, 289-297.
- Joung, H. J., Choi, M. J., Kim, J. T., Park, S. H., Park, H. J., & Shin, G. H. (2016). Development of food-grade curcumin nanoemulsion and its potential application to food beverage system: antioxidant property and in vitro digestion. *Journal of Food Science*, 81(3), N745-N753.
- Kisling, A., Lust, R. M., & Katwa, L. C. (2019). What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease?. *Life Sciences*, 228, 30-34
- Kim, K. H., Lee, E. N., Park, J. K., Lee, J. R., Kim, J. H., Choi, H. J., & Yoon, S. (2012). Curcumin attenuates TNF- α -induced expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1 and proinflammatory cytokines in human endometriotic stromal cells. *Phytotherapy Research*, 26(7), 1037-1047.
- Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Padmavathi, G., Monisha, J., Roy, N. K., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2017). Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1325-1348.
- Kuptniratsaikul, V., Dajpratham, P., Taechaarpornkul, W., Buntragulpoontawee, M., Lukkanapichonchut, P., Chootip, C. & Laongpech, S. (2014). Efficacy and safety of domestic curcuma extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: a multicenter study. *Clinical Interventions in Aging*, 9, 451-458.
- Li, J., Hwang, I. C., Chen, X., & Park, H. J. (2016). Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. *Food Hydrocolloids*, 60, 138-147.
- Lim, Y. Z., Hussain, S. M., Cicuttini, F. M., & Wang, Y. (2019). Nutrients and dietary supplements for osteoarthritis. *In Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. 2, 97-137.

- Lin, C. C., Lin, H. Y., Chi, M. H., Shen, C. M., Chen, H. W., Yang, W. J., & Lee, M. H. (2014). Preparation of curcumin nanoemulsions with food-grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the HepG2 cell line. *Food Chemistry*, 154, 282-290
- Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R., & Goldring, M. B. (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis & Rheumatism*, 64(6), 1697-1707.
- Lopez, H. L. (2012). Nutritional interventions to prevent and treat osteoarthritis. Part II: focus on micronutrients and supportive nutraceuticals. *Physical Medicine and Rehabilitation*, 4(5), S155-S168.
- Ma, P., Zeng, Q., Tai, K., He, X., Yao, Y., Hong, X., & Yuan, F. (2018). Development of stable curcumin nanoemulsions: Effects of emulsifier type and surfactant-to-oil ratios. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3485-3497.
- Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Saha, B. P., & Mukherjee, P. K. (2007). Curcumin–phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 330(1-2), 155-163.
- McAlindon, T., & T Felson, D., (1997). Nutrition: risk factors for osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 56(7), 397-400.
- McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285-330.
- McClements, D. J., Zou, L., Zhang, R., Salvia, L., Kumosani, T., & Xiao, H. (2015). Enhancing nutraceutical performance using excipient foods: Designing food structures and compositions to increase bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 824-847.
- Moser, P., Souza, R. T. D., & Nicoletti Telis, V. R. (2017). Spray drying of grape juice from hybrid cv. BRS Violeta: microencapsulation of anthocyanins using

protein/maltodextrin blends as drying aids. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12852.

Muñoz, Ó. A., Torres, G. A., Núñez, J. A., Rosa, L. A., Rodrigo, J., Ayala, J. F., & Álvarez, E. (2017). New approach to the interaction between Folin-Ciocalteu reactive and sugars during the quantification of total phenols. *TIP. Magazine Specialized in Chemical-Biological Sciences*, 20(2), 23-28.

Muzaffar, K., & Kumar, P. (2016). Effect of soya protein isolate as a complementary drying aid of maltodextrin on spray drying of tamarind pulp. *Drying Technology*, 34(1), 142-148.

Panahi, Y., Rahimnia, A. R., Sharafi, M., Alishiri, G., Saburi, A., & Sahebkar, A. (2014). Curcuminoid treatment for knee osteoarthritis: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Phytotherapy Research*, 28(11), 1625-1631.

Pelaez, I., Sanin, L. H., Moreno, J., Alvarez, J., Burgos, R., Garza, M. & Santana, N. (2011). Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *The Journal of Rheumatology Supplement*, 86, 3-8.

Prasad, S., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. (2014). Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 46(1), 2-18.

Puigdellivol, J., Comellas Berenger, C., Pérez Fernández, M. Á., Cowalinsky Millán, J. M., Carreras Vidal, C., Gil, I. & Aguilar Hernández, M. E. (2019). Effectiveness of a dietary supplement containing hydrolyzed collagen, chondroitin sulfate, and glucosamine in pain reduction and functional capacity in osteoarthritis patients. *Journal of Dietary Supplements*, 16(4), 379-389.

Rao, P. J., & Khanum, H. (2016). A green chemistry approach for nanoencapsulation of bioactive compound—Curcumin. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 695-702.

- Ragle, R. L., & Sawitzke, A. D. (2012). Nutraceuticals in the management of osteoarthritis. *Drugs & Aging*, 29(9), 717-731.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Ren, G., Sun, Z., Wang, Z., Zheng, X., Xu, Z., & Sun, D. (2019). Nanoemulsion formation by the phase inversion temperature method using polyoxypropylene surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 540, 177-184.
- Schadow, S., Simons, V. S., Lochnit, G., Kordelle, J., Gazova, Z., Siebert, H. C., & Steinmeyer, J. (2017). Metabolic response of human osteoarthritic cartilage to biochemically characterized collagen hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 207-227.
- Shmagel, A., Onizuka, N., Langsetmo, L., Vo, T., Foley, R., Ensrud, K., & Valen, P. (2018). Low magnesium intake is associated with increased knee pain in subjects with radiographic knee osteoarthritis: data from the osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis and Cartilage*, 26(5), 651-658.
- Simons, V. S., Lochnit, G., Wilhelm, J., Ishaque, B., Rickert, M., & Steinmeyer, J. (2018). Comparative analysis of peptide composition and bioactivity of different collagen hydrolysate batches on human osteoarthritic synoviocytes. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Solans, C., & Solé, I. (2012). Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 246-254.
- Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y., & Wada, K. (2009). Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-

encapsulated curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9141-9146.

Tayyem, R. F., Heath, D. D., Al-Delaimy, W. K., & Rock, C. L. (2006). *Curcumin content of turmeric and curry powders. Nutrition and Cancer*, 55(2), 126-131.

Toden, S., & Goel, A. (2017). The holy grail of curcumin and its efficacy in various diseases: is bioavailability truly a big concern? *Journal of Restorative Medicine*, 6(1), 27-36?.

Vargas, D. P., Cardoso da Silva, L., Neves de Oliveira, L. A., Teixeira, H., & Kurozawa, L. E. (2021). 5-caffeoylquinic acid retention in spray drying of cocona, an Amazonian fruit, using hydrolyzed collagen and maltodextrin as encapsulating agents. *Drying Technology*, 39(12), 1854-1868.

Wu, M. H., Yan, H. H., Chen, Z. Q., & He, M. (2017). Effects of emulsifier type and environmental stress on the stability of curcumin emulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 38(10), 1375-1380.

Yu, H., Shi, K., Liu, D., & Huang, Q. (2012). Development of a food-grade organogel with high bioaccessibility and loading of curcuminoids. *Food Chemistry*, 131(1), 48-54.

Zhang, Y., Xu, J., Qin, L., & Jiang, Q. (2016). Magnesium and osteoarthritis: from a new perspective. *Annals Joint*, 1, 29-42.

Zhongfa, L., Chiu, M., Wang, J., Chen, W., Yen, W., Fan, P. & Chan, K. K. (2012). Enhancement of curcumin oral absorption and pharmacokinetics of curcuminoids and curcumin metabolites in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 69(3), 679-689.