

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Caracterización, nanoencapsulación y evaluación de actividades
biológicas de los polifenoles del rizoma de *Curcuma longa* L. cultivada
en Costa Rica

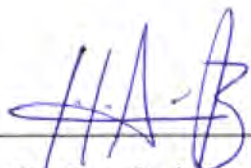
*Tesis sometida a evaluación como parte de los requisitos para optar por el grado de
Licenciatura en Química*

María Isabel Quirós Fallas

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2022

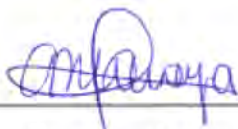
Esta Tesis fue aprobada con distinción por la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química



Dr. Juan José Araya
Presidente del Tribunal



Dra. Mirtha Navarro Hoyos
Directora del trabajo



Dra.-Ing. Andrea Araya Sibaja
Miembro del comité asesor



Dra. Silvia Quesada Mora
Miembro del comité asesor



Dr. Renato Murillo Masís
Miembro del Tribunal



María Isabel Quirós Fallas
Postulante

Resumen

La cúrcuma (*Curcuma longa L.*) ha sido comúnmente utilizada como especia y colorante natural, sin embargo, ha experimentado un incremento considerable en su demanda a nivel global debido a sus potenciales beneficios para la salud. Sus principales compuestos fenólicos, denominados curcuminoides, corresponden a bis-demetoxicurcumina (BDM), demetoxicurcumina (DMC) y curcumina (CUR). En el presente proyecto, como una primera etapa, se llevó a cabo la optimización de un método de extracción por medio de Extracción Líquida Presurizada (PLE) para obtener extractos fenólicos de cúrcuma cultivada en distintas regiones de Costa Rica. A dichos extractos se les determinó el contenido de los tres curcuminoides principales, así como su capacidad reductora por medio del ensayo de Folin-Ciocalteu y actividad antioxidante por medio del método DPPH. Como una segunda etapa, se llevó a cabo el aislamiento de los tres curcuminoides principales, los cuales se caracterizaron por UHPLC-DAD-MS y RMN. Siendo CUR el curcuminoide más estudiado de los tres por sus actividades biológicas, se procedió a llevar a cabo la preparación de nanopartículas híbridas lípido-polímero (LPN) con la CUR aislada, por medio de un método previamente optimizado. Las nanopartículas se caracterizaron por medio de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), y se determinó la eficiencia de encapsulación (%EE), el tamaño medio de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el perfil de liberación *in vitro* de las nanopartículas preparadas. Finalmente, se evaluó la actividad antioxidante y la citotoxicidad *in vitro* de las nanopartículas preparadas en dos líneas celulares tumorales humanas: adenocarcinoma gástrico (AGS) y adenocarcinoma colorrectal (SW-620).

Agradecimientos

Quiero empezar por agradecer a mi familia, a mis abuelos, a mi papá y a mi mamá por su apoyo incondicional.

A mis amigos y cada uno de mis compañeros del laboratorio BIODISS por la compañía, las enseñanzas y el apoyo a través de los años.

A la Dra. Andrea Araya y la Dra. Silvia Quesada por su invaluable guía en el presente proyecto.

Y finalmente, el más cálido y afectuoso agradecimiento para mi directora de tesis y mentora, la Dra. Mirtha Navarro, por tantas enseñanzas, apoyo y cariño, no solo en la elaboración del presente proyecto, sino a lo largo de los últimos siete años, en los que me ha permitido crecer como profesional y como persona acompañada de su guía.

Índice

Resumen.....	3
Agradecimientos.....	4
1. Introducción.....	9
1.1 <i>Curcuma longa</i> L. como tendencia en el mundo.....	10
1.1.1 Los tres curcuminoides principales.....	10
1.1.2 Métodos de extracción en la obtención de curcuminoides.....	11
1.1.3 Purificación de curcuminoides.....	13
1.2 Actividades biológicas de los curcuminoides.....	13
1.2.1 Actividad anticancerígena de la curcumina.....	16
1.2.2 Actividad antioxidante de la curcumina.....	17
1.2.3 Estudios de evaluación <i>in vitro</i>	18
1.2.3.1 Métodos de estudio de actividad anticancerígena.....	18
1.2.3.2 Métodos de estudio de actividad antioxidante.....	19
1.2.4 La barrera de la biodisponibilidad.....	20
1.3 Estrategias basadas en nanotecnología para mejorar la biodisponibilidad.....	21
1.3.1 Tipos de nanopartículas utilizadas en la mejora de la biodisponibilidad.....	23
1.3.2 Avances en la nanoencapsulación de la curcumina para mejorar su biodisponibilidad.....	25
1.4 Situación en Costa Rica.....	26
1.5 Objetivos del proyecto.....	28
2. Metodología.....	29
2.1 Materiales.....	29
2.1.1 Estándares, reactivos y solventes.....	29
2.1.2 Rizomas de <i>Curcuma longa</i>	29
2.2 Secado de la muestra.....	29
2.3 Extracción de la muestra.....	30
2.3.1 Extracción mediante el método de la Farmacopea Estadounidense (USP)....	30
2.3.2 Extracción por medio de un equipo de extracción líquida presurizada (PLE).....	30

2.3.2.1	Diseño factorial preparado para la optimización del método de extracción por PLE.....	31
2.4	Identificación y cuantificación de curcuminoides.....	31
2.4.1	Preparación de las disoluciones para análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y espectroscopía de masas (MS).....	31
2.4.2	Método de análisis para HPLC-DAD-MS.....	32
2.4.3	Identificación de curcuminoides por medio de HPLC-MS.....	34
2.4.4	Cuantificación de los tres curcuminoides principales.....	34
2.5	Análisis de los extractos obtenidos por medio del método de la USP y el método optimizado de PLE.....	35
2.5.1	Curva de calibración y condiciones de equipo para la cuantificación de curcuminoides extraídos por medio del método USP.....	35
2.5.2	Curvas de calibración y condiciones de equipo para la cuantificación de curcuminoides extraídos por medio de PLE.....	35
2.6	Evaluación del potencial antioxidante.....	36
2.6.1	Capacidad reductora por el método de Folin-Ciocalteu.....	36
2.6.2	Evaluación del potencial antioxidante por medio del método DPPH.....	37
2.7	Purificación de los tres curcuminoides principales presentes en <i>Curcuma longa</i>	38
2.7.1	Purificación de los curcuminoides mediante una columna cromatográfica.....	38
2.7.2	Purificación de CUR mediante procesos de cristalización.....	39
2.7.3	Caracterización por RMN de los tres curcuminoides purificados.....	39
2.8	Preparación y caracterización de nanopartículas híbridas lípido-polímero de curcumina.....	39
2.8.1	Eficiencia de encapsulación.....	40
2.8.2	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	40
2.8.3	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	40
2.8.4	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM).....	41
2.8.5	Perfil de liberación de LPN-CUR <i>in vitro</i>	41
2.9	Evaluación de actividad antioxidante y citotoxicidad de CUR y las LPN preparadas.....	41
2.9.1	Actividad antioxidante de CUR y LPN-CUR por medio del método DPPH..	41

2.9.2	Evaluación de la citotoxicidad por MTT de CUR y las LPN preparadas.....	42
3.	Resultados.....	43
3.1	Cuantificación de curcuminoides en las muestras extraídas a partir del método de la USP.....	43
3.2	Optimización de la extracción por PLE mediante un diseño factorial.....	44
3.3	Cuantificación de curcuminoides extraídos por medio del método PLE.....	45
3.4	Perfil polifenólico de rizomas de <i>C. longa</i> mediante UHPLC-ESI-MS.....	48
3.5	Evaluación del potencial antioxidante de las muestras extraídas por medio del método optimizado del PLE.....	51
3.5.1	Capacidad reductora a partir de la valoración Folin-Ciocalteu para las muestras extraídas por medio del método optimizado del PLE.....	51
3.5.2	Evaluación del potencial antioxidante por medio del método DPPH para las muestras extraídas con el método optimizado del PLE.....	54
3.6	Aislamiento y purificación de los tres curcuminoides principales.....	57
3.6.1	Aislamiento por columna cromatográfica.....	57
3.6.2	Purificación de curcumina mediante cristalización.....	59
3.6.3	Caracterización por resonancia magnética nuclear (RMN) de los curcuminoides purificados.....	59
3.7	Preparación y caracterización de las nanopartículas híbridas lípido-polímero de CUR.....	63
3.7.1	Porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE).....	65
3.7.2	Tamaño y morfología de las partículas.....	66
3.7.3	Perfil de liberación <i>in vitro</i>	67
3.8	Evaluación de actividades biológicas <i>in vitro</i> de las nanopartículas preparadas.....	69
3.8.1	Evaluación de la actividad antioxidante de CUR y LPN-CUR.....	69
3.8.2	Evaluación de la actividad citotóxica por el método MTT de CUR libre, LPN-BL y LPN-CUR.....	70
	Conclusiones.....	73
	Bibliografía.....	75

Los resultados de esta investigación fueron publicados parcialmente en:

Quirós-Fallas, M.I.; Vargas-Huertas, F.; Quesada-Mora, S.; Azofeifa-Cordero, G.; Wilhelm-Romero, K.; Vásquez-Castro, F.; Alvarado-Corella, D.; Sánchez-Kopper, A.; Navarro-Hoyos, M. Polyphenolic HRMS Characterization, Contents and Antioxidant Activity of *Curcuma longa* Rhizomes from Costa Rica. *Antioxidants* **2022**, *11*, 620, doi:10.3390/antiox11040620.

Los resultados de esta investigación están siendo publicados parcialmente en:

Quirós-Fallas, M.I.; Wilhelm-Romero, K.; Quesada-Mora, S.; Azofeifa-Cordero, G.; Vargas-Huertas, F.; Alvarado-Corella, D.; Mora-Román, J.J.; Vega-Baudrit, J.R.; Navarro-Hoyos, M.; Araya-Sibaja, A.M. Curcumin Hybrid Lipid Polymeric Nanoparticles: Antioxidant Activity, Immune Cellular Response and Cytotoxicity evaluation. En revisión en *Biomedicines*, Julio 2022.

1. Introducción

Los productos naturales han sido utilizados por milenios, sin embargo, en los últimos años la demanda de estos ha incrementado considerablemente por la creciente información acerca de sus actividades biológicas. Históricamente, los productos naturales han jugado un papel importante en el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer y enfermedades infecciosas, como también en áreas terapéuticas de enfermedades cardiovasculares y esclerosis múltiple. Los potenciales beneficios para la salud de los productos naturales hacen que sea importante su estudio para facilitar su aplicabilidad de una manera más efectiva y segura.^{1,2}

El rizoma de la cúrcuma (*Curcuma longa L.*) ha sido ampliamente utilizado como especia y colorante natural, y recientemente se ha incrementado aún más su demanda y consumo por sus potenciales efectos beneficiosos para la salud, primordialmente atribuidos a sus principales metabolitos, que corresponden a los curcuminoides bis-demetoxicurcumina, demetoxicurcumina y curcumina. Estos compuestos son polifenoles que han demostrado tener una amplia gama de actividades biológicas, siendo la curcumina el más estudiado y el compuesto más abundante de los tres curcuminoides principales.³

En efecto, la curcumina presenta características estructurales, conferidas por sus grupos fenólicos y un sistema 1, 3-dicetona con dobles enlaces conjugados, que le permiten desempeñar distintas actividades biológicas, tal como efectos antibacterianos, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorios, antitumorales, así como efectos protectores del sistema cardiovascular, del sistema respiratorio y del sistema nervioso central.⁴ Es posible evaluar dichas actividades a través de métodos *in vivo* e *in vitro*. Los métodos *in vitro* presentan ventaja para un primer abordaje de las evaluaciones ya que facilitan la obtención de resultados confiables a menor costo y tiempo acerca de la absorción y actividad de moléculas.⁵ A pesar de sus potenciales beneficios para la salud, la baja biodisponibilidad y estabilidad de la curcumina en el organismo es una limitante de su aplicabilidad. Se han planteado distintas estrategias para superar esta barrera, por ejemplo, la preparación de dispersiones sólidas, obtención de polimorfos o preparación de materiales orgánicos multicomponente. Sin embargo, a pesar de mejorar la solubilidad y estabilidad de la curcumina, estas estrategias no son capaces de protegerla de la degradación causada por enzimas endógenas. Por otro lado, la nanoencapsulación se ha convertido en una de las técnicas más

llamativas por sus ventajas al conferirle estabilidad a las moléculas, mejorar su solubilidad y favorecer su administración en sitios de acción específicos.⁶

A continuación, se abordarán temas de interés asociados con la cúrcuma y su surgimiento en un mercado enfocado en sus beneficios para la salud. Se discutirán sus compuestos principales, así como los métodos de extracción y purificación planteados para la obtención de estos. Se abordarán las bioactividades antioxidante y anticancerígena de su curcuminoide principal, la curcumina, los métodos de evaluación *in vitro* de estas propiedades y los avances en la nanotecnología para mejorar su biodisponibilidad a través de la nanoencapsulación.

1.1 *Curcuma longa* L. como tendencia en el mundo

El género *Zingiberaceae* representa a un grupo de hierbas rizomatosas nativas de regiones tropicales y subtropicales. En dichas especies, el rizoma suele ser la parte más utilizada y se caracterizan por ser fuentes de agentes colorantes y de sabor en la cocina asiática, medicinas tradicionales, especias, tintes, cosméticos y plantas ornamentales.⁷ En dicha familia, la cúrcuma (*Curcuma longa* L.) se ha vuelto un cultivo importante debido al aumento en su demanda en los últimos años.³

La demanda de la cúrcuma ha incrementado a nivel internacional, no solo por su uso como especia y colorante natural sino por su potencial como suplemento nutricional, dados los estudios que muestran los beneficios para la salud que ofrecen sus polifenoles, los curcuminoides.³ Las importaciones de cúrcuma a nivel mundial en el 2019 alcanzaron un valor de 283 millones de dólares, con Estados Unidos, India y Reino Unido como los 3 principales importadores.⁸ Para el 2020, la cúrcuma se encontraba dentro de los suplementos herbales más vendidos en Estados Unidos, con un total de ventas equivalente a los \$96 971 371 y con un aumento del 3.1% con respecto al 2019.⁹ En Costa Rica, el cultivo de cúrcuma ha incrementado como un reflejo de esta tendencia, como se abordará más adelante en la sección correspondiente.

1.1.1 Los tres curcuminoides principales

Los principales compuestos bioactivos en la cúrcuma corresponden a sesquiterpenos y compuestos fenólicos. Los primeros son los constituyentes volátiles de la cúrcuma y son los responsables de su aroma. Al momento, se han reportado al menos 24 sesquiterpenos en esta. Por otro lado, se encuentran los curcuminoides, que corresponden a los compuestos fenólicos característicos de la

cúrcuma. Dichos compuestos poseen un sistema 1,7-diarilheptanoide como esqueleto base y contribuyen al color amarillo de la raíz.¹⁰

La cúrcuma posee gran variedad de curcuminoides, y además se ha obtenido un amplio número de derivados por medio de síntesis¹¹, sin embargo, los tres curcuminoides más representativos son la bis-demetoxicurcumina, demetoxicurcumina y curcumina. Las estructuras químicas de los tres curcuminoides se muestran en la Figura 1. Los tres curcuminoides presentan tautomería ceto-enol. Debido a su naturaleza lipofílica son solubles en solventes orgánicos como metanol, etanol, acetona y dimetil sulfóxido. A pH ácido y neutro, la forma ceto es predominante, mientras que el tautómero enol está presente exclusivamente en condiciones alcalinas, debido a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares. La curcumina ha sido el curcuminoides más estudiado de los tres por su abundancia y sus amplias actividades biológicas.⁴

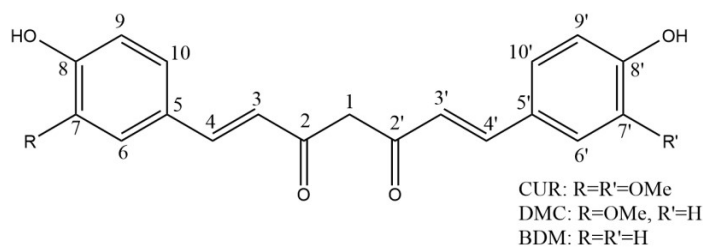


Figura 1. Estructura de los curcuminoides principales presentes en *Curcuma longa L.*

1.1.2 Métodos de extracción en la obtención curcuminoides

A pesar de que los curcuminoides se pueden sintetizar químicamente, las especificaciones del Comité Experto en Aditivos para Comida Conjunto de FAO/WHO permiten el uso únicamente de curcuminoides extraídos de fuentes naturales como aditivos en la alimentación.^{12,13} Por esta razón, es de importancia encontrar métodos que permitan extraer los compuestos de interés de forma óptima.

Se han estudiado distintos métodos de extracción para obtener los curcuminoides utilizando tanto procesos convencionales como extracción sólido líquido o Soxhlet. Sin embargo, la exposición a la luz, altas temperaturas y oxígeno durante estas técnicas inducen la degradación de los curcuminoides, limitando la eficiencia de los procesos y por lo tanto su aplicabilidad.¹⁴ Métodos menos convencionales como extracción con dióxido de carbono super crítico,

microondas y ultrasonido se han probado también, siendo microondas y ultrasonido los que presentaron mayor eficiencia de extracción, menor costo energético y menor gasto de solvente.^{12,15} El método de extracción empleando ultrasonido es uno de los más utilizados y corresponde al método establecido por la Farmacopea Estadounidense (USP) para analizar curcuminoides.¹⁶ Por otro lado, de los métodos más modernos reportados en la literatura se ha encontrado que el más promisorio es la extracción líquida presurizada (PLE).¹⁷

La energía ultrasónica se ha vuelto una alternativa atractiva para llevar a cabo extracciones de productos naturales por su efectividad, bajo costo y naturaleza eco-amigable. Cuando el ultrasonido pasa a través del medio, genera fenómenos físicos como ondas de choque, microturbulencias y microcorrientes que aumentan la transferencia de masa y el área de contacto entre el material crudo y el solvente. La formación de cavidades separa el compuesto deseado de las fuentes intracelulares en un corto periodo de tiempo al mejorar la interfase entre la matriz sólida y el medio de extracción.¹⁸ La extracción por ultrasonido presenta ventajas como la mejora en rendimientos y rapidez de extracción, permite el uso de solventes alternativos, reduce costos y tiempos de extracción y preserva compuestos sensibles al calor.¹⁹

Por otro lado, la PLE es una tecnología utilizada en la extracción de productos naturales, que presenta ventajas sobre los otros métodos con respecto al tiempo de extracción, el consumo de solvente, rendimiento de extracción y reproducibilidad. El método se lleva a cabo utilizando solventes orgánicos a alta presión, modulando la temperatura, con el objetivo de aumentar la eficiencia de extracción del proceso. El aumento en la temperatura acelera la cinética de la extracción y la alta presión mantiene el solvente en estado líquido, facilitando extracciones rápidas y seguras. Adicionalmente, al elevar la presión el solvente se ve forzado sobre los poros de la matriz, facilitando la extracción de analitos, mientras que elevar la temperatura disminuye la viscosidad del solvente, permitiendo una mejor incorporación del solvente en la matriz, además de un aumento en la difusividad del solvente, resultando en un aumento en la rapidez de extracción. El principal reto la PLE es el costo del equipo que limita su accesibilidad.²⁰ El uso de PLE para extraer curcuminoides ha dado resultados positivos, bajo las condiciones de extracción probadas, indicando ser un método adecuado para su extracción.^{14,17}

1.1.3 Purificación de curcuminoides

El interés en la purificación de curcuminoides también ha incrementado debido al potencial beneficio y aplicabilidad que se deriva de estudiarlos individualmente. La curcumina cruda disponible en el mercado contiene un 17% de demetoxicurcumina y un 3% de bis-demetoxicurcumina. Las similitudes en su estructura hacen que la separación y purificación sea desafiante. La separación de curcuminoides ha sido estudiada por métodos cromatográficos, utilizando silica gel como fase estacionaria y distintos sistemas de solventes para eluir. Las mejores separaciones cromatográficas se han alcanzado utilizando cloroformo y metanol como eluyentes.²¹⁻²³

Sin embargo, desde un punto de vista de producción, los procesos de cristalización son preferidos por lo que estos métodos también se han explorado. Se han probado solventes como etanol e isopropanol bajo procesos de enfriamiento controlados, obteniendo mejoras significativas en la pureza.²²⁻²⁴

1.2 Actividades biológicas de la curcumina

La demanda de la cúrcuma ha aumentado, como se ha mencionado, debido a la evidencia que se ha encontrado con respecto a un amplio rango de actividades biológicas. Dichas actividades se han atribuido a los curcuminoides curcumina, demetoxicurcumina y bis-demetoxicurcumina, y, entre ellos, principalmente a la curcumina que ha sido la más estudiada de los tres. Dentro de estas actividades se encuentran la antioxidante, antimicrobiana, tanto antiviral como antibacteriana, antiinflamatoria, anticancerígena, antihipertensiva y anticoagulante.^{3,25-27}

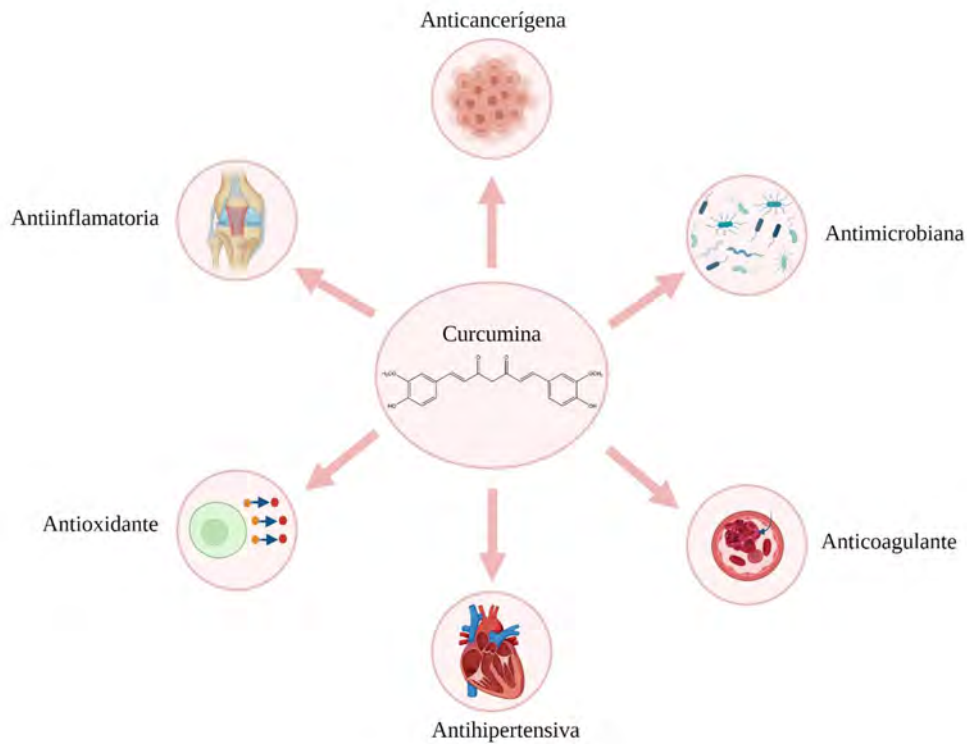


Figura 2. Actividades biológicas de la curcumina. (Creada con BioRender)

Se ha evidenciado que es la capacidad de la curcumina para interactuar con múltiples moléculas señalizadoras, lo que le permite llevar a cabo tantas actividades beneficiosas para la salud. Esta molécula presenta tres sitios reactivos principales, los dos grupos fenólicos que actúan como donadores de hidrógeno, las dos posiciones 4 y 4' en el esqueleto 1,7-diarilheptanoide que actúan como aceptores de Michael y un grupo 1,3-dicetona que actúa como sitio activo quelante para metales (Figura 3).

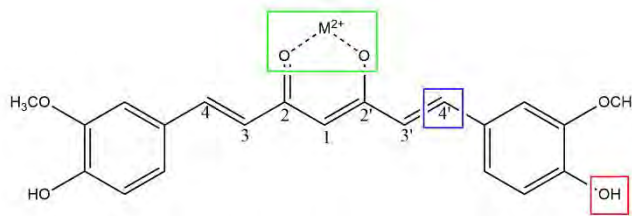


Figura 3. Sitios reactivos de la curcumina.

En efecto, en estudios de actividades biológicas, se ha encontrado que parte de la versatilidad de la curcumina se encuentra asociada a su capacidad de actuar como un aceptor de Michael en

reacciones de adición nucleofílica, lo que le permite reaccionar con grupos tiol (-SH) del glutatión y con grupos tiol y selenol (-SeH) en enzimas y proteínas, importantes en la regulación de actividades antioxidantes, respuestas del sistema inmune y desintoxicación de carcinógenos.^{4,28} En enfermedades como Alzheimer, cáncer, depresión y artritis, se ha encontrado que es un agente terapéutico promisorio por su capacidad de formar complejos con varios metales, por ejemplo, con Al^{3+} , el cual se encuentra asociado al Alzheimer. Su capacidad de formar complejos con metales como cobre, cromo, arsénico, mercurio, plomo y cadmio, le permite también reducir la toxicidad de metales pesados.⁴

Asimismo, los efectos antiinflamatorios de la curcumina se han evidenciado en estudios de enfermedades como artritis, pancreatitis, alergias e infecciones bacterianas, de hongos y nemátodos, a través de distintos mecanismos de acción. Un ejemplo es la regulación de la respuesta antiinflamatoria ligada a productos de la cascada del ácido araquidónico, relacionados con la fiebre y el dolor.⁶

Por otro lado, se ha reportado que la naturaleza antioxidante de la curcumina, asociada a su capacidad de eliminación de radicales libres a través de sus sitios reactivos, le permite actuar en la prevención de enfermedades metabólicas y cardiovasculares,^{4,6} vinculadas al estrés oxidativo. Este es causado por radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que alteran el funcionamiento y la estructura de lípidos y proteínas celulares, afectando los procesos energéticos, de transporte y señalización celular en el metabolismo, generando consecuentemente un desbalance en el sistema inmunológico y procesos antiinflamatorios.⁶ Finalmente, la actividad anticancerígena de la curcumina también se ha estudiado ampliamente debido a la alta mortalidad de dicha enfermedad y su incidencia en gran cantidad de tejidos en el organismo, habiéndose reportado que la curcumina presenta actividad anticancerígena en células de distintos tipos de cáncer como colon, piel, cérvix, páncreas, próstata, y mama, entre otros.²⁹

Dada la importancia de los procesos biológicos anteriormente mencionados, la vinculación entre ellos y el potencial efecto beneficioso de la curcumina en los mismos, las siguientes secciones se expanden en cuanto a la actividad anticancerígena y antioxidante de la curcumina, así como los métodos de estudio utilizados para la evaluación de estas actividades.

1.2.1 Actividad anticancerígena de la curcumina

La curcumina modula una serie de blancos biológicos, como factores de transcripción, factores de crecimiento, mediadores inflamatorios, proteínas de ciclo celular, enzimas o proteínas apoptóticas, y vías celulares.⁴ Esta es capaz de prevenir carcinogénesis por medio de la afectación de dos procesos: la angiogénesis y el crecimiento de células cancerosas, además de reprimir la metástasis e inducir apoptosis en células cancerosas. La curcumina es capaz de llevar a cabo estas funciones mediante la regulación de distintas vías de señalización, incluyendo la supervivencia celular, supresión tumoral, por medio de enzimas como las caspasas o quinasas proteicas.^{4,30}

Las células cancerígenas pueden producir nuevos vasos sanguíneos por medio de la estimulación de factores angiogénicos. La curcumina ha mostrado tener actividad antiangiogénica por medio de la inhibición de estimuladores de factores angiogénicos como el VEGF, por medio de la regulación del factor nuclear kappa B (NF- κ B). NF- κ B corresponde a una familia de cinco factores de transcripción que son responsables por la supervivencia de la célula, producción de citoquinas, entre otras funciones celulares.³¹ Varios estudios reportan el efecto inhibitorio de la curcumina sobre la vía de activación del NF- κ B en líneas celulares de pulmón.^{4,30,32}

La curcumina también puede inducir apoptosis en células cancerosas por medio de la proteína p53. P53 es una de las células represoras de tumor más importantes, ya que afecta la proliferación celular, la apoptosis y daño de ADN. Estudios han demostrado que la curcumina induce apoptosis en células cancerosas de pulmón, de colon y varias líneas celulares de cáncer de mama por medio de dicha proteína.^{30,33}

Por medio de distintos mecanismos, como los descritos, es que la curcumina ha evidenciado su actividad contra células de distintos tipos de cáncer, como cáncer de cervix,³⁴ próstata, páncreas²⁹ y leucemia, además de los mencionados anteriormente.^{35,36}

1.2.2 Actividad antioxidante de la curcumina

La curcumina presenta actividad antioxidante importante a través de distintos mecanismos. Esta actividad se les atribuye a dos propiedades estructurales de la molécula. Debido a la presencia de los grupos fenólicos en su estructura química, la curcumina muestra una fuerte actividad antioxidante por medio de la donación de protones, como se muestra en la figura 4a.³⁷ Además, el sistema 1,3-dicetona contribuye a la actividad antioxidante por la naturaleza ácida del protón α , como se muestra en la figura 4b. El sistema conjugado deslocaliza la carga, estabilizando el radical resultante. Se ha comprobado que la presencia de grupos metoxilo también juega un papel importante en la actividad antioxidante de la curcumina, lo que la diferencia de los demás curcuminoides principales.³⁸⁻⁴⁰

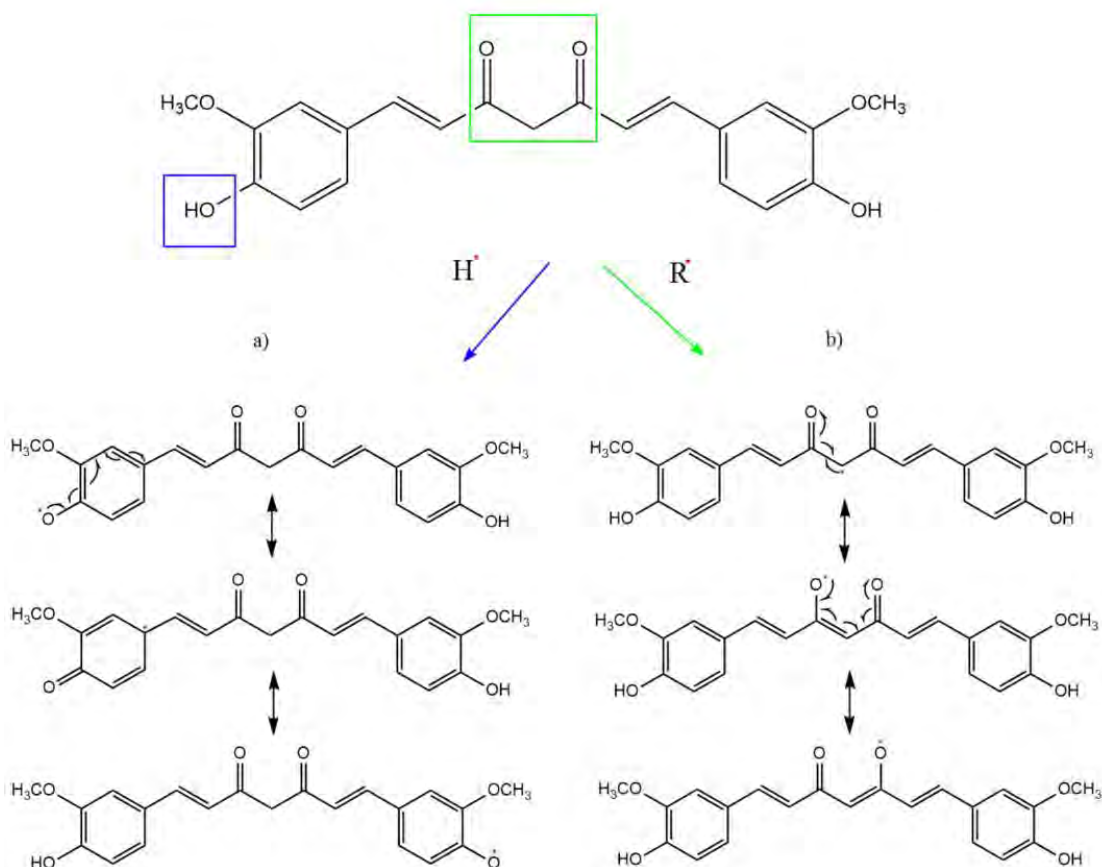


Figura 4. Mecanismos de actividad antioxidante de la curcumina.⁴¹

Cabe remarcar que la curcumina es capaz de eliminar distintos tipos de radicales libres como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las cuales juegan un papel importante en la oxidación

de lípidos celulares. Se ha encontrado también que estimula la actividad de otras enzimas antioxidantes como la glutatión-peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa. Otros estudios han demostrado que la curcumina puede inhibir enzimas que generan especies reactivas de oxígeno, como la lipooxigenasa/ciclooxigenasa y la xantina oxidasa.⁴⁰

1.2.3 Estudios de evaluación *in vitro*

En lo que respecta a las evaluaciones de la actividad antioxidante y anticancerígena de la curcumina, que permitan determinar la seguridad y la eficacia de esta, estas se pueden llevar a cabo por medio de métodos *in vivo* o *in vitro*. Los estudios *in vivo* corresponden a aquellos en los que se lleva a cabo el análisis y la caracterización de las moléculas y sistemas biológicos en organismos intactos, como animales y humanos, mientras que los estudios *in vitro* implican la manipulación de órganos, tejidos, células y biomoléculas bajo condiciones de laboratorio controladas.⁵ Los estudios *in vivo* son muy costosos, difíciles de controlar y a menudo presentan baja correlación con humanos cuando estos se realizan en animales. Por otro lado, los estudios *in vitro* permiten evaluar la absorción y acción de moléculas a través de técnicas más rápidas, menos costosas y más adecuadas gracias a la heterogeneidad del medio, por lo que son los de elección en un primer abordaje de la valoración de bioactividades.^{5,42} Las siguientes secciones se refieren a los métodos de estudio *in vitro* de actividad anticancerígena y antioxidante.

1.2.3.1 Métodos de estudio de actividad anticancerígena

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazilbromuro (MTT) y la sal de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) son considerados dos de los métodos más confiables y convenientes para evaluar actividad anticancerígena de forma preliminar. Ambos métodos son exactos, específicos, sensibles y presentan una rápida indicación de toxicidad.⁴³ Ambos son ensayos *in vitro* que emplean técnicas colorimétricas para determinar el porcentaje de células viables por medio de la determinación de actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial, y difieren únicamente en el reactivo utilizado.⁴³

En el ensayo MTT, el reactivo es bio-reducido por la deshidrogenasa dentro de las células vivas para formar cristales de formazán. Este ensayo requiere la adición de agentes que faciliten la disolución del producto insoluble formado. En el caso del ensayo MTS, que funciona de una

manera similar, no es necesario debido a que se genera un producto soluble en agua. El porcentaje de células viables se mide por medio de colorimetría, la cantidad de producto coloreado es directamente proporcional al porcentaje de células vivas en cultivo, ya que los reactivos solo pueden ser reducidos metabólicamente por células activas.⁴³ El ensayo MTT se ha utilizado ampliamente en la evaluación de actividad anticancerígena de la curcumina.^{3,32,44}

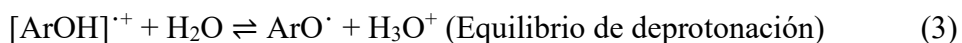
1.2.3.2 Métodos de estudio de actividad antioxidante

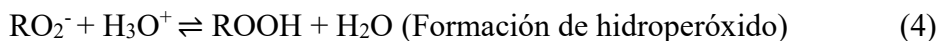
Existen distintos métodos para llevar a cabo el estudio de actividad antioxidante de un compuesto o mezcla en estudio. Los más comunes son la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC) y poder antioxidante reductor de hierro (FRAP). La diferencia entre ellos radica en el mecanismo de reacción bajo el cual se evalúa la actividad antioxidante. Existen dos tipos de mecanismos de reacción principales, el de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) y el de transferencia de electrones (ET). Existe un tercer grupo en el que el mecanismo de reacción es una mezcla de HAT y ET.

El mecanismo de reacción HAT se lleva a cabo como se muestra en la reacción (1). Un componente antioxidante en este caso fenólico [ArOH] dona un átomo de hidrogeno H a un radical libre inestable y se forma un radical libre más estable. La estabilidad del radical formado hace poco probable que se desencadenen más reacciones radicalarias después de esta. Un método que sigue este mecanismo de reacción es el ORAC.



En el caso del mecanismo de reacción de ET, suceden las tres reacciones que se muestran a continuación (2-4). A pesar de que el resultado de este mecanismo es el mismo que en HAT, los procesos se dan por medio de transferencias de electrones individuales. La diferencia está en que, al tener más pasos, en el método de ET se pueden desencadenar más reacciones radicalarias, sin embargo, estos métodos suelen ser más rápidos y fáciles de aplicar. Un método que sigue este mecanismo de reacción es el TEAC.





En el caso de los mecanismos mixtos, ambos mecanismos pueden estar sucediendo simultáneamente. Sin embargo, el mecanismo de HAT suele ser más rápido que el de SET, por lo que se asume que el mecanismo predominante es el HAT. Un método que puede seguir un mecanismo de reacción mixto es el DPPH.⁴⁵ En el caso del estudio de la curcumina, en la literatura se ha aplicado comúnmente este último método.^{26,46}

1.2.4 La barrera de la biodisponibilidad

A pesar de sus promisorias actividades biológicas, la curcumina presenta un reto importante, su biodisponibilidad. Estudios farmacocinéticos y de biodisponibilidad han indicado que esta presenta una baja absorción intestinal y una rápida eliminación del cuerpo después de una administración oral.^{47,48} En una primera investigación en ratas se encontró que un 75% fue excretado en las heces, y una baja cantidad fue encontrada en la orina. Un estudio posterior también en ratas reportó que solo el 60% fue absorbido después de la administración oral de curcumina. En un estudio en humanos,⁴⁹ se encontró que solo 11 nmol/L de curcumina podían ser detectados en plasma sanguíneo recolectado una hora después de que 0.002 mol/L de curcumina fueran administrados oralmente.

La curcumina presenta resistencia a la degradación en condiciones ácidas, por lo que debería de mantenerse estable en el estómago. Sin embargo, por su tendencia a degradarse en condiciones básicas o neutras, esta se degrada rápidamente en el intestino delgado y colon. Un estudio por medio de trazado radioactivo con curcumina marcada con ³H confirmó que la curcumina se transforma durante su absorción intestinal.^{50,51} Otra limitación de la curcumina que dificulta su aplicabilidad es su baja estabilidad en condiciones fisiológicas. A 37°C y pH 7.2, el $t_{1/2}$ de la curcumina se reporta como menos de 10 min.⁴ Sin embargo, después de su absorción, esta entra en el torrente sanguíneo y se distribuye rápidamente a través del cuerpo, por lo que se ha localizado a niveles detectables en muchos tejidos, como el hígado, colon, cerebro, corazón, pulmón y bazo, como se muestra en la Figura 5.⁵²

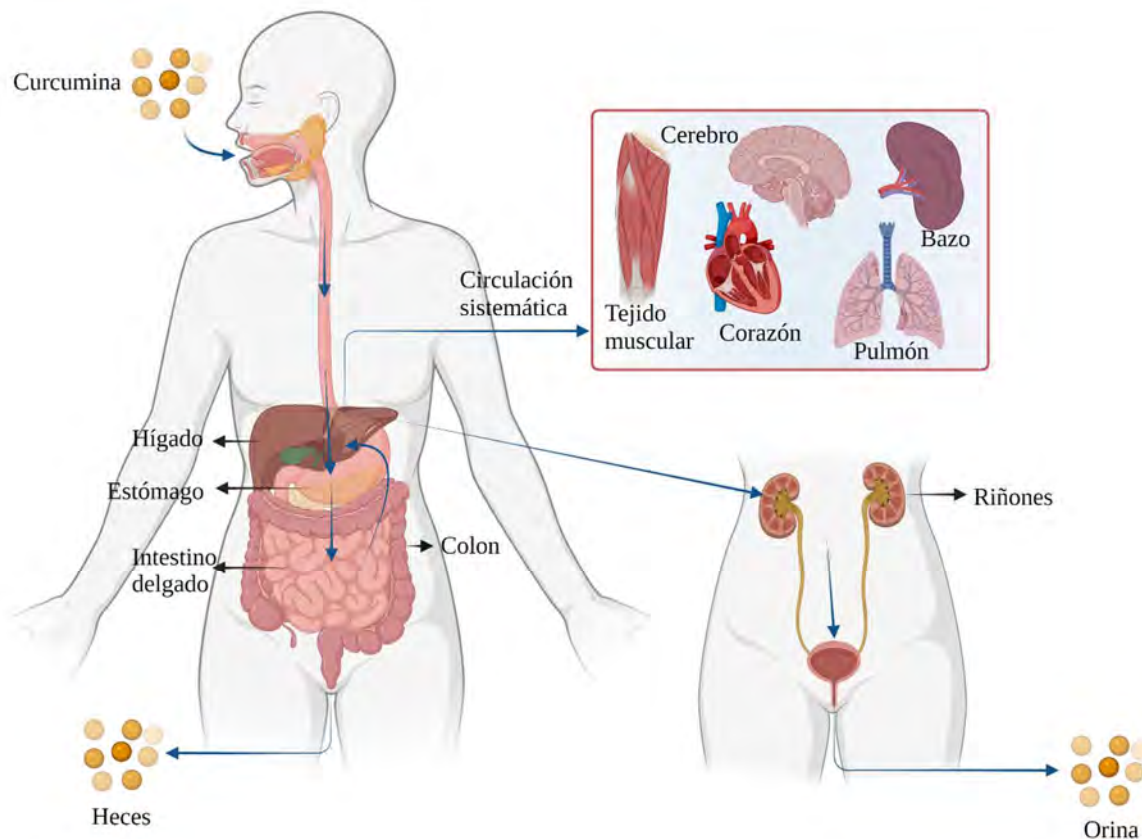


Figura 5. Metabolismo de la curcumina después de la administración oral. (Creada con BioRender utilizando la imagen de Zheng et al. como referencia⁵²)

Debido al gran potencial de aplicación de la curcumina en el tratamiento y prevención de distintos padecimientos, se han planteado distintas estrategias para mejorar su biodisponibilidad. Entre estas estrategias se han probado dispersiones sólidas, obtención de polimorfos o preparación de materiales orgánicos multicomponente. Sin embargo, a pesar de mejorar la solubilidad y estabilidad de la curcumina, estas estrategias no son capaces de protegerla de la degradación causada por enzimas endógenas, por lo que las técnicas más promisorias son basadas en nanotecnología, que han demostrado mejorar las actividades biológicas de la curcumina.^{6,51}

1.3 Estrategias basadas en la nanotecnología para mejorar la biodisponibilidad

Los avances en la nanotecnología han demostrado que las nanopartículas tienen gran potencial como portadoras de fármacos con baja solubilidad, no solo porque mejoran la biodisponibilidad de estos, sino también porque permiten llegar a sitios de acción específicos con una liberación

controlada.⁶ Los distintos métodos y tecnologías existentes y emergentes permiten la obtención de nanoestructuras con características biológicas y fisicoquímicas únicas. La reducción de tamaño a nano-escala presenta ventajas como mejora en la solubilidad, biodisponibilidad oral, rapidez de disolución, así como una reducción en la dosis requerida, una acción terapéutica más rápida, reducción de toxicidad y mejora en la liberación.⁵³ Adicionalmente, se ha encontrado que la nanoencapsulación de polifenoles con baja solubilidad puede potenciar su actividad anticancerígena.^{54,55} A continuación, se abordarán los tipos de nanopartículas y su aplicación con curcumina hasta el momento, como método para mejorar su biodisponibilidad.

A pesar de las ventajas, las nanopartículas pueden presentar limitaciones. Su tamaño reducido y gran área superficial puede llevar a la formación de agregados de partículas, producto de interacciones entre las mismas, lo que vuelve difícil su manipulación en formas líquidas o sólidas. Las nanopartículas además presentan una vida útil de circulación corta en el cuerpo seguido de administración intravenosa producto de la acción de las células fagocíticas. Sin embargo, aún con estas limitaciones, las nanopartículas presentan una alternativa adecuada de entrega de medicamentos de baja masa molecular y macromoléculas como proteínas, péptidos o genes en el cuerpo utilizando distintas vías de administración. Los avances en la nanotecnología y ciencia de materiales han ofrecido nuevas maneras de superar las barreras de aplicación antes descritas.⁵⁶ Esto ha derivado en el desarrollo muchos tipos de nanomateriales, sin embargo, no existe un acuerdo en la comunidad científica para su clasificación, algunos autores las clasifican dependiendo de sus características, funcionalidad o aplicación.⁵⁷ La Figura 6 presenta una clasificación en función de la naturaleza química de los nanomateriales.

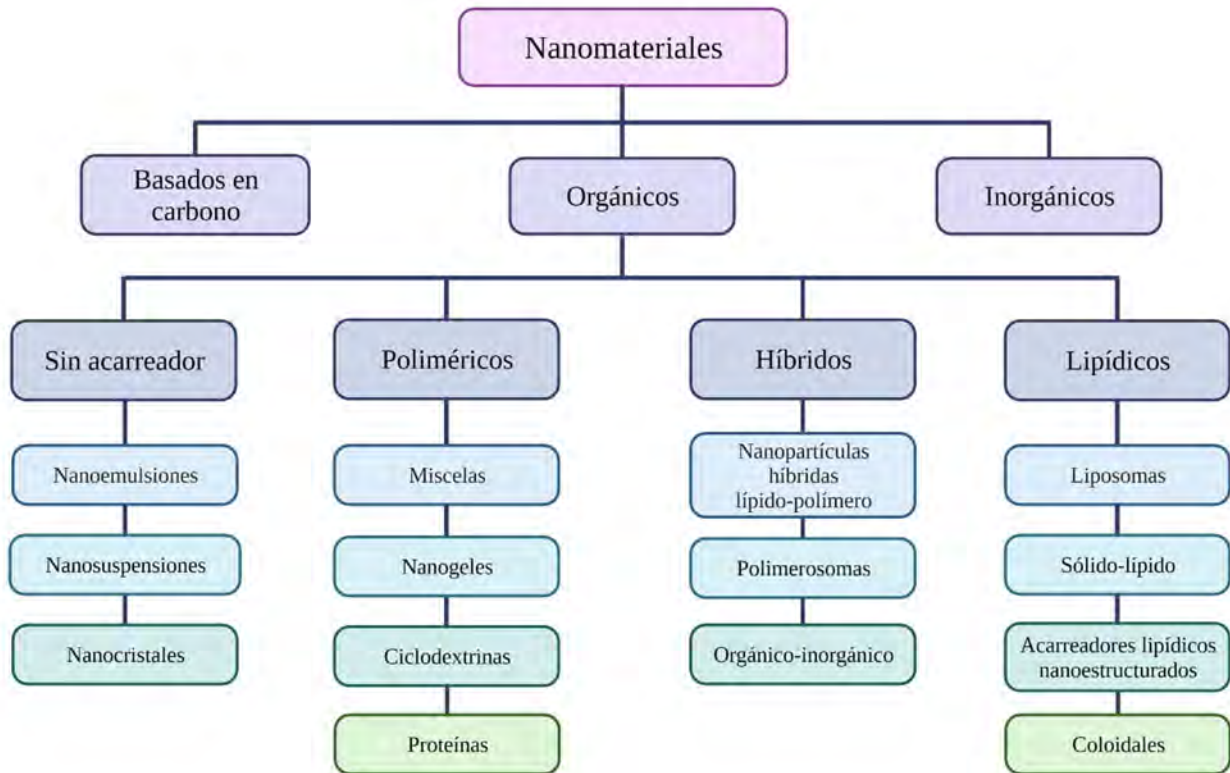


Figura 6. Esquema de clasificación de nanomateriales. (Creada con BioRender utilizando la imagen de Wilhelm-Romero et al. como referencia⁵⁸)

1.3.1 Tipos de nanopartículas utilizadas en la mejora de la biodisponibilidad de fármacos

Las nanopartículas se definen como dispersiones de partículas o partículas sólidas con tamaño en un rango de 10-1000 nm. Estas se pueden preparar bajo dos principios metodológicos, el primero corresponde al método de desintegración, en el cuales se busca la reducción del tamaño de partículas, por ejemplo, utilizando homogenización a alta presión o molienda de alta energía. El segundo corresponde a la nucleación de partículas desde el estado molecular, por ejemplo, el método hidrosol o cristalización controlada durante la liofilización.^{56,59}

La Figura 7 muestra la representación esquemática de algunos tipos de nanopartículas utilizadas en la mejora de la biodisponibilidad de fármacos.

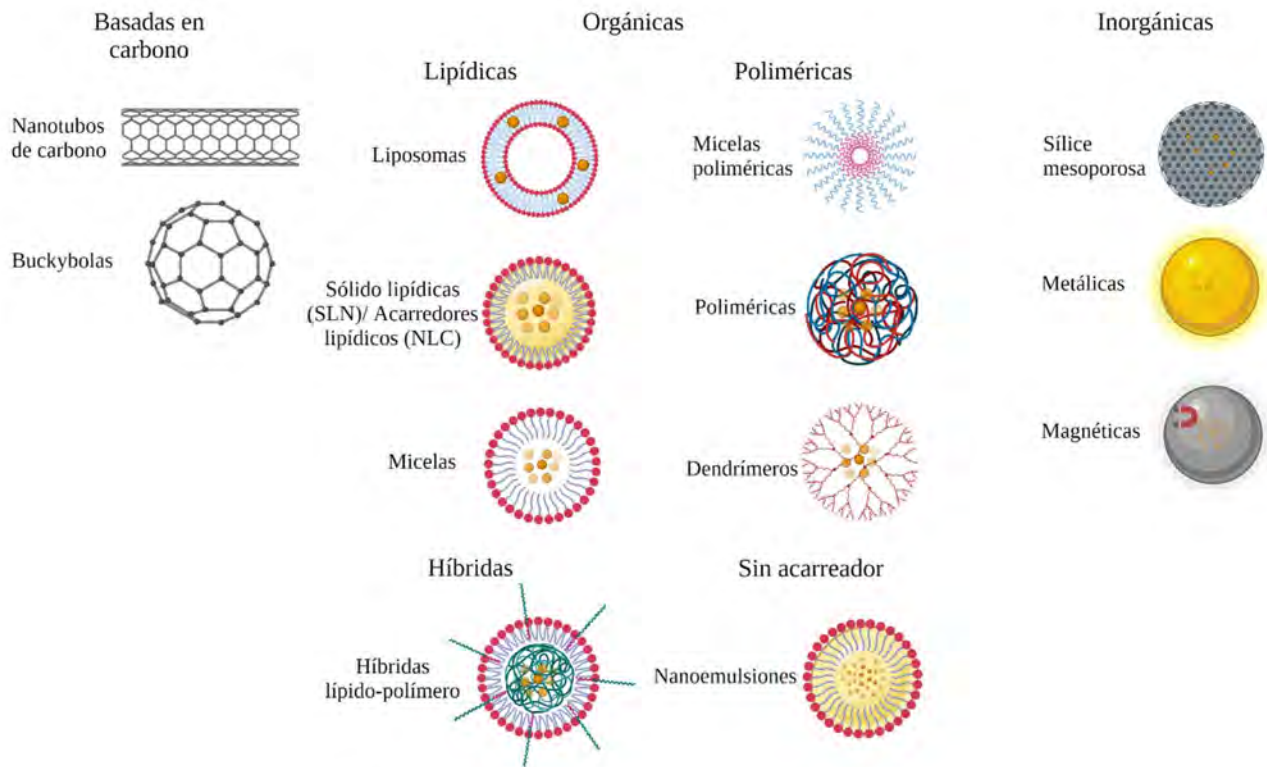


Figura 7. Tipos de nanopartículas utilizadas en la mejora de biodisponibilidad de fármacos.
(Creada con BioRender)

Las nanopartículas poliméricas son partículas poliméricas coloidales en las cuales el agente terapéutico de interés se encapsula dentro de la matriz polimérica o se puede adsorber en la superficie. Estas nanopartículas han mostrado mejorar la biodisponibilidad y mejorar la solubilidad de fármacos producto de la reducción en el tamaño de partículas y la nanoencapsulación de este en un polímero soluble en agua. Las primeras nanopartículas de este tipo se formularon con polialquiloacrilato. Actualmente se prueban polímeros biodegradables como quitosano, alginato o ácido poliláctico, o polímeros no biodegradables como polimetacrilato o polimetilmetacrilato.⁵⁶

El uso de nanopartículas poliméricas presenta limitantes como toxicidad de los polímeros, presencia de residuos de solvente, alto costo, degradabilidad, requerimiento del uso de polímero de alta calidad, y pureza en el caso de polímeros biodegradables. Las nanopartículas lipídicas son partículas esféricas compuestas de lípidos con un centro lipídico. Pueden sintetizarse combinando una fase lipídica con fosfolípidos como emulsificantes, utilizando técnicas como homogenización

a alta presión.⁶⁰ Existen varios tipos de nanopartículas lipídicas, las más usadas son las nanopartículas sólido-lipídicas (SLN) y acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC).^{56,61} Las SLN son sistemas coloidales con una proporción de agua entre 70-95%, elaborados principalmente a partir de lípidos fisiológicos sólidos que tienden a gelificar y a expulsar el fármaco durante el almacenamiento, presentan una capacidad de carga limitada, son biodegradables y tienen buena tolerancia. Las propiedades y estabilidad de las SLN se han mejorado mediante la adición de lípidos líquidos en los que el fármaco suele ser más soluble, dando origen a los NLC. Las SLN y los NLC poseen la integridad física de las partículas sólidas de forma definida, preservan la estabilidad química y física de sus ingredientes y son más efectivas para la liberación controlada.^{59,61,62}

Las nanopartículas híbridas lípido-polímero (LPN) combinan las ventajas de los dos tipos de nanopartículas descritas anteriormente. Presentan un buen desempeño en la entrega de fármacos, alto porcentaje de encapsulación, buen perfil de liberación, estabilidad y capacidad de atacar células o tejidos de forma específica. Las LPN se componen de tres partes: un centro polimérico utilizado para encapsular el fármaco insoluble en agua, un caparazón polimérico hidrofílico que le confiere estabilidad y una cobertura lipídica en la interfase del centro y el caparazón polimérico que actúa como un muro molecular para promover la retención del fármaco dentro de la nanopartícula. El centro polimérico y la capa lipídica se asocian por medio de fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas y otras fuerzas no covalentes.⁵⁶

1.3.2 Avances en la nanoencapsulación de la curcumina para mejorar su biodisponibilidad

La nanoencapsulación de la curcumina se ha estudiado desde distintas metodologías, donde se ha comprobado su capacidad de mejorar las actividades biológicas de la misma.^{6,63,64} Las nanopartículas poliméricas de curcumina han demostrado mejorar su solubilidad, estabilidad y liberación.⁶⁵ La nanoencapsulación utilizando PLGA (ácido poli láctico-co-glicólico) como polímero permitió la obtención de partículas con mejores propiedades fisicoquímicas que las de la curcumina libre, así como una mejora en su estabilidad.^{44,66} Se han preparado también nanopartículas con polisacáridos como quitosano y goma arábiga, utilizando agentes emulsificantes como EYPC y Tween 80. Se encontró que las nanopartículas preparadas eran capaces de encapsular, estabilizar y liberar la curcumina de forma efectiva.^{67,68} Estas mejoras en

las propiedades inherentes a la biodisponibilidad de la curcumina se han reflejado en un aumento de las actividades biológicas de la misma como citotoxicidad y actividad antioxidante.^{65,67,69}

Por su parte, también se han preparado nanopartículas lipídicas con curcumina, las cuales han presentado resultados positivos. Se han preparado tanto NLC como SLN utilizando distintas formulaciones con eficiencias de encapsulación de más de 90%, utilizando lípidos como ceramida y ácido palmítico o palmitato de cetilo,^{70,71} donde la mejora en la solubilidad y estabilidad de la curcumina se ha evidenciado.^{70,72,73} Los aumentos en la solubilidad de la curcumina por medio de la preparación de nanopartículas lipídicas se han visto reflejados en el aumento de actividad anticancerígena de la curcumina. Se ha reportado un aumento de la citotoxicidad en células de cáncer cerebral tanto utilizando SLN⁷¹ como NLC, donde el porcentaje de inhibición del tumor *in vivo* mejoró de un 19.5% a un 82.3%.⁷⁴ Las SLN han mostrado también una mejora en la actividad citotóxica de la curcumina en cáncer de pulmón y de mama.^{75,76}

A pesar de que los resultados obtenidos hasta el momento en la nanoencapsulación de la curcumina son alentadores, sigue habiendo barreras en su aplicabilidad. A pesar de que los métodos funcionan a escala de laboratorio, suelen presentar problemas a la hora de escalar la producción, por lo que sigue siendo necesario plantear métodos de nanoencapsulación que puedan aplicarse a un nivel de producción industrial.⁷⁷

1.4 Situación en Costa Rica

El aumento en la demanda de cúrcuma nivel mundial se ha visto reflejado en su producción nacional. En Costa Rica, la cúrcuma se cultiva principalmente en las regiones Huetar Norte y Brunca, como se muestra en la Figura 7. En el período del 2014 al 2018, la exportación de cúrcuma costarricense tuvo un aumento considerable cuando se pasó de exportar \$168.7 mil a \$444.7 mil, con destino a Holanda (93.4%), El Salvador (6.4%), Alemania (6%) y Estados Unidos (5.2%).⁸ Sin embargo, las exportaciones experimentaron una reducción en el 2019, entre otras razones, por los requisitos de calidad del producto en los mercados internacionales.

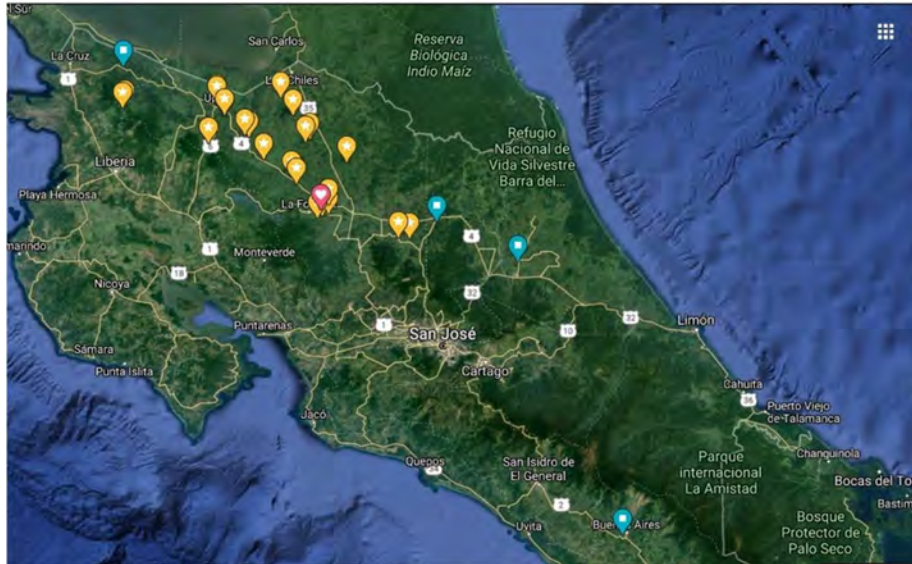


Figura 7. Zonas de cultivo de cúrcuma en Costa Rica. (Imagen obtenida de documento de PROCOMER preparado por Ulloa con base en información proporcionada por BIODISS⁸)

Según datos del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés), el incremento anual en el número de productos registrados como de cúrcuma como suplementos nutricionales, creció a más de 5,500 productos en el 2020, con un crecimiento anual promedio de 21% en los últimos 5 años.⁷⁸ El emergente interés en la cúrcuma por las actividades biológicas de sus metabolitos, en cuanto a su potencial como suplemento nutricional, principalmente de la curcumina, vuelve su producción una oportunidad económica importante para Costa Rica, principalmente para las regiones en las que se produce.

La consolidación de productos con cúrcuma, o extractos de esta, en mercados como el de suplementos orgánicos alimenticios, saborizantes y colorantes de alimentos o cosméticos,⁸ permite que la producción de cúrcuma en Costa Rica sea una oportunidad de desarrollo.

1.5 Objetivos del proyecto

Objetivo principal

Estudiar los polifenoles de cúrcuma cultivada en Costa Rica a través de su caracterización, aislamiento y la síntesis de nanopartículas para la evaluación de las bioactividades antioxidante y anticancerígena.

Objetivos específicos

1. Caracterizar los polifenoles presentes en rizomas de *Curcuma longa* L. cultivada en Costa Rica, por medio de su identificación, cuantificación y la evaluación de su potencial antioxidante.
2. Purificar los extractos polifenólicos obtenidos, para el aislamiento de los curcuminoides y la nanoencapsulación de la curcumina.
3. Evaluar la actividad antioxidante y la citotoxicidad sobre líneas celulares cancerígenas tanto de la curcumina libre como nanoencapsulada.

2. Metodología

2.1 Materiales

2.1.1 Estándares, reactivos y solventes

El patrón de curcumina y reactivos como molibdato de sodio, tungstato de sodio, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y ácido gálico se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Para las nanopartículas, el Pluronic® F-127 (PLU), colesterol (CHO), ácido fosfórico (H₃PO₄) y fosfato de hidrógeno disódico fueron comprados a Sigma-Aldrich. El fosfato de dihidrógeno sódico monohidrato fue adquirido de Merck, Polysorbato 80 (Tween 80) fue comprado a Sonntag & Rote S.A., y el monooleato de sorbitano (Span® 80) fue suministrado por LABQUIMAR S.A. Los solventes de grado ACS o HPLC, como Cloroformo (CHCl₃), metanol (MeOH), acetonitrilo (MeCN) y acetona, se adquirieron de JTBaker (Center Valley, PA, EE. UU.). Todos los disolventes utilizados eran de grado HPLC o altamente puros, y el agua se purificó utilizando un sistema Millipore filtrado a través de una membrana Millipore de 0,22 µm Millipak 40.

2.1.2 Rizomas de *Curcuma longa*

Los rizomas de *Curcuma longa* fueron adquiridos frescos de doce productores de cuatro regiones distintas de Costa Rica, cuatro de la región Norte (RN-1, RN-2, RN-3, RN-4), cuatro de la región Noreste (NE-1, NE-2, NE-3, NE-4), tres de la región Noroeste (NO-1, NO-2, NO-3) y uno de la región Oeste (RO-1). Dichas muestras frescas comercializadas por los productores fueron almacenadas a 4 °C.

2.2 Secado de la muestra

Se llevó a cabo el secado de cada una de las muestras como parte de su procesamiento. Para esto, se tomó la cúrcuma congelada y se cortó en rebanadas finas. Se colocaron las rebanadas en bandejas de vidrio y se secaron a 60 °C durante 24 h. Una vez secas, se pulverizaron y se almacenaron como cúrcuma seca en polvo a 4 °C.

2.3 Extracción de la muestra

2.3.1 Extracción mediante el método de la Farmacopea Estadounidense (USP)

En primera instancia, se utilizó una adaptación del método establecido por la Farmacopea de Estados Unidos (USP) para llevar a cabo la extracción de curcuminoides en las muestras de cúrcuma en polvo. Se pesaron 0.5 g de muestra de cúrcuma en polvo con exactitud en una balanza analítica y se transfirieron a un balón aforado de 50.00 mL. Se agregaron 30 mL de acetona y se colocó la muestra en un baño ultrasónico por 30 minutos. Una vez concluido el tiempo, se aforó el balón con acetona y se centrifugó.¹⁶

2.3.2 Extracción por medio de un equipo de Extracción Líquida Presurizada (PLE)

Se utilizó un método preliminar de partida para comprobar que el equipo de Extracción Líquida Presurizada (PLE) era un método adecuado para llevar a cabo la extracción de curcuminoides de muestras de cúrcuma en polvo. En dicho método de partida se pesaron 0.5 g con exactitud, y se colocaron en una celda de extracción de 10 mL. Se utilizó acetona como solvente de extracción y se establecieron las condiciones que se muestran en el Cuadro I como las condiciones de extracción del equipo. Una vez concluido el tiempo de extracción en el equipo, se pasó el extracto a un balón aforado de 50.00 mL y se aforó con acetona.

Se hizo además una prueba preliminar para evaluar la cantidad de ciclos adecuada para el proceso de extracción. En dicha prueba, se evaluó el efecto de agregar un ciclo de extracción, con el fin de verificar que no se estaba perdiendo analito por una deficiencia del método. Los resultados de dicha prueba indicaron que, en un cuarto ciclo de extracción, la cantidad de extracto obtenida no era significativa.

Cuadro I. Condiciones del método de extracción preliminar en el PLE.

Solvente	Acetona
Temperatura (°C)	60
Ciclos	3
Tiempo estático (min)	6
Volumen de lavado (%)	60

Una vez realizadas las pruebas descritas anteriormente, se preparó un diseño factorial para encontrar las condiciones óptimas de extracción en el equipo.

2.3.2.1 Diseño factorial preparado para la optimización del método de extracción por PLE

Se propuso un diseño factorial con las condiciones que se muestran en el Cuadro II, con el fin de optimizar el método de extracción por PLE. Para proponer este diseño factorial se hicieron pruebas preliminares a partir del método presentado previamente, probando con variaciones en la temperatura y el tiempo.

Se seleccionó el metanol como alternativa a la acetona, al ser un solvente de alta polaridad con el fin de comprobar si era un disolvente adecuado para una mejor extracción de curcuminoides. Se estudió también el efecto de la temperatura y el tiempo estático, con el fin de determinar las condiciones necesarias para extraer la mayor cantidad de curcuminoides en el menor tiempo posible. La cantidad de ciclos se mantuvo constante (3 ciclos), al igual que el volumen de lavado (60%).

Cuadro II. Condiciones de extracción evaluadas en el diseño factorial, para optimizar el proceso de extracción de curcuminoides en muestras de cúrcuma en polvo.

Factor por evaluar	Variables	
Disolvente	Acetona	Metanol
Temperatura (°C)	60	80
Tiempo estático (min)	6	10

2.4 Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios

2.4.1 Preparación de las disoluciones para análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y espectroscopía de masas (MS)

Se trabajó con el procedimiento establecido por la USP para la preparación de muestras para inyección.¹⁶ Las disoluciones se prepararon tomando una alícuota de 500 µL del extracto previamente aforado en un balón de 50.00 mL, y llevándola a un volumen de 10.00 mL en un balón aforado, utilizando la fase móvil del análisis como solvente. Una vez aforado el balón, se filtró la disolución utilizando filtros SUPELCO Iso-Disc™ PVDF-13-4 13mm x 0.45µm y se procedió a inyectar en el equipo.

2.4.2 Método de análisis para HPLC-DAD-MS

Para llevar a cabo los análisis cromatográficos se utilizaron dos equipos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), el primero un HPLC modelo Agilent 1260 con un detector DAD y otro UHPLC modelo U3000 marca Thermo Scientific con un detector DAD. La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna marca Phenomenex Luna C18(2) con tamaño de partícula de 5 μm , con un tamaño de poro de 100 Å y con dimensiones de 250 mm de largo y 4.6 mm de diámetro.

El Cuadro III muestra la transición de las condiciones empleadas en el primer método (A) hasta las condiciones empleadas en el método final optimizado (F). Todos los métodos fueron isocráticos, se llevaron a cabo a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ y con un flujo de solvente de 1 mL/min. El equipo detector de masas utilizado correspondió a un MSQ Plus de Thermo Scientific, en el que se partió de las condiciones que se muestran en el método A. Seguidamente, se procedió a variar condiciones del detector de masas: el voltaje del cono y la temperatura.

Asimismo, se programó una de las longitudes de onda de medición del detector DAD a 420 nm y el tiempo de corrida a 20 minutos, para obtener el método B. Se procedió a hacer un ajuste en el programa. Se redujo el tiempo a 10 minutos y se ajustaron todos los solventes a solventes ácidos con un 0,1% de ácido fórmico. Además, se redujo el solvente orgánico, ajustando el porcentaje de metanol a 15% y el de agua a 45%. Dichas variaciones al programa de elución dieron origen al método C.

Posteriormente, se procedió a hacer un ajuste en el tiempo del programa, donde se probó el tiempo de corrida de 10, 15 y 20 minutos. Se observó que el tiempo ideal para el programa era de 15 minutos, y este cambio dio origen al método D. Se varió una vez más la temperatura de 600 $^{\circ}\text{C}$ a 550 $^{\circ}\text{C}$ para obtener el método E.

Finalmente, con el fin de reducir afectación en el equipo, se decidió dejar de utilizar solventes ácidos, y con este cambio se obtuvo el método F. El método F corresponde al método empleado para analizar el contenido de curcuminoides en las muestras de cúrcuma en polvo.

Cuadro III. Resumen de condiciones empleadas durante la optimización del método de análisis cromatográfico para el análisis de curcuminoides en muestras de cúrcuma.

Método	Programa de elución isocrático	Detector DAD (nm)	Detector MS
A	Tiempo: 10 min Agua/Ácido Fórmico (0,1%): 40% Metanol: 20% Acetonitrilo: 40%	220, 260, 370, 520	Modo de ionización: ESI Temperatura: 550 °C Voltaje del Cono: 70 V Polaridad: -ve,+ve Voltaje de Aguja: 3 kV
B	Tiempo: 20 Agua/Ácido Fórmico (0,1%): 40% Metanol: 20% Acetonitrilo: 40%	220, 420, 370, 520	Modo de ionización: ESI Temperatura: 600 °C Voltaje del Cono: 50 V Polaridad: -ve,+ve Voltaje de Aguja: 3 kV
C	Tiempo: 10 Agua/Ácido Fórmico (0,1%): 45% Metanol/Ácido Fórmico (0,1%): 15% Acetonitrilo/Ácido Fórmico (0,1%): 40%	220, 420, 370, 520	Modo de ionización: ESI Temperatura: 600 °C Voltaje del Cono: 50 V Polaridad: -ve,+ve Voltaje de Aguja: 3 kV
D	Tiempo: 15 Agua/Ácido Fórmico (0,1%): 45% Metanol/Ácido Fórmico (0,1%): 15% Acetonitrilo/Ácido Fórmico (0,1%): 40%	220, 420, 370, 520	Modo de ionización: ESI Temperatura: 600 °C Voltaje del Cono: 50 V Polaridad: -ve,+ve Voltaje de Aguja: 3 kV
E	Tiempo: 15 Agua/Ácido Fórmico (0,1%): 45% Metanol/Ácido Fórmico (0,1%): 15% Acetonitrilo/Ácido Fórmico (0,1%): 40%	220, 420, 370, 520	Modo de ionización: ESI Temperatura: 550 °C Voltaje del Cono: 50 V Polaridad: -ve,+ve Voltaje de Aguja: 3 kV
F	Tiempo: 15 Agua: 45% Metanol: 15% Acetonitrilo: 40%	220, 420, 370, 520	Modo de ionización: ESI Temperatura: 550 °C Voltaje del Cono: 70 V Polaridad: -ve,+ve Voltaje de Aguja: 3 kV

2.4.3 Identificación de curcuminoides por medio de UHPLC-MS

La identificación de los tres curcuminoides principales, curcumina (CUR), demetoxicurcumina (DMC) y bis-demetoxicurcumina (BDM), en los extractos se realizó empleando un detector Thermo Scientific MSQ Plus, utilizando un ionizador ESI en modo negativo, con una temperatura del ESI de 550 °C, voltaje del cono configurado en 70 V y el voltaje de la aguja en 3 kV.

Se observaron las tres señales correspondientes a cada uno de los tres curcuminoides, la primera con un tR de 8.73 min y 307 m/z correspondiente a BDM, seguida de un pico a un tR de 9.67 min y 337 m/z correspondiente a DMC, y finalmente una señal con un tR de 10.57 min y 367 m/z correspondiente a CUR.

2.4.4 Cuantificación de los tres curcuminoides principales

La cuantificación de curcuminoides en las muestras de cúrcuma se llevó a cabo por medio de análisis por HPLC. Se utilizó el método descrito previamente; las áreas se interpolaron en la ecuación de la curva de calibración correspondiente, como se muestra en la ecuación (5), donde A corresponde al área obtenida, b al intercepto, m a la pendiente y C a la concentración de curcuminoides buscada:

$$C = \frac{A-b}{m} \quad (5)$$

Seguidamente, se obtuvieron los mg/g de muestra seca como se muestra en la ecuación (6), donde C es la concentración obtenida de la ecuación (5), V es el volumen del balón aforado en litros, F_d es el factor de dilución utilizado en la disolución inyectada y m_m es la masa de cúrcuma seca en polvo de partida.

$$m_{\left(\frac{mg}{g}\right)} = \frac{C \cdot V \cdot F_d}{m_m} \quad (6)$$

Finalmente, la cantidad de curcuminoides se calculó también como porcentaje de curcuminoides, con la expresión (7), donde m_{T(mg/g)} corresponde a la masa total de curcuminoides en mg/g.

$$\text{Porcentaje de Curcuminoides}(\%) = m_{T\left(\frac{mg}{g}\right)} \cdot \frac{100}{1000} \quad (7)$$

2.5 Análisis de los extractos obtenidos por medio del método de la USP y el método optimizado de PLE

2.5.1 Curva de calibración y condiciones de equipo para la cuantificación de curcuminoides extraídos por medio del método USP

Para la construcción de la curva de calibración de CUR se utilizó un patrón de Sigma-Aldrich con un 78% de pureza. Todos los patrones se prepararon en MeOH y en un rango de 1 y 25 ppm para cada curva. Todas las disoluciones se filtraron utilizando un filtro de jeringa SUPELCO Iso-Disc™ PVDF-13-4 13mm x 0.45um antes de ser inyectadas. La curva de calibración obtenida se muestra en la Figura 8. La presente curva se preparó en el HPLC Agilent 1260 descrito anteriormente.

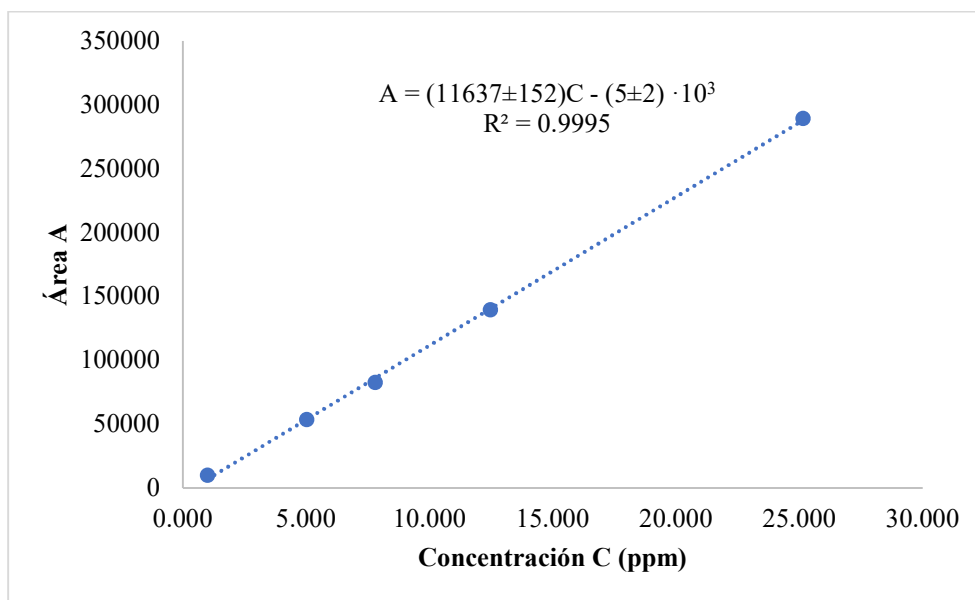


Figura 8. Curva de calibración de curcumina preparada para la cuantificación de las muestras extraídas con método USP.

2.5.2 Curvas de calibración preparadas para la cuantificación de los tres curcuminoides en los extractos obtenidos por medio de PLE.

Para la obtención de la curva de calibración de CUR se utilizó un patrón de CUR Sigma-Aldrich con un 78% de pureza. Para preparar las curvas de calibración de los otros dos curcuminoides, DMC y BDM, se utilizaron los compuestos purificados por medio de una columna cromatográfica, como se amplía más adelante en la respectiva sección. Todos los patrones se disolvieron en MeOH y se prepararon disoluciones en un rango de 1 y 25 ppm para cada curva. Todas las disoluciones

se filtraron utilizando un filtro de jeringa SUPELCO Iso-Disc™ PVDF-13-4 13mm x 0.45um antes de ser inyectadas. Las curvas de calibración obtenidas se muestran en la Figura 9. Las presentes curvas de calibración se prepararon en el UHPLC-DAD U3000, marca Thermo Scientific, descrito anteriormente.

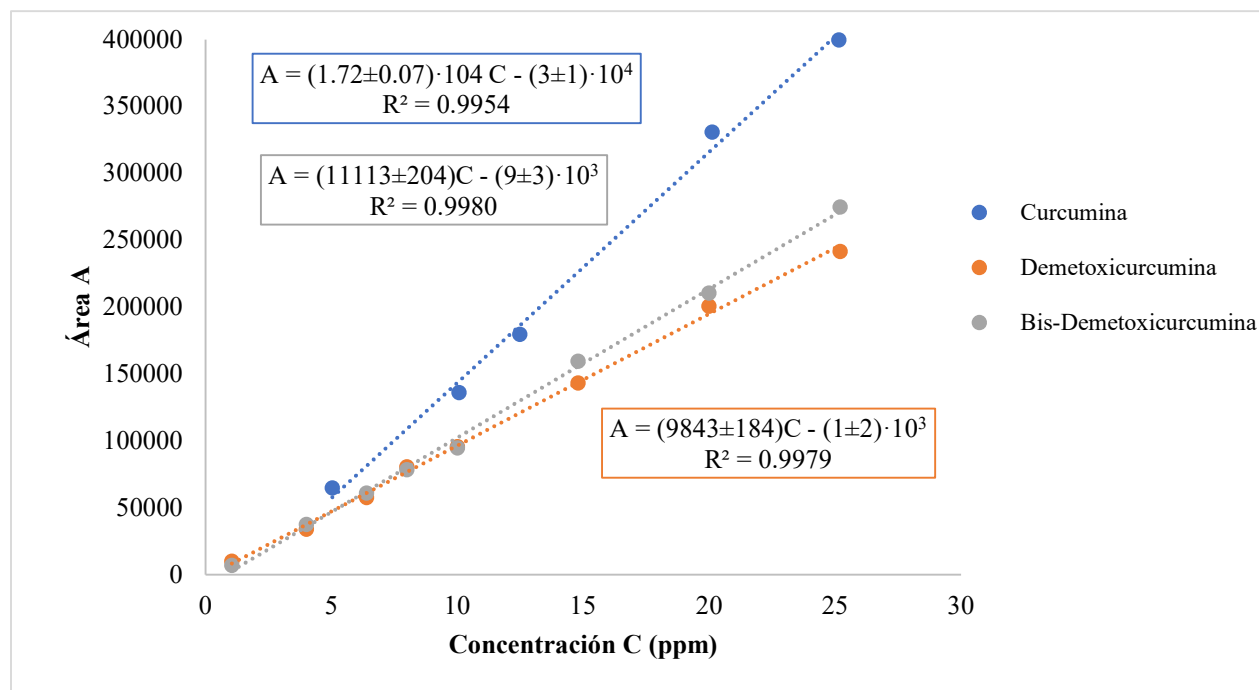


Figura 9. Curvas de calibración de CUR, DMC y BDM.

2.6 Evaluación del potencial antioxidante

La evaluación del potencial antioxidante en los extractos obtenidos a partir del método de PLE se llevó a cabo por medio de dos análisis: la valoración de Folin-Ciocalteu y el método DPPH.

2.6.1 Capacidad reductora por el método de Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu es un método comúnmente utilizado para la determinación de polifenoles totales. En dicha evaluación, los polifenoles en extractos de plantas reaccionan por medio de una reacción redox con el reactivo de Folin, para formar un complejo de color azul que puede cuantificarse a partir de espectrometría UV-VIS.⁷⁹ Sin embargo, por la naturaleza redox de la reacción, se ha encontrado que este método también es un indicador de la capacidad reductora, por lo que también resulta en una evaluación de la actividad antioxidante de una muestra de interés.⁸⁰

El reactivo de Folin-Ciocalteu utilizado para llevar a cabo los análisis se preparó en el laboratorio con los reactivos correspondientes y se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-VIS.

La determinación se llevó a cabo en balones de 25.00 mL. Se agregó una alícuota de 0.5 mL de la muestra correspondiente, y seguidamente 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego, se agregó 5 mL de la solución de Na₂CO₃ y se aforó con agua destilada. Los balones se mantuvieron en oscuridad durante una hora y al cumplirse este tiempo se midió su absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro previamente descrito.

2.6.2 Evaluación del potencial antioxidante por medio del método DPPH

La actividad antioxidante se puede determinar a partir la evaluación con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Los resultados son expresados como el valor IC₅₀, que indica la concentración de muestra que produce la inhibición del 50% del radical libre DPPH.⁸¹

En primer lugar, en balones aforados de 5.00 mL se agregaron alícuotas del extracto en un rango de 10 µL a los 150 µL, en función de cada muestra. Adicionalmente, se preparó un blanco agregando metanol en lugar de muestra. Seguidamente, se agregó 1 mL de la disolución madre de DPPH en cada balón y se aforó con metanol. Posteriormente, se dejó reposar por 30 minutos en la oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 517 nm en el espectrofotómetro previamente descrito.

El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

$$\%Inhib = \frac{(Abs_{blanco} - Abs_{muestra})}{Abs_{blanco}} \times 100 \quad (8)$$

Asimismo, el IC₅₀ se determinó mediante la siguiente fórmula, siendo b el intercepto y m la pendiente:

$$IC_{50} = \frac{(50-b)}{m} \quad (9)$$

2.7 Purificación de los tres curcuminoides principales presentes en *Curcuma longa*

2.7.1 Purificación de los curcuminoides mediante una columna cromatográfica

Se buscó aislar los compuestos principales de la cúrcuma, por lo que se procedió a optimizar un método cromatográfico para llevar a cabo la separación. El extracto de cúrcuma se preparó a partir de dos extracciones utilizando el método optimizado de PLE, con una masa de partida de 7.5 g de cúrcuma seca en cada una y utilizando una celda de extracción de 34 mL. El extracto se llevó a sequedad en un rotavapor para determinar su masa. Seguidamente se preparó la cabeza de columna redisolviendo el extracto, agregando 6.0 g de sílica, marca Sigma Aldrich (Sílica gel 60 Merck Millipore 70-230 mesh) y llevando a sequedad nuevamente. Se trabajó con una columna utilizando como fase estacionaria la misma sílica empleada en la preparación de la cabeza de columna para separar los compuestos. Se variaron las dimensiones y el gradiente de elución hasta encontrar las condiciones óptimas de separación. Después de varias pruebas se utilizó una columna con 3.5 cm de diámetro y 30 cm de altura. El gradiente de elución establecido se describe en el Cuadro IV.

Cuadro IV. Gradiente de elución y volúmenes utilizados para llevar a cabo la separación de los curcuminoides principales en extractos de cúrcuma.

Proporción CHCl₃: MeOH	Volumen (mL)
100 CHCl ₃	500
99:1	300
98:2	300
97:3	300
96:4	300
95:5	300
93:7	300
90:10	300
100 MeOH	250

2.7.2 Purificación de CUR mediante procesos de cristalización

Se llevó a cabo la purificación de la CUR por medio de la cristalización de la fracción de CUR y DMC obtenida de la columna previamente descrita. Se utilizó como medio de cristalización isopropanol (IPA), en el cual los curcuminoides DMC y BDM presentan una buena solubilidad a temperatura ambiente, mientras que CUR presenta una menor solubilidad a esa misma temperatura. Se agregó la menor cantidad de IPA posible para disolver todo el sólido a 60°C y se dejó enfriar lentamente, con una disminución de 1 °C por cada tres minutos aproximadamente. Los cristales obtenidos se filtraron con vacío por 5 minutos.

2.7.3 Caracterización por RMN de los tres curcuminoides purificados

Los tres curcuminoides aislados, BDM, DMC y CUR, se caracterizaron por medio de RMN. Se pesaron 25 mg de cada uno y se disolvieron en 450 uL de MeOD. Las mediciones se realizaron en un instrumento Bruker de 400 MHz.

2.8 Preparación y caracterización de nanopartículas híbridas lípido-polímero de curcumina

Las nanopartículas híbridas lípido polímero (LPN) se prepararon a partir de un método previamente optimizado en el marco de un proyecto colaborativo entre el Laboratorio Bioactividad para el Desarrollo Sustentable (BIODESS) de la Escuela de Química de la UCR y el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC).⁸² La nanoformulación con curcumina (CUR) se preparó por medio del método de emulsificación, agregando la fase acuosa a la fase orgánica y aplicando homogeneización a alta velocidad. La composición de la fase orgánica fue de 5 mg de CUR y 120 mg de CHO disueltos en 6 mL de una mezcla 1:1 de MeOH:CHCl₃. Asimismo, se preparó la fase acuosa disolviendo 250 mg de PLU en 50 mL de ácido acético al 0.1% y añadiendo 2 mL de una mezcla 1:1 de Tween 80:Span80. La adición de la fase orgánica se realizó a aproximadamente a 3 mL / min y se mezcló a 16 000 rpm durante 10 minutos, utilizando un homogeneizador de alta velocidad IKA ULTRA-TURRAX® T25. Las nanopartículas se recogieron mediante ultracentrifugación, utilizando una centrífuga Thermo Scientific Sorvall ST 16R a 12 000 rpm durante 40 minutos a 10 °C. Para eliminar el sustrato no encapsulado y las sustancias sin reaccionar, la emulsión se lavó tres veces con agua ultrapura, se recogió por ultracentrifugación y se filtró a través de una unidad de ultrafiltración ADVANTEC®. La formulación

final fue liofilizada para la caracterización correspondiente, o dispersada en 5 mL de agua purificada con 0.01% de Tween80® y refrigerada para las evaluaciones *in vitro*. Las nanopartículas con CUR preparadas se identificaron como LPN-CUR. Además, se preparó un blanco siguiendo el método anterior sin agregar CUR en la fase orgánica y se identificó como LPN-BL.

2.8.1 Eficiencia de encapsulación (%EE)

La %EE se determinó utilizando el método directo que cuantifica la cantidad real de CUR en la nanopartícula, por medio de la extracción del metabolito de la formulación. Para esto, se disolvieron 100 µL de muestras frescas en 900 µL de MeOH. Las muestras se filtraron a través de una membrana de poliamida de 0.45 µm colocada en un soporte de filtro de jeringa de acero inoxidable Sartorius. Se inyectaron 10 µL de la solución en un sistema UHPLC U3000 Thermo Scientific con detector de longitud de onda variable. La elución cromatográfica se realizó en una columna Nucleosil 100-5 C18 (250 mm x 4.0 mm, 5 µm) a una temperatura de 35 °C, utilizando un método isocrático, con 55% de MeCN y 45% de H₃PO₄ 0.1% como fase móvil a un flujo de 1 mL/min y estableciendo la detección a 420 nm. El porcentaje de EE para cada formulación se calculó por medio de la ecuación (10).

$$\%EE_D = \frac{CUR \text{ en LPN}}{CUR \text{ total agregada}} \times 100 \quad (10)$$

2.8.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR se obtuvieron con un equipo Thermo Scientific Nicolet 6700 equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) de diamante. Las muestras se colocaron en la celda ATR sin dilución y se analizaron en el rango de 4000-800 cm⁻¹, recolectando 32 escaneos a una resolución de 4 cm⁻¹.

2.8.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El tamaño de partícula (PS, z-promedio) y el índice de polidispersidad (PI) se determinaron en un instrumento Malvern Nano Zetasizer ZS90 utilizando un medio con índice de refracción 1.33, una viscosidad de 0.8872 cP y detector de 90°. Las muestras se diluyeron con agua desionizada para alcanzar concentraciones adecuadas, y las mediciones se realizaron a 25 °C.

2.8.4 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM)

Las imágenes HR-TEM se obtuvieron utilizando un microscopio JEOL, JEM2011 HR-TEM a una tensión de aceleración de 120 kV. Para el análisis, 5 uL de las muestras se colocaron en un soporte de muestras de rejilla y se secaron bajo una atmósfera de nitrógeno.

2.8.5 Perfil de liberación de LPN-CUR *in vitro*

El perfil de liberación *in vitro* de la formulación de LPN-CUR se estudió utilizando dos medios de disolución diferentes. El primero correspondió a agua (MD1) y el segundo a una solución salina de fosfatos con un pH de 7.4 que contenía 20% de MeOH y 2.5% de Tween 80 (MD2). Se colocó 1 mL de muestra en 80 mL del medio respectivo a una temperatura de 37.0 ± 0.5 °C y agitación constante de 150 rpm en una incubadora Labnet 211 DS. Se retiraron 4 mL de cada solución a 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos, sin reemplazar el volumen. Las alícuotas se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min en una centrífuga Thermo Scientific Sorvall ST 16R, la cual se mantuvo también a 37 °C. La concentración de CUR se determinó utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis 1800 de doble haz programado a una longitud de onda de 420 nm. Los perfiles de disolución de CUR se evaluaron en ambos medios de disolución para su comparación con la liberación de CUR contenida en las nanopartículas preparadas. Todos los perfiles de liberación se evaluaron por triplicado.

2.9 Evaluación de actividad antioxidante y citotoxicidad de CUR y las LPN preparadas

2.9.1 Actividad antioxidante de CUR y LPN-CUR por medio del método DPPH

La evaluación de DPPH se llevó a cabo por medio de un método previamente reportado,⁹⁰ para CUR aislada libre y nanoencapsulada. Las muestras de CUR libre se prepararon en solución etanólica y acuosa, mientras que las muestras de LPN-CUR se prepararon en agua. Brevemente, se preparó una solución de DPPH utilizando etanol (EtOH) como disolvente. Seguidamente, se mezclaron 0.5 mL de esta solución con 1 mL de la respectiva disolución de CUR libre o nanoencapsulada a diferentes concentraciones y se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante 30 min. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 517 nm

2.9.2 Evaluación de la citotoxicidad por MTT de CUR y las LPN preparadas

La evaluación de citotoxicidad se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica. La citotoxicidad *in vitro* de CUR libre, LPN-BL y LPN-CUR se evaluó mediante el método de ensayo MTT utilizando dos líneas celulares tumorales humanas: adenocarcinoma gástrico (AGS) y adenocarcinoma colorrectal (SW-620). La muestra de CUR libre se preparó en DMSO, mientras que LPN-BL y LPN-CUR se prepararon en el medio acuoso utilizado en el cultivo celular. En primer lugar, 100 μ L de las células a una concentración de 2×10^5 células/mL se sembraron en placas de 96 pozos por 24 horas, a 37 °C y en una atmósfera de 5% de CO₂. Seguidamente, se les agregaron los extractos a diferentes concentraciones (1-35 μ g/mL), después de una incubación de 48 h a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂. Después de una incubación de 48 h, se eliminó el medio, las células se lavaron dos veces con 100 μ L de PBS y se incubaron con 100 μ L de una solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio, 5 mg/mL en el medio de cultivo celular) durante 2 h a 37 °C. Los cristales de formazán formados se disolvieron en 100 μ L de EtOH 95%, y la absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de microplacas.

Los resultados se expresaron en porcentaje de viabilidad, utilizando como control la absorbancia de las células que crecen en ausencia del extracto, con la ecuación (11):

$$\text{Porcentaje de viabilidad (\%)} = \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \times 100 \quad (11)$$

Se graficó el porcentaje de viabilidad contra la concentración de la muestra, estableciéndose una curva de regresión cuadrática para calcular la IC₅₀. La muestra se analizó en tres repeticiones, cada una por triplicado.

3. Resultados

3.1 Cuantificación de curcuminoides en las muestras extraídas a partir del método de la USP

Se adquirieron doce muestras de distintas zonas geográficas del país con el fin de estudiar si la ubicación geográfica de cultivo tiene un efecto en el contenido de curcuminoides totales (TC). Inicialmente, se analizaron las muestras a partir de una adaptación del método establecido por la USP, cuyos resultados se muestran en el Cuadro V. Los resultados obtenidos evidencian que todas las muestras estudiadas cumplen con el parámetro definido por la USP, que establece que las muestras deben tener como mínimo un 3% de curcuminoides.¹⁶ Las muestras presentaron porcentajes de curcuminoides en un rango de 5.4% a 10.3%, donde las muestras con mayor contenido de curcuminoides se encontraron en las regiones Noreste (NE) y Noroeste (NO).

Cuadro V. Contenido de curcuminoides en muestras extraídas por medio del método establecido por la USP.

Producto	CUR (mg/g) ^{1,2,3}	DMC (mg/g)	BDM (mg/g) ^{1,2,3}	TC (mg/g) ^{1,2,3}
RN-1	41.0 ^{a,b} ± 2.5	19.1 ^{a,b,c} ± 1.2	17.9 ^{a,b} ± 2.1	77.8 ^a ± 1.1
RN-2	31.3 ^{c,d} ± 2.2	17.3 ^{c,d,e} ± 1.5	13.0 ^{c,d} ± 1.3	61.6 ^b ± 4.7
RN-3	31.2 ^{c,d} ± 0.8	13.8 ^{d,e,f} ± 0.3	11.2 ^{d,e} ± 0.7	56.1 ^{b,c} ± 1.8
RN-4	30.4 ^d ± 1.0	11.0 ^f ± 0.2	9.5 ^e ± 0.6	47.9 ^c ± 1.6
NE-1	44.8 ^{a,b} ± 0.8	27.0 ^g ± 0.6	19.0 ^{a,f} ± 0.4	90.8 ^d ± 1.8
NE-2	37.7 ^{b,c,d} ± 0.1	22.9 ^{a,b,g,h} ± 0.3	15.9 ^{b,c} ± 0.1	76.4 ^a ± 0.4
NE-3	47.9 ^a ± 1.9	27.4 ^g ± 1.4	18.0 ^{a,b} ± 0.7	93.3 ^d ± 3.5
NE-4	39.0 ^{b,c} ± 5.5	21.4 ^{a,b,c,h} ± 3.3	19.5 ^{a,f} ± 0.5	79.9 ^a ± 2.3
NO-1	30.4 ^d ± 1.0	12.9 ^{e,f} ± 1.0	10.8 ^{d,e} ± 0.8	54.1 ^{b,c} ± 2.8
NO-2	43.3 ^{a,b} ± 2.7	25.0 ^{g,h} ± 1.1	21.7 ^f ± 0.8	90.0 ^d ± 4.5
NO-3	59.6 ^e ± 6.0	26.2 ^{a,g,h} ± 0.7	21.0 ^{a,f} ± 0.4	102.8 ^e ± 0.9
RO-1	39.6 ^b ± 1.8	18.7 ^{b,c,d} ± 1.7	17.2 ^{a,b} ± 1.3	74.6 ^a ± 4.4

¹ mg de curcuminoide/g de material seco. ² Los valores se expresan como media ± desviación estándar (D.S.). ³ Diferentes letras de superíndice en la misma columna indican que las diferencias son significativas con $p < 0.05$, utilizando el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con un Tukey *post hoc* como prueba estadística.

3.2 Optimización de la extracción por PLE mediante un diseño factorial

Se procedió a optimizar la extracción de curcuminoides por medio del método de extracción líquida presurizada (PLE por sus siglas en inglés), aplicando un diseño factorial. La eficiencia de la extracción fue evaluada a través de la cuantificación de CUR, DMC y BDM por medio de UHPLC-DAD, para obtener TC en una de las muestras de la región Norte (RN) del país (RN-1). En el diseño factorial (DF) se evaluó el efecto de las tres variables descritas en la respectiva sección experimental; solvente, temperatura y tiempo estático de extracción. Las variables y los niveles del DF se seleccionaron considerando previos resultados obtenidos para la extracción de polifenoles de este y otro tipo de productos.⁸³

Las variables incluyeron temperatura, 60 °C y 80 °C; acetona y MeOH como disolventes y tiempos estáticos de extracción de 6 y 10 min, correspondiendo dentro de cada factor a niveles bajos (-1) y altos (+1), respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo luego de aleatorización. Los contenidos de curcuminoides totales determinados se muestran en el Cuadro VI, con sus respectivas condiciones de extracción. Como se observa en el Cuadro VI, el mayor porcentaje de curcuminoides se obtuvo con las condiciones de la extracción número 2, utilizando acetona como solvente, a una temperatura de 80°C y con un tiempo estático de 10 minutos. El análisis estadístico de los resultados del diseño factorial se llevó a cabo utilizando el programa Minitab 17.

El análisis estadístico no mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) para ninguna variable, ni interacciones de 2 o 3 vías en las gráficas de efectos ni de Pareto. Sin embargo, al excluir la interacción de 2 vías disolvente-tiempo, que mostraba el menor efecto, los resultados del DF indicaron una diferencia significativa ($p < 0.05$) para la temperatura, correspondiente al efecto estandarizado más alto, con 80 °C mostrando los mejores resultados.

Cuadro VI. Contenido de curcuminoides totales obtenido para cada experimento con sus respectivas condiciones de extracción, utilizando la muestra en polvo RN-1.

Experimento	Solvente	T (°C)	Tiempo estático (min)	TC ^{1,2,3}
1	Metanol	80	10	88.6 ^{a,b} ± 1.1
2	Acetona	80	10	90.8 ^a ± 3.2
3	Acetona	80	6	86.6 ^{a,b} ± 1.3
4	Metanol	80	6	81.0 ^b ± 0.8
5	Metanol	60	6	65.3 ^c ± 2.8
6	Acetona	60	6	57.8 ^{c,d} ± 3.7
7	Acetona	60	10	51.9 ^d ± 4.7
8	Metanol	60	10	57.7 ^{c,d} ± 1.0

¹ TC se expresa como mg/g de material seco ² Los valores se expresan como media ± desviación estándar (S.D.). ³ Diferentes letras de superíndice indican que las diferencias son significativas en $p < 0.05$ utilizando el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con un Tukey *post hoc* como prueba estadística.

Además, las interacciones de 2 vías temperatura-tiempo y solvente-temperatura también mostraron efectos significativos ($p < 0.05$), con acetona y tiempo estático de 10 min ofreciendo los mejores resultados. Finalmente, el análisis de 3 vías indicó que el valor más alto se encontró asociado a la combinación de los tres niveles mencionados, por lo tanto, las mejores condiciones para la extracción de curcuminoides de muestras de rizomas de *C. longa* en polvo fueron determinadas como 80 ° C de temperatura, acetona como disolvente y 10 min de tiempo estático.

3.3 Cuantificación de curcuminoides extraídos por medio del método PLE

Se analizaron los extractos de las doce muestras obtenidas con el método de extracción optimizado de PLE. Los resultados se muestran en el Cuadro VIII.

Los resultados de TC obtenidos muestran valores que van desde 49.9 mg/g de material seco hasta 125.0 mg/g de material seco, lo que representa porcentajes entre 4.9 y 12.5%, superiores al 3% mínimo establecido por USP.¹⁶ Dichos resultados también fueron mayores a los obtenidos por medio de la extracción por ultrasonido. En términos regionales, las muestras de la región NE

mostraron los valores más altos, con un TC promedio de 107.3 mg de curcuminoides/g de material seco, mientras que los valores más bajos se observaron en muestras de cúrcuma de RN, las cuales presentaron un valor promedio de TC de 73.3 mg de curcuminoides/g de material seco, 32% más bajo que las muestras de NE.

A nivel individual, RN-4 exhibió el valor más bajo (49.9 mg/g de material seco) de las 12 muestras, mientras que NE-1 mostró el valor más alto (muestra seca de 125.0 mg/g de material seco), seguida de NO-3 (118.7 mg/g de material seco).

Cuadro VIII. Muestras analizadas con el método de PLE optimizado a partir del diseño factorial.

Producto	CUR (mg/g)^{1,2,3}	DMC (mg/g)	BDM (mg/g)^{1,2,3}	TC (mg/g)^{1,2,3}
RN-1	42.1 ^{a,b} ± 0.3	25.9 ^{a,b} ± 1.0	21.5 ^{a,b,c} ± 3.0	90.8 ^{a,b} ± 3.3
RN-2	38.6 ^{b,c} ± 1.0	29.3 ^{a,c} ± 2.1	15.0 ^{d,e} ± 1.0	82.7 ^{b,c} ± 2.6
RN-3	31.8 ^d ± 2.6	19.0 ^d ± 1.3	17.9 ^{c,d} ± 1.8	68.7 ^d ± 5.8
RN-4	25.6 ^e ± 0.4	13.2 ^e ± 0.1	11.1 ^e ± 0.1	49.9 ^e ± 0.5
NE-1	50.0 ^f ± 0.2	46.6 ^f ± 1.7	28.4 ^f ± 2.0	125.0 ^f ± 3.7
NE-2	42.6 ^{a,b} ± 0.8	34.2 ^c ± 1.2	19.4 ^{b,c,d} ± 0.5	96.1 ^a ± 2.4
NE-3	54.8 ^f ± 1.2	40.8 ^g ± 0.6	22.1 ^{a,b,c} ± 0.4	117.8 ^g ± 2.2
NE-4	43.7 ^a ± 1.7	25.1 ^{a,b} ± 2.4	21.5 ^{a,b} ± 1.2	90.3 ^a ± 2.0
NO-1	35.3 ^{c,d} ± 0.6	21.9 ^{b,d} ± 0.1	14.3 ^{d,e} ± 0.4	71.6 ^{c,d} ± 1.1
NO-2	51.2 ^f ± 1.8	33.4 ^c ± 3.8	24.6 ^{a,f} ± 2.0	109.1 ^g ± 6.0
NO-3	62.7 ^g ± 0.4	30.5 ^{a,c} ± 0.3	25.6 ^{a,f} ± 0.3	118.7 ^g ± 1.0
RO-1	32.3 ^d ± 2.0	20.0 ^d ± 1.0	16.3 ^d ± 0.6	68.6 ^d ± 3.2

¹ mg de curcuminoide/g de material seco. ² Los valores se expresan como media ± desviación estándar (D.S.). ³ Diferentes letras de superíndice en la misma columna indican que las diferencias son significativas con $p < 0.05$ utilizando el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con un Tukey post hoc como prueba estadística.

Los reportes de la literatura muestran variabilidad en TC. Por ejemplo, estudios en rizomas de cúrcuma de China⁸⁴ y Tailandia⁸⁵ reportan valores que oscilan entre 5.9 y 28.3 mg/g de material seco, menores a los resultados de TC obtenidos para las muestras analizadas en el presente estudio.

Por otro lado, resultados en rizomas de la India⁸⁶ reportan valores de TC entre 1.4 y 51.2 mg/g de material seco, donde solo la muestra RN-4 muestra un valor dentro de este rango, mientras que las otras once muestras costarricenses exhiben mayor contenido.

En términos de extracto, los resultados para las 12 muestras oscilan entre 379.3 y 833.3 mg de TC/g de extracto. Entre las doce muestras estudiadas, las muestras NE-1 y NO-3 presentaron extractos especialmente ricos con un TC de 814.1 y 833.3 mg/g de extracto, respectivamente. En comparación con la literatura, los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran en el rango de valores reportados para muestras de India y Malasia, que oscilan entre 435–751 mg de TC/g de extracto.^{87,88}

En cuanto a los tres curcuminoides individuales, los resultados muestran que CUR presenta el mayor contenido en las doce muestras, mientras que BDM es el curcuminóide con el contenido más bajo. El contenido promedio de CUR para todas las muestras es de 42.5 mg/g de material seco en comparación con un promedio de 28.3 mg/g de material seco para DMC y 19.7 mg/g de material seco para BDM, lo que indica a CUR con un contenido promedio 1.5 y 2.1 veces mayor que los respectivos curcuminoides. La distribución de los contenidos de CUR, DMC y BDM en las muestras presenta variabilidad, con NO-3 mostrando el mayor porcentaje de CUR (52.8%), mientras que NE-1 muestra el mayor porcentaje de DMC (37.0%) y RN-3 tiene el porcentaje más alto para BDM (26.0%). La muestra NE-1 presenta el mayor porcentaje de los metabolitos secundarios DMC y BDM, donde estos corresponden al 59.4% del contenido de TC. Por otro lado, DMC y BDM muestran porcentaje más bajo en NO-3, donde representan el 47.2% del contenido de TC. Estos resultados son consistentes con resultados previamente reportados en la literatura que indican que CUR es el curcuminóide más abundante y que existe variabilidad en la proporción de curcuminoides en las muestras.^{84,89}

En cuanto a los contenidos de los curcuminoides, los resultados muestran que la proporción de cada curcuminóide en el contenido total de los doce rizomas de cúrcuma estudiados oscila entre 40.6% a 52.9% para CUR, 25.5% a 35.3% para DMC y 18.1% a 26.0% para BDM, mientras que otros estudios en rizomas de China, India y Malasia indican que CUR representa de un 52.4 a 68.0%, DMC corresponde de un 16.6 a 32.6% y BDM oscila de un 14.0 a 17.7%.^{84,87,88} Finalmente, el contenido total de los metabolitos secundarios DMC y BDM para estos rizomas

oscila entre 32.0 y 46.8%, mientras que en los rizomas de Costa Rica presenta valores más altos, entre 47.2% y 59.4% en las doce muestras.

3.4 Perfil polifenólico de rizomas de *C. longa* mediante análisis UHPLC-ESI-MS

A través del análisis UHPLC-QTOF-ESI MS se identificaron 33 compuestos polifenólicos en rizomas costarricenses (n = 12) de *C. longa*. La Figura 10 muestra los cromatogramas para estos compuestos.⁹⁰

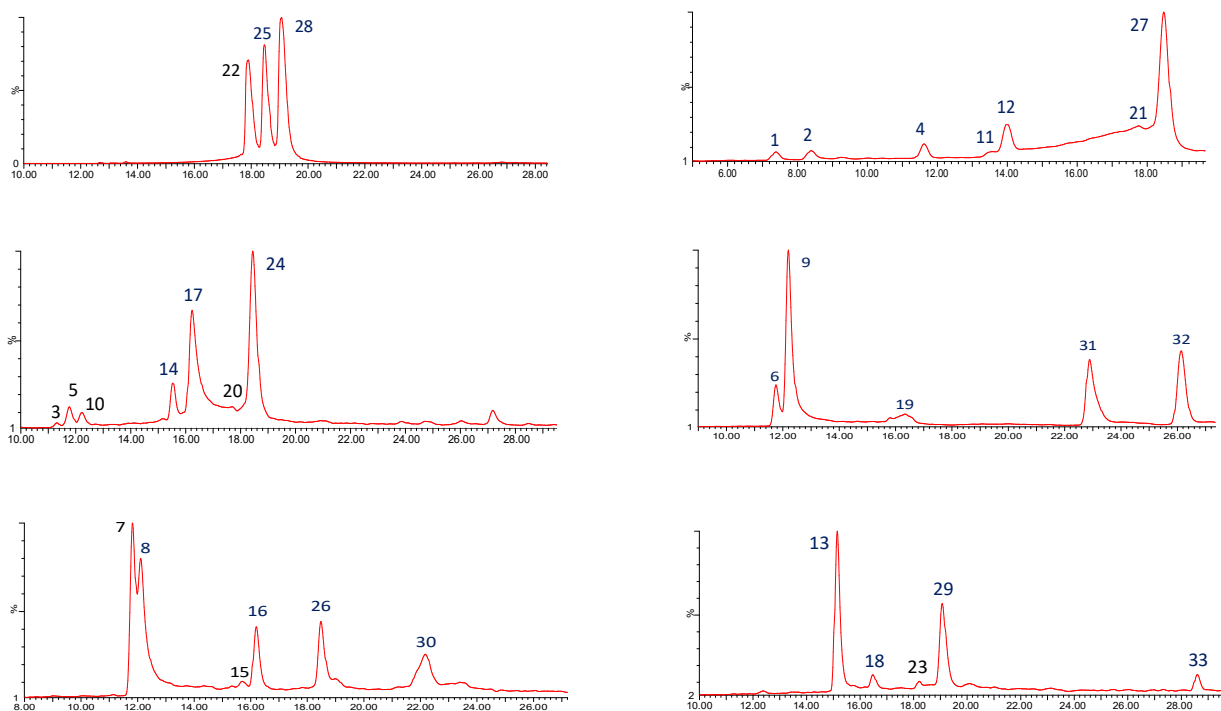


Figura 10. Cromatogramas UHPLC QTOF-ESI MS de iones extraídos de curcuminoides de rizomas de *C. longa* utilizando un espectrómetro de masas Xevo G2-XS QTOF (Waters™, Wilmslow, Reino Unido) en un rango de masa de 100 a 1000 amu.⁹⁰

El Cuadro VII resume los resultados del análisis para los 33 curcuminoides en las muestras de *C. longa* costarricenses (n = 12).

Cuadro VII. Perfil de los compuestos fenólicos identificados por UHPLC-QTOF-ESI MS en rizomas de *Cúrcuma longa* de Costa Rica.

Pico	Identificación tentativa ⁹⁰	Rt (min)	Fórmula molecular	[M + H] ⁺ Observado	MS2 Fragmentos	Muestras ¹
1	5-hidroxi-1,7-bis(4-hidroxifenil)hept-1-en-3-ona	7.39	C19H21O4	313.1422	147, 163, 133, 107	RN-1, RN-2, NE-3, NE-4, NO-1
2	1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)pent-1-en-3-ona	8.41	C19H21O5	329.1383	137	NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-2, NO-3, RO-1
3	4-(4-hidroxifenil)-2-oxobut-3-en-1-il 3-(4-hidroxifenil)acrilato	11.47	C19H17O5	325.1075	147	RN-1, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-3, RO-1
4	Tetrahidrobisdemetoxicurcumina	11.60	C19H21O4	313.1422	149, 107	RN-3, NE-1, NE-3, NE-4, RO-1
5	Calebin-A	11.71	C21H21O7	385.1276	177	RN-2, RN-3, NE-1, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2
6	2-(3,4-dihidroxibencilideno)-5-(4-hidroxiestirilo)furano-3(2H)-ona	11.74	C19H15O5	323.0922	123, 147	RN-2, RN-3, RN-4, NE-1, NE-3, NE-4, NO-2, NO-3, RO-1
7	curcumalongina A	11.83	C20H17O6	353.1024	147, 153, 171, 269, 293, 321, 338	RN-2, RN-3, RN-4, NE-1, NE-2, NE-4, NO-1, NO-3
8	curcumalongina B	12.11	C21H19O7	383.1140	123, 145, 153, 177, 201, 294, 350, 368	RN-2, RN-4, NE-1, NE-2, NE-4, NO-1, NO-3
9	2-(3,4-dihidroxibencilideno)-5-(4-hidroxi-3-metoxiestirelo)furano-3(2H)-ona	12.19	C20H17O6	353.1024	123, 150, 153, 177, 337, 338	RN-1, RN-2, RN-3, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1
10	5-hidroxi-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hept-1-en-3-ona	12.39	C21H25O6	373.1652	145, 163, 177, 137	RN-1, RN-2, RN-3, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1
11	1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5-(4-hidroxifenil)penta-1,4-dieno-3-ona	13.52	C18H17O4	297.1105	107, 119, 137, 145, 147, 173, 177	RN-1, RN-3, NE-1, NE-2, NE-4, NO-3
12	1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadieno-3-ona	13.97	C19H19O5	327.1216	137, 145, 177	RN-1, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1

Pico	Identificación tentativa ⁹⁰	Rt (min)	Fórmula molecular	[M + H] ⁺ Observado	MS2 Fragmentos	Muestras ¹
13	1,7-bis(4-hidroxifenil)-1,4,6-heptatrieno-3-ona	15.13	C19H17O3	293.1167	107, 131, 147, 173, 199, 225	RN-1, RN-2, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, RO-1
14	1-(4-hidroxifenil)-7-fenilhept-1-ene-3,5-diona	15.52	C19H19O3	295.1313	105, 119, 147	RN-1, RN-2, RN-3, RN-4, NE-1, NE-2, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1
15	1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-(4-hidroxifenil)hepta-1,4,6-trien-3-ona	15.67	C20H19O4	323.1253	107, 131, 137, 161, 177, 229	RN-2, RN-3, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-3
16	1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4,6-heptatrieno-3-ona	16.18	C21H21O5	353.1370	137, 145, 161, 177, 225	RN-1, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-2, NO-3
17	Curcumalongina C	16.21	C21H21O7	385.1276	117, 133, 145, 161, 177, 193, 195, 219	RN-1, RN-2, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-2, NO-3, RO-1
18	7-(3,4-dimetoxifenil)-1-(4-hidroxifenil)hept-1-ene-3,5-diona	16.46	C21H23O5	355.1512	119, 147	RN-2, NE-1, NE-2, NE-4, NO-1
19	2-(4-hidroxi-3-metoxibencilideno)-5-(4-hidroxi-3-metoxiestirelo)furano-3(2H)-ona	16.56	C21H19O6	367.1176	137, 177, 201, 323	RN-1, RN-2, RN-3, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1
20	Octahidrobisdemethoxycurcumin	17.25	C19H25O4	317.1733	107, 147, 161, 281	RN-2, RN-3, NE-1, NE-2, NE-4, NO-1
21	7-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenilo)hept-1-en-3-ona	17.75	C22H27O6	387.1826	145, 177, 219	RN-1, RN-3, NE-1, NE-4, NO-3
22	Bisdemetoxicurcumina	17.90	C19H17O4	309.1137	147, 225	RN-1, RN-2, RN-3, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1
23	1,7-bis(3,4-dihidroxifenil)-5-hidroxihept-1-en-3-ona	18.18	C19H21O6	345.1336	161, 149, 123, 147	RN-1, RN-2, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1
24	Dihidrodemetoxicurcumina	18.43	C20H21O5	341.1379	119, 145, 147, 177	RN-2, RN-3, NE-1, NE-4, NO-2, NO-3
25	Demetoxicurcumina	18.46	C20H19O5	339.1262	117, 119, 131, 145, 147, 177, 195, 223	RN-1, RN-2, RN-3, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1
26	Artamenona	18.51	C17H17O3	269.1168	119, 107	RN-2, RN-3, NE-1, NE-4, NO-1, NO-3
27	1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenilo)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenilo)-1,6-heptadieno-3, 5-diona	18.61	C22H23O7	399.1408	145, 147, 161, 177, 209	RN-1, RN-2, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3

Pico	Identificación tentativa ⁹⁰	Rt (min)	Fórmula molecular	[M + H] ⁺ Observado	MS2 Fragmentos	Muestras ¹
28	Curcumina	19.03	C ₂₁ H ₂₁ O ₆	369.1358	117, 145, 161, 177, 219, 225	RN-1, RN-2, RN-3, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1
29	5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-(4-hidroxiifenil)pent-1-en-3-ona	19.07	C ₁₈ H ₁₉ O ₄	299.1281	137	RN-1, RN-3, NE-4, NO-2, NO-3
30	2-(3,4-dihidroxi-5-metoxibencilideno)-5-(3,4-dimetoxiestirelo)furano-3(2H)-ona	22.15	C ₂₂ H ₂₁ O ₇	397.1262	191, 153	RN-1, RN-2, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-3
31	2-(4-hidroxi-3-metoxibencilideno)-5-(4-hidroxiestirilo)furano-3(2H)-ona	22.88	C ₂₀ H ₁₇ O ₅	337.1054	137, 147	RN-1, RN-2, RN-3, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1
32	2-(4-hidroxiestirilideno)-5-(4-hidroxiestirilo)furano-3(2H)-ona	26.16	C ₁₉ H ₁₅ O ₄	307.0948	107, 147	RN-1, RN-2, RN-4, NE-1, NE-2, NE-3, NE-4, NO-1, NO-2, NO-3, RO-1
33	4,4'-(3,5-dihidroxiheptano-1,7-diil)bis(benceno-1,2-diol)	28.14	C ₁₉ H ₂₅ O ₆	349.164	149, 163, 177	NE-1, NE-2, NE-4, NO-2, NO-3

¹ Regiones: Norte (RN), Noreste (NE), Noroeste (NO), Oeste (RO).

En comparación con la literatura, los resultados encontrados en los rizomas costarricenses se alinean con reportes previos en cuanto a la diversidad de estructuras para los diferentes curcuminoides identificados.^{91,92}

3.5 Evaluación del potencial antioxidante de las muestras extraídas por medio del método optimizado del PLE

El potencial antioxidante de los extractos de *C. longa*, obtenidos a partir del método optimizado de PLE, se estudió por medio de dos métodos, el análisis de Folin-Ciocalteu y la evaluación de actividad antioxidante por DPPH. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

3.5.1 Capacidad reductora a partir de la valoración Folin-Ciocalteu para las muestras extraídas por medio del método optimizado del PLE

Estudios recientes en polifenoles con diferentes estructuras han demostrado que la determinación de Folin-Ciocalteu, ampliamente utilizada para evaluar el contenido polifenólico total, es un método adecuado para evaluar la capacidad reductora polifenólica,^{80,93} el cual se ejerce a través de un mecanismo de transferencia de un único electrón (SET, Single Electron Transfer).^{94,95} El

Cuadro IX resume los resultados de capacidad reductora a partir del método de Folin-Ciocalteu (FC) en los extractos obtenidos por medio de PLE de los rizomas de *C. longa* (n = 12) en estudio.

Cuadro IX. Capacidad reductora a partir de la valoración Folin-Ciocalteu para los extractos de *C. longa* (n=12)

Producto	FC (mg GAE/g)^{1,2,3}	Producto	FC (mg GAE/g)^{1,2,3}
RN-1	250.0 ^{a1} ± 6.5	NE-3	281.9 ^c ± 1.5
RN-2	224.5 ^b ± 5.4	NE-4	287.8 ^c ± 4.8
RN-3	228.0 ^b ± 5.6	NO-1	219.8 ^b ± 2.3
RN-4	214.8 ^b ± 4.7	NO-2	260.2 ^{a,d} ± 3.8
NE-1	278.8 ^c ± 2.0	NO-3	301.0 ^e ± 3.3
NE-2	267.1 ^d ± 2.6	RO-1	229.2 ^b ± 0.3

¹ mg de ácido gálico equivalente (GAE)/g de extracto. ² Los valores se expresan como media ± desviación estándar (D.S.). ³ Las diferentes letras de superíndice indican que las diferencias son significativas en $p < 0.05$ utilizando el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con un Tukey *post hoc* como prueba estadística.

Los resultados de FC muestran valores que van desde 214.8 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de extracto a 301.0 mg GAE/g de extracto. El análisis ANOVA unidireccional seguido de la prueba *post hoc* de Tukey mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras de RN y NE. Las muestras de la región NE presentan los resultados más altos, con un valor promedio de FC de 260.3 mg GAE/g de extracto en comparación con los resultados de las muestras de la región RN, que exhiben un promedio de 229.3 mg GAE/g de extracto, 12% más bajo.

A nivel individual, RN-4 muestra el valor más bajo (214.8 mg GAE/g de extracto) entre las 12 muestras, seguida de NO-1 (219.8 mg GAE/g de extracto), mientras que NO-3 muestra el valor más alto (301.0 mg GAE/g de extracto). Esto indica una alta diversidad entre las muestras de la región NO, mientras que las muestras de la región NE y RN muestran resultados más homogéneos.

Estudios previos reportados en la literatura han mostrado variabilidad en los resultados de FC para rizomas de cúrcuma. Por ejemplo, estudios en muestras de Malasia⁸⁸ y Tailandia⁸⁵ reportan valores que oscilan entre 221.7 y 317.6 mg de GAE/g de extracto, similares a los resultados obtenidos en el presente trabajo. En términos de material seco, un estudio en muestras de Tailandia⁹⁶ mostró

resultados entre 42.1 y 50.6 mg GAE/g de material seco, en un rango similar a los resultados obtenidos para los extractos de muestras de Costa Rica, cuyos valores se encontraron entre 33.3 y 45.2 mg GAE/g de material seco. Por otro lado, evaluaciones en muestras de Corea⁹⁷ e India⁸⁶ reportaron valores de FC entre 2.6 y 10.0 mg de GAE/g de material seco, más bajos que los resultados obtenidos en extractos de cúrcuma costarricense.

Los resultados del análisis UHPLC-DAD de TC siguen una tendencia similar a la de los resultados obtenidos en la evaluación de capacidad reductora de FC. Por ejemplo, la muestra RN-4 con el contenido más pobre de TC (49.9 mg/g de material seco) también presentó el valor de FC más bajo y las muestras NO-3 y NE-1, las cuales presentaron el contenido de TC más alto (118.7 y 125.0 mg/g de material seco respectivamente), también mostraron los resultados más altos de FC.

Con el fin de profundizar en esta observación, se realizó un análisis de correlación entre los resultados de la evaluación de FC y TC, determinado por UHPLC-DAD, obtenidos en todas las muestras (n = 12), como se observa en la Figura 11.a. Además, se evaluó la correlación entre FC y los contenidos individuales de curcuminoides determinados por UHPLC-DAD (CUR, DMC y BDM).

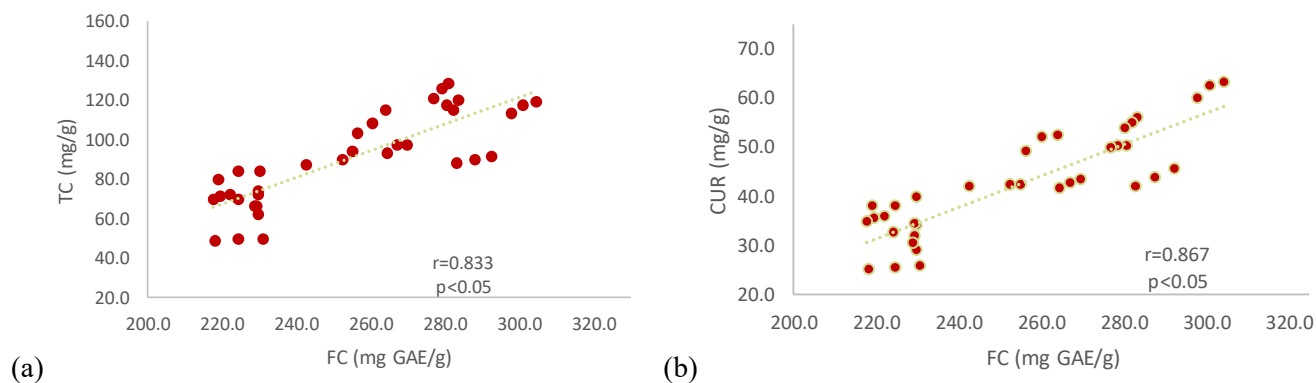


Figura 11. Correlación de los resultados de capacidad reductora de Folin-Ciocalteu (FC) y: (a) curcuminoides totales (TC) por UHPLC-DAD, (b) contenidos de curcumina (CUR por UHPLC-DAD).

Los resultados mostraron correlación positiva entre FC y TC ($r = 0.833$, $p < 0.05$). Con respecto a los curcuminoides individuales, la mayor correlación se obtuvo con CUR, donde los resultados indicaron una alta correlación positiva con FC ($r = 0.867$, $p < 0.05$), como se muestra en la Figura 11b. Este resultado es consistente con estudios previos para FC, que indican que al reemplazar un

hidrógeno por un grupo metoxilo, un donante de electrones, se promueve la transferencia de electrones, aumentando así la capacidad reductora de una molécula.^{80,98,99} Este es el caso de la estructura de CUR, que contiene dos grupos metoxilo en comparación con DMC con solo un grupo metoxilo y BDM que no tiene ningún grupo metoxilo.

3.5.2 Evaluación del potencial antioxidante por medio del método DPPH para las muestras extraídas con el método optimizado del PLE

La capacidad de eliminar los radicales libres se puede evaluar convenientemente a través de la reacción con un radical libre estable como el DPPH.¹⁰⁰ Estudios cinéticos para este ensayo han demostrado que el paso determinante de la velocidad de reacción implica una rápida transferencia de electrones de los aniones fenóxido al DPPH, lo que se favorece con disolventes orgánicos próticos,¹⁰¹ como el MeOH, utilizado como medio para la determinación. Los resultados de la evaluación de actividad antioxidante por medio del ensayo DPPH en rizomas de *C. longa* (n = 12) se presentan en el Cuadro X.

Cuadro X. Capacidad antioxidante, expresada como IC₅₀, obtenida para las muestras regionales de Costa Rica en estudio.

Producto	IC ₅₀ (µg/mL) ^{1,2}	Producto	IC ₅₀ (µg/mL) ^{1,2}
RN-1	21.22 ^{al} ± 0.19	NE-3	19.04 ^{f,g} ± 0.65
RN-2	23.32 ^b ± 0.25	NE-4	18.51 ^h ± 0.09
RN-3	28.01 ^c ± 0.52	NO-1	25.07 ^f ± 0.72
RN-4	29.12 ^d ± 0.88	NO-2	19.41 ^b ± 0.16
NE-1	16.07 ^e ± 0.10	NO-3	15.21 ^g ± 0.01
NE-2	19.27 ^{f,g} ± 0.05	RO-1	22.92 ^e ± 0.03

¹ Los valores se expresan como media ± desviación estándar (D.S.). ² Diferentes letras de superíndice indican que las diferencias son significativas en $p < 0.05$ utilizando el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con un Tukey post hoc como prueba estadística.

Los hallazgos de la evaluación de la actividad antioxidante por medio del método DPPH muestran la misma tendencia observada para la determinación de la capacidad reductora de FC y contenidos de TC. Por ejemplo, para las muestras NO-3 y NE-1, las cuales poseen los valores más altos de TC, se obtuvieron los valores más bajos de IC₅₀ (15.21 y 16.07 µg/mL respectivamente), por lo tanto, exhibieron una mayor actividad antioxidante.

El ANOVA unidireccional seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) para las muestras de las regiones RN y NE. Las muestras de RN-1 a RN-4 presentaron los valores más altos, con un IC_{50} promedio de 25.42 $\mu\text{g/mL}$, lo que representa una menor actividad antioxidante. En contraste, las muestras de NE-1 a NE-4 mostraron el IC_{50} promedio más bajo, 18.22 $\mu\text{g/mL}$, correspondiente a una mayor actividad antioxidante. Estas observaciones son consistentes con los resultados obtenidos para FC y TC. Asimismo, se evaluó la actividad antioxidante por el método DPPH del estándar Trolox, el cual presentó un IC_{50} de 5.62 $\mu\text{g/mL}$. A partir de este valor, se obtuvieron las actividades antioxidantes de los extractos expresadas como equivalentes de Trolox, cuyos valores de IC_{50} se encontraron en un rango entre 0.19 y 0.37 $\mu\text{g TE/mL}$.

En comparación con la literatura, estudios en rizomas de India⁸⁶ y Tailandia⁸⁵ han reportado valores de IC_{50} que oscilan entre 78.17 y 294.8 μg de material seco/mL, en un rango similar al de las muestras del presente estudio, que expresadas en términos de masa seca oscilan entre 101.4 y 194.1 μg de material seco/mL. Estudios de actividad antioxidante por DPPH en extractos de rizomas de otras especies de cúrcuma han mostrado variabilidad, por ejemplo, los extractos de rizomas de *Curcuma amada* presentaron un IC_{50} de 22.01 $\mu\text{g/mL}$,¹⁰² similar a los resultados del presente estudio, mientras que los rizomas de *Curcuma caesia* exhibieron un IC_{50} de 94 $\mu\text{g/mL}$,¹⁰³ mostrando así una menor actividad antioxidante que los extractos de las muestras costarricenses de *Curcuma longa*.

A nivel individual, la muestra NO-3 presentó la mayor actividad antioxidante (IC_{50} 15.21 $\mu\text{g/mL}$), seguida de NE-1 (IC_{50} 16.07 $\mu\text{g/mL}$) y NE-4 (IC_{50} 18.51 $\mu\text{g/mL}$). Estos resultados, complementados con los resultados obtenidos para FC y TC, sugieren que no solo el contenido de curcuminoides totales TC es importante para la actividad antioxidante, sino que también podría estar influenciado por el porcentaje de CUR presente. A pesar de no tener el mayor contenido de TC, NO-3 presenta el mayor porcentaje de CUR (52.8%) en comparación con NE-1 (40.6%) y NE-4 (47.5%). Por otro lado, aunque con menor porcentaje, NE-1 presenta mayor contenido de CUR que NE-4. Estas observaciones son consistentes con la tendencia observada en el IC_{50} de las muestras y también es consistente con resultados reportados previamente para la actividad antioxidante de los principales curcuminoides, que indican que CUR presenta la mayor actividad

antioxidante de los tres, por lo que actúa como el principal contribuyente al potencial antioxidante.¹⁰⁴

Se realizó un análisis de correlación entre la actividad antioxidante determinada por DPPH con los resultados de capacidad reductora FC, así como con el contenido TC, como se muestra en la Figura 12.

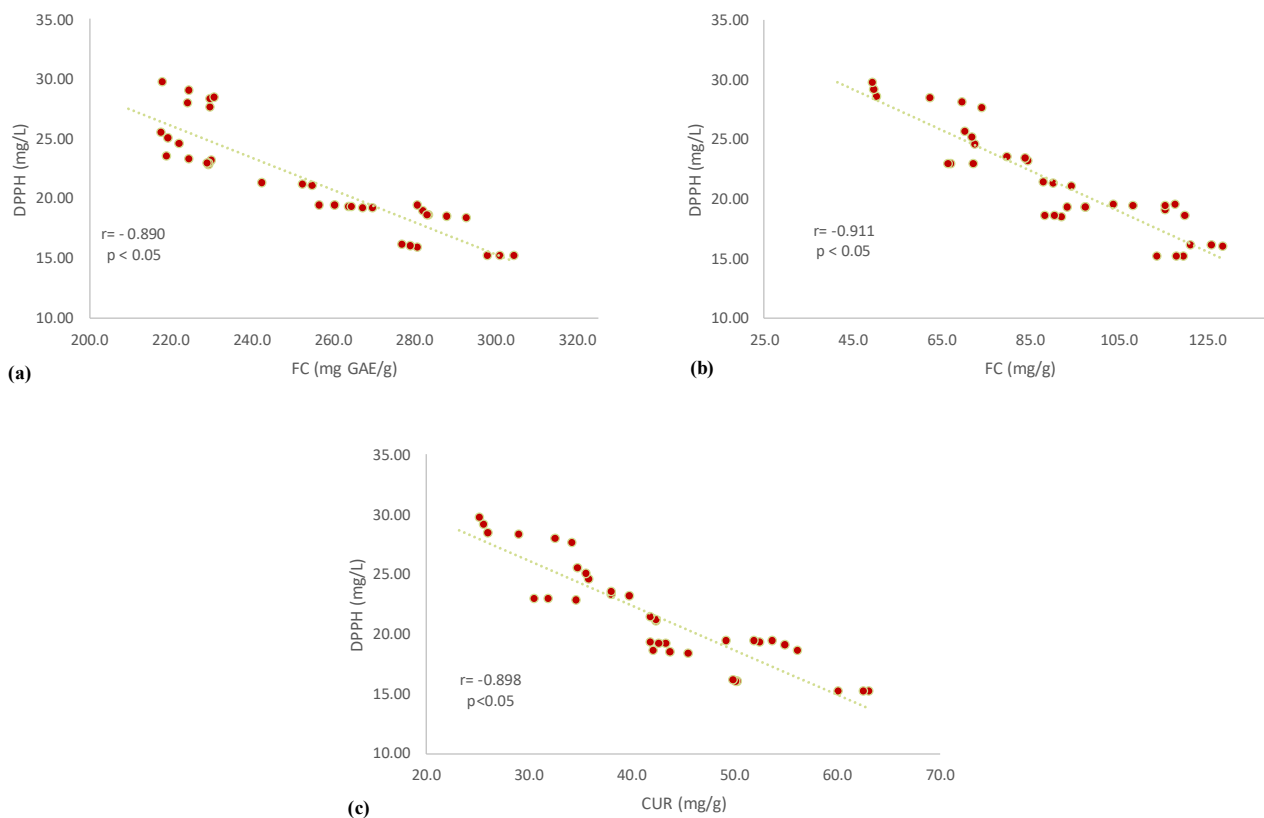


Figura 12. Correlación de la actividad antioxidante evaluada por el método DPPH con: (a) resultados de Folin-Ciocalteu (FC); (b) contenido total de curcuminoides (TC) medido por UHPLC-DAD; (c) contenido de curcumina (CUR) medido por UHPLC-DAD.

Los resultados mostraron una correlación negativa significativa ($p < 0.05$) para los valores de DPPH y los resultados de FC ($r = -0.890$). Además, los resultados de DPPH y el contenido de TC de la cuantificación por UHPLC-DAD también mostraron una correlación negativa significativamente alta ($r = -0.911$, $p < 0.05$). Estos resultados concuerdan con reportes anteriores que muestran correlación para los resultados de DPPH y FC en polifenoles.^{105,106}

Además, también se evaluó la correlación entre los valores de DPPH y los contenidos de curcuminoides individuales determinados por UHPLC-DAD. Se mostró una correlación negativa significativa para los resultados de DPPH y los contenidos de CUR ($r = -0.898$, $p < 0.05$), como se muestra en la Figura 12c, la cual presentó la mayor correlación de los tres. Este resultado es consistente con reportes previos que indican que los grupos metoxilo facilitan la transferencia de electrones, como se mencionó anteriormente,^{80,98,99} donde la capacidad de reducción aumenta por la presencia de los dos grupos metoxilo en CUR, en comparación con uno en DMC y ninguno en BDM.

3.6 Aislamiento y purificación de los tres curcuminoides principales

3.6.1 Aislamiento por columna cromatográfica

Se preparó una columna cromatográfica utilizando sílica como fase estacionaria y un gradiente de elución de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ como fase móvil, las condiciones específicas se detallan en la sección experimental correspondiente. Partiendo de una masa de extracto de 2.6392 g, se obtuvieron 40 fracciones, de las cuales de la 13 a la 16 correspondieron a DMC, con una masa de 101.2 mg, y 18 a 22 correspondieron a BDM, con una masa de 307.6 mg, mientras que de la 9 a la 12 se obtuvo una mezcla de CUR mayoritariamente con DMC, con una masa de 1088.4 mg. El total de curcuminoides aislados a partir de la columna correspondió a un 56.7% de rendimiento de extracto, y a un 7.2% de rendimiento por masa seca.

Los cromatogramas de los productos se muestran en la Figura 13. Un estudio por medio de HRMS permitió identificar los iones pseudomoleculares $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 309.1137 ($\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_4$), 339.1262 ($\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_5$) and 369.1358 ($\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_6$), para BDM, DMC y CUR respectivamente. Se encontraron asimismo fragmentos característicos a m/z 177, para CUR y DMC, así como a m/z 147 para BDM y DMC, como se muestra en la Figura 14.⁹⁰ Dichos iones y fragmentos fueron observados para los respectivos compuestos obtenidos del aislamiento por medio de UHPLC-DAD-MS.

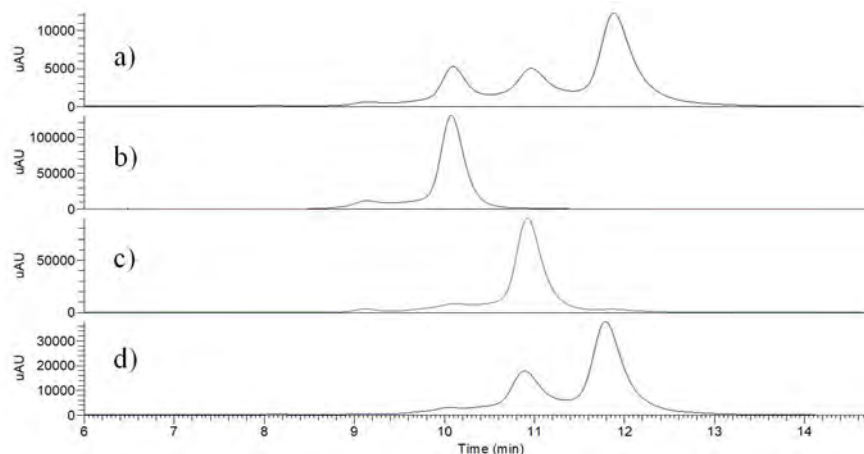


Figura 13. Cromatogramas de a) los tres curcuminoides, b) BDM, c) DMC, d) CUR con DMC.

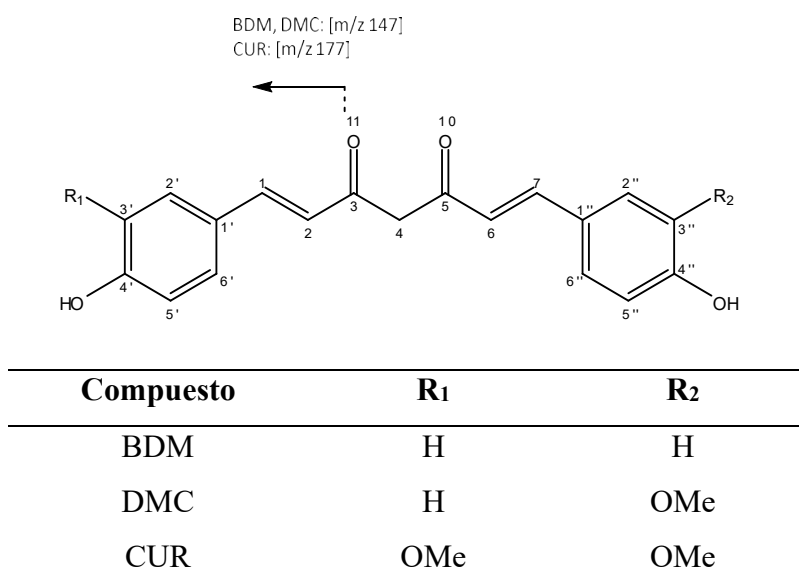


Figura 14. Estructura de los curcuminoides aislados.

Tanto BDM como DMC se han aislado previamente por medio de cromatografía,^{21,23} con purezas reportadas de 98.3% y 98.6%, respectivamente.²³ En el presente trabajo, los análisis por UHPLC-DAD-MS indicaron una purificación satisfactoria. En cuanto a la fracción de CUR con DMC, se procedió a purificar por medio de técnicas de cristalización.

3.6.2 Purificación de curcumina mediante cristalización

Para la purificación de CUR se llevaron a cabo dos procesos de cristalización, cuyos resultados se muestran en la Figura 15. Después de la segunda cristalización se obtuvo una curcumina con un 94.7% de pureza, comparable con resultados previos donde se obtuvieron purezas entre 92.57% y 99.85% por medio de procesos de cristalización por enfriamiento controlado.²²

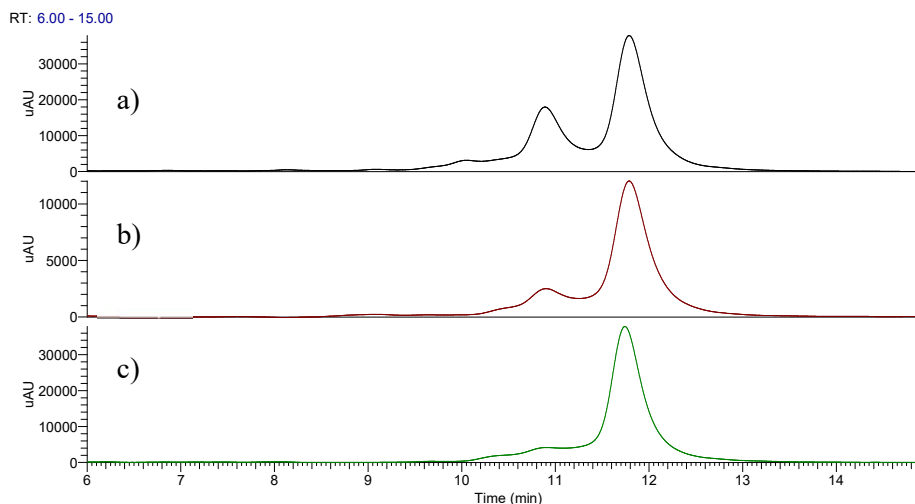


Figura 15. Cromatogramas obtenidos durante el proceso de purificación para a) fracción de la columna de curcumina y demetoxicurcumina, b) curcumina obtenida de la primera cristalización, c) curcumina obtenida de la segunda cristalización

3.6.3 Caracterización por resonancia magnética nuclear (RMN) de los curcuminoides purificados

Los resultados del análisis de RMN confirmaron el aislamiento y purificación de cada curcuminóide, cuyas estructuras se mostraron en la Figura 14. Los espectros de RMN se muestran en la Figura 16.

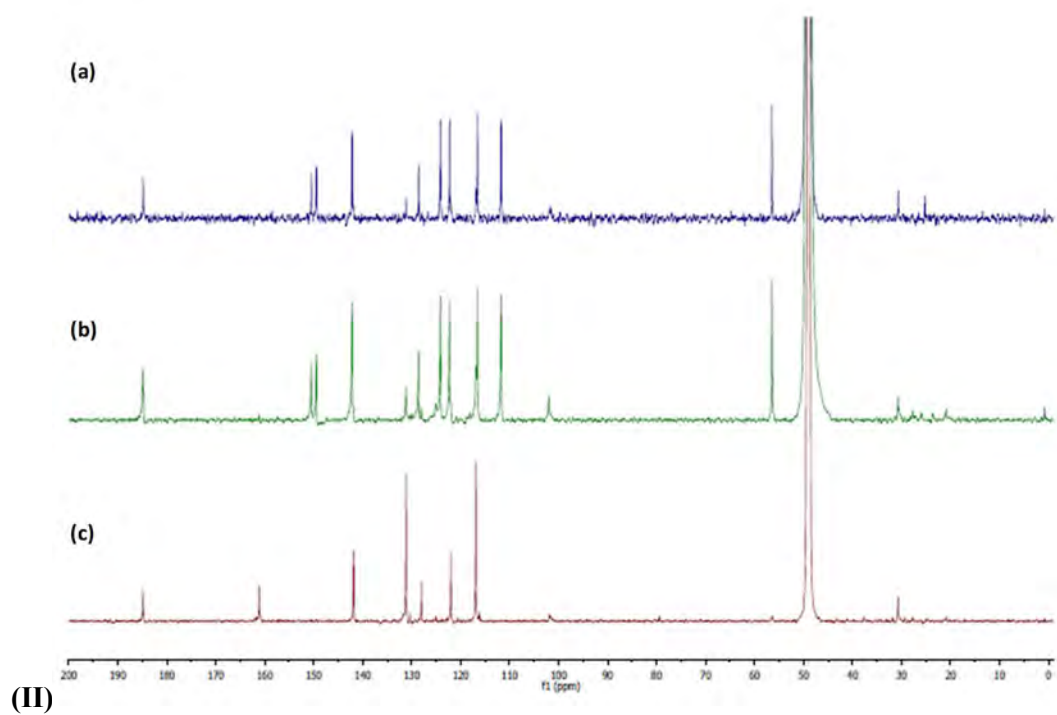
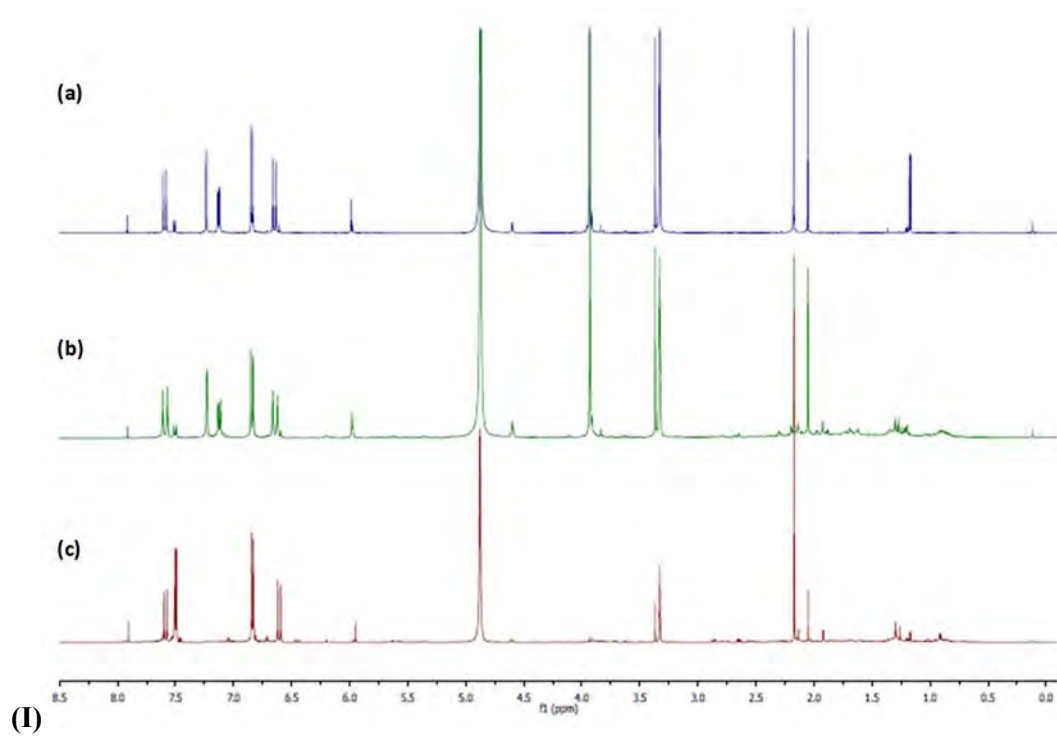


Figura 16. Espectros (I) ^1H -RMN y (II) ^{13}C -RMN para los curcuminoides aislados (a) CUR cristalizada, (b) DMC y (c) BDM. Las mediciones se realizaron en un instrumento Bruker de 400 MHz.

En el análisis de RMN de CUR, las señales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (Cuadro XI) son consistentes con las reportadas en la literatura para este compuesto.^{21,107,108} De forma característica, en el ^{13}C -RMN, se observan los picos a 56.46 ppm y 184.76 ppm, correspondientes a los grupos metoxilo y a los carbonilos, respectivamente. Adicionalmente, en el ^1H -RMN se observa el singulete a 3.94 ppm de los metoxilos.

Cuadro XI. Señales de RMN (MeOD) de CUR aislada y purificada. Las mediciones se realizaron en un instrumento Bruker de 400 MHz.

# C	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
3, 5	184.76	
4', 4''	150.49	
3', 3''	149.43	
1, 7	142.14	7.60 (d, $J=15.8$ Hz, 2 H)
1', 1''	128.58	
6', 6''	124.13	7.13 (dd, $J=8.2, 1.9$ Hz, 2 H)
2, 6	122.26	6.65 (d, $J=15.8$ Hz, 2 H)
5', 5''	116.57	6.85 (d, $J=8.2$ Hz, 2 H)
2', 2''	111.72	7.24 (d, $J=1.9$ Hz, 2 H)
4	101.98	5.99 (s, 2H)
(C3',C3'')-O-CH ₃	56.46	3.94 (s, 6 H)

En cuanto a las señales aromáticas, se muestra un patrón de desdoblamiento coincidente con un anillo 1,3,4-trisustituido, debido a que el pico a 6.85 ppm (H5', H5'') posee un desdoblamiento con $J=8.2$ ppm, el cual es consistente con un acoplamiento al protón *orto* a 7.13 ppm (H6', H6''); este último observado como un doblete de dobletes con un segundo desdoblamiento de $J=1.9$ Hz por el acoplamiento con el protón a 4J en posición *meta* (7.24 ppm, H2' y H2'').

Por otro lado, las señales de BDM, las cuales se presentan en el Cuadro XII, también coinciden con las reportadas en la literatura.^{21,107}

Cuadro XII. Señales de RMN (MeOD) de BDM aislada. Las mediciones se realizaron en un instrumento Bruker de 400 MHz.

# C	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)
3, 5	184.79	
4', 4''	161.06	
1, 7	141.84	7.58 (d, $J=15.8$ Hz, 2 H)
2', 2'', 6', 6''	131.14	7.49 (d, $J=8.6$ Hz, 4 H)
1', 1''	127.99	
2, 6	121.97	6.60 (d, $J=15.8$ Hz, 2 H)
3', 3'', 5', 5''	116.88	6.83 (d, $J=8.6$ Hz, 4 H)
4	101.88	5.94 (s, 2H)

Distintivamente en ¹³C-RMN se observa la ausencia de señales de metoxilo, así como la presencia de señales que corresponden a un sistema aromático *p*-sustituido a 116.88 ppm y 131.14 ppm, que deriva también en un menor número de señales de carbono en la región olefínica, así como el desplazamiento del pico de C4' y C4'' desde los 150.49 ppm en CUR hasta 161.06 ppm en BDM.

En ¹H-RMN, el cambio más significativo, además de la ausencia de señales de metoxilo, se observa en la región aromática con la desaparición de las señales a 7.13 ppm y 7.24 ppm, que son reemplazadas por un doblete a 7.49 ppm que forma parte del sistema *p*-sustituido junto con el pico a 6.83 ppm, con una constante de acoplamiento $J=8.6$ Hz, por tratarse de protones adyacentes en el anillo aromático.

Por último, DMC presenta las señales que se resumen en el Cuadro XIII, donde se puede observar una mayor cantidad de señales tanto en ¹³C-RMN como en ¹H-RMN debido a la pérdida de simetría en la molécula.

Cuadro XIII. Señales de RMN (MeOD) de DMC aislada. Las mediciones se realizaron en un instrumento Bruker de 400 MHz.

# C	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)
5	184.81	
3	184.76	
4'	161.09	
4''	150.47	
3''	149.42	
1, 7	142.13	7.59 (d, <i>J</i> =15.8 Hz)
2', 6'	131.5	7.51 (d, 8.7 Hz)
1''	128.58	
1'	127.99	
6''	124.12	7.12 (dd, <i>J</i> =8.2, 1.9 Hz)
6	122.29	6.64 (d, <i>J</i> =15.8 Hz)
2	122.25	6.61 (d, <i>J</i> =15.6 Hz)
5''	116.89	6.84 (d, <i>J</i> =8.2 Hz)
3', 5'	116.57	6.84 (d, <i>J</i> =8.2 Hz)
2''	111.73	7.23 (d, <i>J</i> =1.9 Hz)
4	102.00	5.98 (s)
(C3'')-O-CH ₃	56.45	3.93 (s)

En cuanto a las señales observadas, los picos coinciden en desplazamiento ya sea con CUR o con BDM, y esto se debe a que posee en una sección presenta el anillo aromático con metoxilo (semejante a CUR) pero en la otra sección de la molécula tiene un anillo aromático *p*-sustituido (similar a BDM).¹⁰⁸

3.7 Preparación y caracterización de las nanopartículas híbridas lípido-polímero de CUR

Se prepararon nanopartículas híbridas lípido-polímero (LPN) con CUR previamente purificada utilizando un método previamente optimizado,⁸² como se describió en la sección experimental respectiva. Las nanopartículas se denominaron LPN-CUR y su caracterización se detalla a continuación.

La espectroscopía FT-IR es una técnica apropiada para confirmar la encapsulación y brindar información acerca de la naturaleza de la posible interacción química que rige la unión entre el fármaco y los componentes centrales durante el proceso de preparación,^{82,109} por lo que se llevó a cabo la determinación de los espectros FT-IR de PLU, las nanopartículas blanco LPN-BL, CUR

libre y LPN-CUR entre 4000 y 800 cm^{-1} . Los resultados se muestran en la Figura 17. Las principales señales de CUR en los espectros fueron consistentes con las señales previamente reportadas para este compuesto en estudios previos.^{82,110}

Los espectros FT-IR del LPN-CUR muestran los picos de absorción característicos de CUR, además de una mezcla de señales del curcuminoide, PLU y CHO. Por ejemplo, las señales a 1465 cm^{-1} y 1046 cm^{-1} corresponden a las flexiones de CH_2 y CH_3 del anillo del CHO.¹¹¹ Por otro lado, se observaron también las principales señales características de CUR, como la señal a 3339 cm^{-1} , asociada con el estiramiento de los puentes de hidrógeno formados a través de los grupos -OH. En el espectro se pueden observar también señales a 2937 cm^{-1} , asignada a las vibraciones de estiramiento de metilo (CH_3), 2857 cm^{-1} , asociada al estiramiento alifático C-H y 1648 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento C-H-C. Finalmente, la señal a 1352 cm^{-1} se asoció a la flexión en el plano del grupo O-H y la señal a 1055 cm^{-1} al estiramiento C-O. Estas señales de CUR en el espectro FT-IR de LPN-CUR son evidencia de que el fármaco se cargó en el núcleo de las nanopartículas preparadas.

Las señales de PLU en los espectros FT-IR de LPN-CUR y el LPN-BL corresponden a 2896 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento alifático C-H, 1369 cm^{-1} , asignada a la flexión en el plano O-H, y 1045 cm^{-1} , producto del estiramiento C-O del grupo éter alifático.¹¹² Estas señales proporcionan información sobre la interacción entre el polímero y el fármaco, que de ocurrir resultaría en cambios de banda y ampliación en las señales de los grupos funcionales en los espectros FT-IR en comparación con los espectros de CUR libre y el polímero.¹¹³ El análisis espectral de LPN-BL y LPN-CUR mostró picos que fueron una suma de los picos característicos obtenidos con CUR y los componentes puros, lo que indica que no hay interacción entre los componentes estructurales del sistema y las moléculas de CUR. Estos resultados comprueban que no hubo interacción química entre el compuesto de interés y el portador. Por su parte, el espectro FT-IR mostró una reducción en la nitidez de los picos en la nanoformulación híbrida en comparación con el fármaco puro.

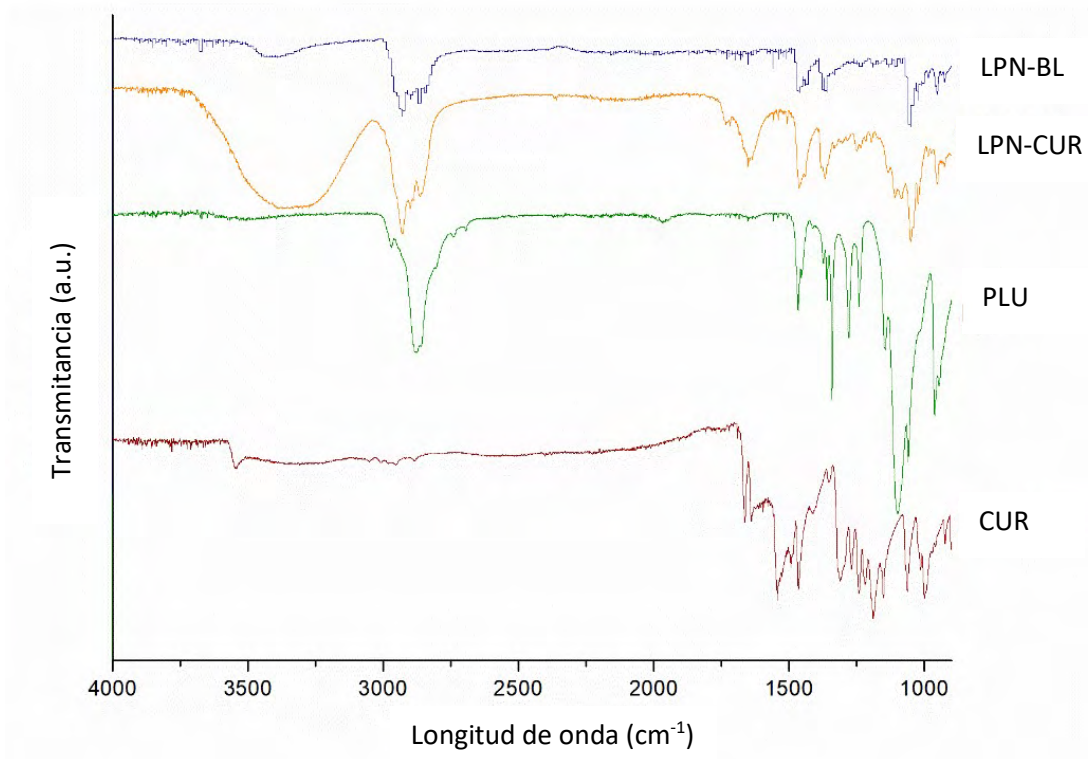


Figura 17. Espectros FT-IR de LPN-BL, LPN-CUR, PLU y CUR.

3.7.1 Porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE)

El porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) determina la cantidad de fármaco que se ha incorporado en el núcleo interno lipídico de la nanopartícula, y depende de distintos factores. Los %EE de LPN-CUR indicaron que CUR se cargó eficientemente en las nanopartículas, logrando una eficiencia de encapsulación del 99%. Este resultado es consistente con estudios previos para nanopartículas híbridas de DMC y BDM.⁸² El alto %EE está asociado con la fuerte interacción entre los grupos fenilo de la CUR cargada en el núcleo interno con el lípido. Por su parte, PLU proporciona las fuerzas para la formación de las nanopartículas por medio de la atracción entre los grupos alquilo del polímero y los grupos aromáticos de CUR.¹¹⁴ Debido esta naturaleza anfifílica, el núcleo externo de la nanopartícula se auto agrega en soluciones acuosas para formar micelas esféricas con coronas hidrofóbicas PEO-PPO-PEO.

3.7.2 Tamaño y morfología de las partículas

Los valores medios de tamaño y distribución de tamaño de partícula son parámetros fisicoquímicos que deben ser modulados para el desarrollo óptimo de una nanoformulación. El tamaño medio de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) de la formulación LPN-CUR se muestran en el Cuadro XIV. El tamaño mínimo alcanzable depende de factores como la viscosidad de los materiales y los parámetros de homogeneización. En un estudio previo se determinó que una alta velocidad de homogeneización (<16000 rpm) facilita la obtención de tamaños de partícula más pequeños.⁸² Al aplicar estos parámetros a la preparación de LPN-CUR, se logró la formación de nanopartículas con un tamaño inferior a los 50 nm.

Por otro lado, el PDI es una medida adimensional de la amplitud de la distribución del tamaño de partícula,^{115,116} y su valor debe ser inferior a 0.3, para que la muestra presente un comportamiento monodisperso.^{117,118} El PDI de LPN-CUR se encontró entre 0.0 y 0.3, lo que indicó que el tamaño de partícula exhibió una distribución estrecha y la formulación de nanopartículas fue adecuada.¹¹⁹

Cuadro XIV. Características físicas de LPN-CUR.

Formulación	Tamaño promedio (nm)	Índice de polidispersidad (PDI)
CUR-NP	49.5 ± 0.8	0.27 ± 0.03

En cuanto a la morfología de la nanopartícula, está puede ser observada mediante micrografías TEM, las cuales se muestran en la Figura 18. Como se observa en dicha figura, las nanopartículas LPN-CUR presentaron una forma esférica lisa y porosa. con un diámetro promedio de 50 nm, consistente con las mediciones dinámicas de dispersión de luz. Las nanopartículas mostraron una capa externa más clara, que puede corresponder a la membrana lipídica externa, y un núcleo interno más oscuro, el cual contenía la CUR cargada. Dichas observaciones fueron consistentes con resultados previamente reportados.¹²⁰

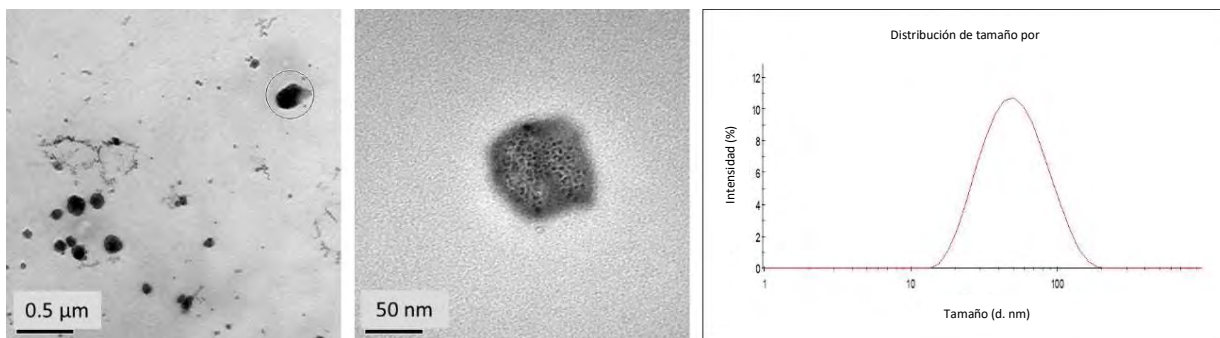


Figura 18. Imágenes HR-TEM e histograma de distribución de tamaño de LPN-CUR.

3.7.3 Perfil de liberación *in vitro*

La liberación *in vitro* de LPN-CUR y CUR libre se estudió en dos medios de disolución diferentes, en agua (MD1) y en un medio acuoso de buffer de fosfato con pH regulado a 6.8 y con un 20% de MeOH (MD2). El estudio se realizó durante un período de 120 min, como se muestra en la Figura 19.

Aunque no se recomienda el uso de agua como medio de liberación o disolución para moléculas poco solubles en agua, se probó este medio con la intención de evaluar la mejora de la solubilidad acuosa ejercida por el nanosistema preparado. El perfil de liberación de la CUR nanoencapsulada en agua fue mayor que el perfil de disolución obtenido para la CUR libre. Esta mayor liberación se puede atribuir a la interacción hidrofóbica entre el curcuminoide y la bicapa de la nanopartícula, ya que la interacción hidrofóbica se debilita, el núcleo de la capa de PLU se rompe y esta puede presentar una liberación rápida y continua de la molécula.¹²¹ Existen además otros factores diversos que pueden contribuir a una liberación eficiente, como un alto coeficiente de difusión debido al pequeño tamaño molecular, la baja viscosidad en la matriz, una alta área superficial y una corta distancia de difusión δ para el fármaco (es decir, liberación desde la región de la superficie externa de la nanopartícula).¹²²⁻¹²⁴ Los resultados comprobaron la mejora en la solubilidad acuosa de CUR por medio de la nanoencapsulación.

Por otro lado, en el estudio del perfil de liberación en el buffer de fosfatos (pH 6.8), CUR libre y LPN-CUR mostraron un comportamiento similar durante los primeros 30 minutos, después los resultados indicaron una mayor liberación de CUR libre con respecto a LPN-CUR. Dicho comportamiento puede estar asociado a la presencia del MeOH, que provoca una liberación

explosiva del curcuminoides libre, mientras que la curcumina nanoencapsulada presentó una tasa de liberación más controlada en el tiempo con respecto a la de CUR libre.

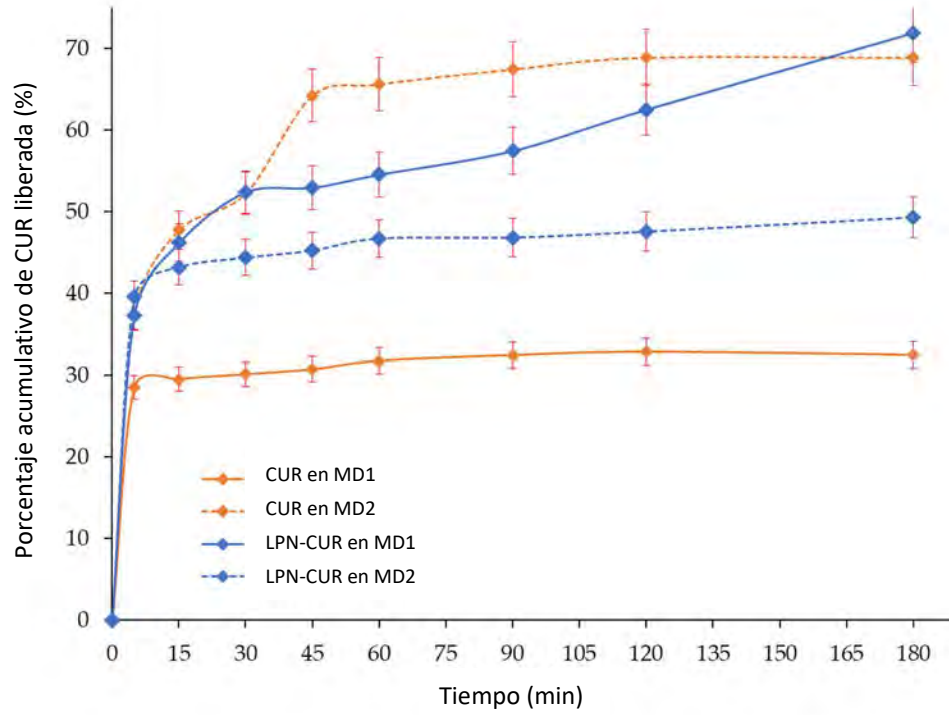


Figura 19. Perfil de liberación de LPN-CUR y tasa de disolución de CUR libre en dos medios de disolución. Las barras de error representan la desviación estándar de la concentración de CUR en los triplicados.

3.8 Evaluación de actividades biológicas *in vitro* de las nanopartículas preparadas

3.8.1 Evaluación de la actividad antioxidante de la CUR libre y LPN-CUR

La actividad antioxidante de la CUR libre y nanoencapsulada se estudió mediante análisis DPPH, tal y como se describe en la sección experimental respectiva. Los resultados se muestran en el Cuadro XV.

Cuadro XV. Actividad antioxidante de CUR libre y nanoencapsulada.

	IC ₅₀ (μg/mL) ^{1,2}		
	Etanol	Agua	Nanopartículas ³
CUR	9.60 ^a ± 0.12	2444.80 ^b ± 19.68	9.55 ^a ± 0.18

¹ IC₅₀ se encuentran expresado en unidades de μg de curcumina aislada /mL. ² Los valores se expresan como media ± desviación estándar (DE). ³ Muestras de nanopartículas se prepararon en agua. ⁴ Diferentes letras de superíndice indican que las diferencias son significativas con $p < 0.05$ utilizando el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con un Tukey *post hoc* como prueba estadística.

En primer lugar, los resultados para CUR libre en EtOH presentaron un IC₅₀ significativamente más bajo, por lo tanto, una mayor actividad antioxidante, con respecto a CUR libre en solución acuosa. Dichos resultados son consistentes con el comportamiento esperado para CUR debido a su baja solubilidad en agua.¹²⁵ Por otro lado, las nanopartículas de CUR mostraron una disminución importante en el IC₅₀ con respecto a CUR libre preparada en solución acuosa, por lo tanto, una mayor actividad antioxidante.

El análisis unidireccional ANOVA indicó que el IC₅₀ de nanopartículas de CUR no mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a CUR libre en solución etanólica, lo que demuestra que la actividad antioxidante se vio significativamente mejorada con la nanoencapsulación. Estas observaciones son consistentes con resultados previos obtenidos para formulaciones de nanopartículas de mezclas curcuminoides⁶⁹ y curcuminoides individuales CUR,^{47,126} BDM y DMC.⁸²

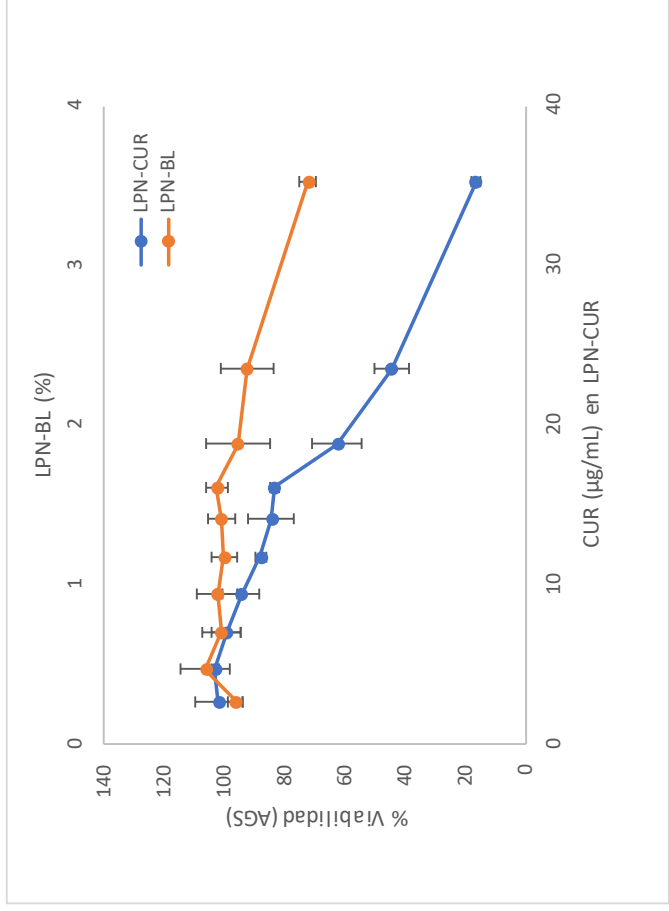
3.8.2 Evaluación de la actividad citotóxica por el método MTT de CUR libre, LPN-BL y LPN-CUR.

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de citotoxicidad de CUR libre, purificada en este trabajo de investigación, en dos líneas celulares tumorales: células de adenocarcinoma gástrico (AGS) y de colon (SW-620). Los resultados obtenidos, expresados como IC_{50} , es decir la concentración a la que se logró una actividad citotóxica del 50%, para las células AGS fue de $11.9 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$ ($32.5 \pm 2.8 \mu\text{M}$) y para las células SW-620 fue de $8.5 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ ($23.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$). Estudios previos han reportado valores de IC_{50} para CUR por encima de $16 \mu\text{M}$ ¹²⁷ y $10 \mu\text{M}$ ¹²⁸ en células SW-620. Otros estudios de CUR en distintas células tumorales de colon, reportaron IC_{50} de $50 \mu\text{M}$ para líneas celulares HCT-116,¹²⁹ $13.9 \mu\text{M}$ para las células HCT-15²⁶ y $9.83 \mu\text{M}$ para las células DLD-1.¹³⁰ Reportes de evaluaciones de citotoxicidad en células HT-29 reportaron un IC_{50} para la CUR de $40.7 \mu\text{M}$.¹³¹ Todos estos informes demostraron que el efecto citotóxico de la CUR purificada en el presente proyecto está en el rango de valores previamente reportados para otras líneas celulares tumorales de colon.

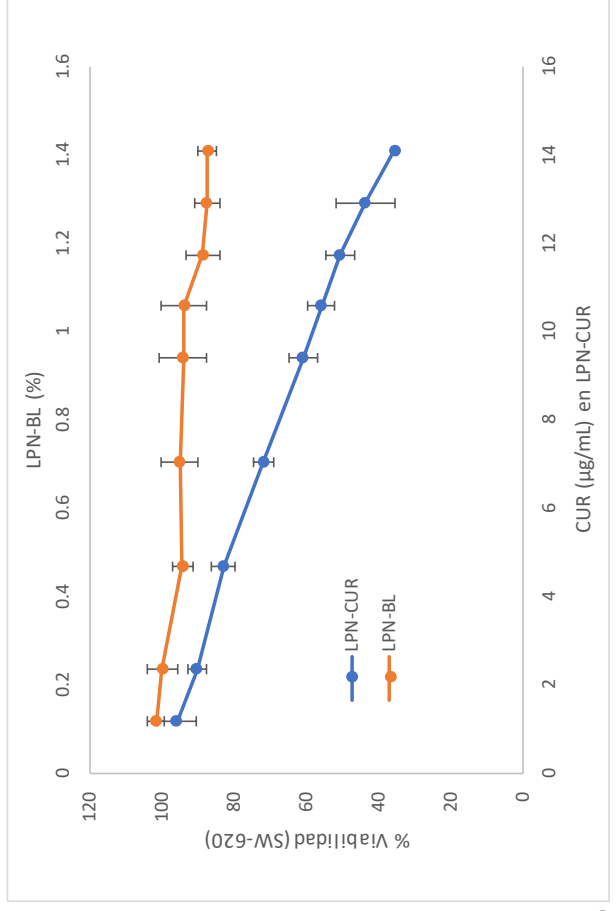
Por otro lado, los estudios de citotoxicidad de CUR libre en solución acuosa han reportado que no se ha observado actividad citotóxica.^{132,133} Por esta razón, investigaciones recientes se han enfocado en el estudio de la nanoencapsulación como una alternativa para mejorar la solubilidad y la administración de la curcumina, y que esto pueda resultar en una mejora en la actividad en células de carcinoma.^{134,135}

Como se describió en la sección experimental correspondiente, la formulación de CUR nanoencapsulada en estudio se logró dispersar en el medio acuoso utilizado como medio de cultivo celular para el ensayo de citotoxicidad, evitando el uso de solventes como DMSO, tradicionalmente utilizados para disolver CUR.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la citotoxicidad, tanto para LPN-BL como para LPN-CUR, se muestran en la Figura 20, representados como curvas de dosis-respuesta. Los resultados mostraron que la CUR nanoencapsulada presentó un efecto citotóxico dependiente de la dosis contra las células de adenocarcinoma gástrico (AGS) y colon (SW-620), después de 48h. El resultado expresado como IC_{50} para las células AGS (Figura 20.a) fue de $21.6 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ ($58.6 \pm 2.1 \mu\text{M}$) y para las células SW-620 (Figura 20.b) fue de $12.5 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ ($33.9 \pm 1.0 \mu\text{M}$).



a)



b)

Figura 20. Curvas dosis-respuesta de citotoxicidad de LPN-CUR y portadoras vacías LPN-BL en líneas celulares tumorales AGS y SW620. Los resultados se presentan como media \pm SD de tres experimentos independientes. a) Muestras en células AGS b) Muestras en células SW620, donde la curva naranja corresponde al blanco LPN-BL.

Al presente, existen algunos reportes disponibles para estudios en carcinomas colorrectales. En comparación con los resultados del presente proyecto, la evaluación de citotoxicidad de nanocristales de celulosa de curcumina-Fe₃O₄ estabilizados con una emulsión Pickering no lograron alcanzar una actividad del 50% con 30 µg/mL, incluso después de 96h, contra células de carcinoma colorrectal (HCT-116).¹³⁶ Por otro lado, estudios de citotoxicidad de nanopartículas de curcumina-quitosano en células de adenocarcinoma de colon diferentes (HT-29), reportaron valores de IC₅₀ de 10.2 µM¹³⁴ y 20 µM¹³⁷ después de 48h de tratamiento, menores que los valores obtenidos en el presente estudio, lo que corresponde a una mejor actividad citotóxica. En células tumorales gástricas, nanopartículas lipídicas conteniendo etopósido y curcumina mostraron resultados de citotoxicidad prometedores con un IC₅₀ de 2 µM en adenocarcinoma humano gástrico SGC7901.¹³⁸ Sin embargo, la comparación de los efectos citotóxicos entre estos estudios es compleja debido a la composición diversa de las nanopartículas y las características particulares de las líneas celulares tumorales utilizadas.

Finalmente, en la Figura 20, también se observa además que en contraste con la CUR nanoencapsulada, la viabilidad de las células incubadas con LPN-BL se mantuvo en aproximadamente el 80%, en relación con las células no tratadas dentro del porcentaje de nanopartículas utilizado en el experimento. Esto indica que la toxicidad del portador vacío LPN-BL era muy baja para las células y confirma su biocompatibilidad.

Conclusiones

Se obtuvieron doce extractos de rizomas de *C. longa* de Costa Rica empleando un método optimizado de Extracción Líquida Presurizada (PLE). La extracción por PLE mostró ser un método adecuado para la obtención de curcuminoides de muestras secas de cúrcuma, permitiendo obtener porcentajes más altos que en la extracción por ultrasonido, utilizada en el método de análisis de curcuminoides establecido por la Farmacopea Estadounidense (USP).

Los extractos obtenidos mostraron una alta diversidad de polifenoles, donde se lograron identificar 33 compuestos en total entre las doce muestras. Por su parte, la cuantificación de curcuminoides evidenció un alto contenido en las doce muestras provenientes de cuatro regiones distintas del país, donde todas presentaron un porcentaje superior al 3% mínimo establecido por la USP.

Los extractos de curcuminoides evaluados en este trabajo exhibieron un potencial beneficio con respecto a su capacidad para proteger contra el estrés oxidativo, debido a los resultados obtenidos por medio de las evaluaciones de actividad antioxidante, tanto por el método de Folin-Ciocalteu como por DPPH.

Se aislaron y purificaron los tres curcuminoides principales por medio de cromatografía y cristalización. La caracterización por UHPLC-DAD-MS y RMN confirmó el aislamiento de los curcuminoides con una alta pureza.

A partir de CUR aislada se prepararon nanopartículas híbridas lípido-polímero (LPN-CUR). El análisis por FT-IR confirmó la encapsulación y la ausencia de interacción química entre la curcumina y los componentes de la formulación. Las nanopartículas presentaron una alta eficiencia de encapsulación, y valores de tamaño medio de partícula y PDI dentro de los parámetros establecidos para una formulación óptima.

Los perfiles de liberación indicaron una alta tasa de liberación controlada en un medio de fosfatos con pH 6.8 y con 20% de MeOH. Por otro lado, el estudio de liberación en agua mostró una mayor liberación de la CUR nanoencapsulada con respecto al perfil de disolución de CUR libre, indicando una mejora en la solubilidad de CUR por medio de la nanoencapsulación, lo que podría contribuir a una mejora de su biodisponibilidad.

La evaluación de la actividad antioxidante de LPN-CUR y CUR libre por medio del método de DPPH, mostró una mejora significativa en la actividad antioxidante *in vitro* de CUR nanoencapsulada con respecto a CUR libre, ambas preparadas en medio acuoso.

Finalmente, una evaluación de citotoxicidad de LPN-CUR en células de adenocarcinoma gástrico (AGS) y colon (SW-620), mostraron un aumento en la actividad anticancerígena con respecto al portador vacío, y los resultados de IC_{50} indicaron una actividad citotóxica promisorio por parte de CUR nanoencapsulada con respecto a estudios previos. Por su parte, la toxicidad del portador vacío LPN-BL fue baja para las células control, resultado que confirma la biocompatibilidad de la formulación.

Bibliografia

- (1) Baker, D. D.; Chu, M.; Oza, U.; Rajgarhia, V. The Value of Natural Products to Future Pharmaceutical Discovery. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24* (6), 1225–1244. <https://doi.org/10.1039/b602241n>.
- (2) Atanasov, A. G.; Zotchev, S. B.; Dirsch, V. M.; Orhan, I. E.; Banach, M.; Rollinger, J. M.; Barreca, D.; Weckwerth, W.; Bauer, R.; Bayer, E. A.; Majeed, M.; Bishayee, A.; Bochkov, V.; Bonn, G. K.; Braidy, N.; Bucar, F.; Cifuentes, A.; D’Onofrio, G.; Bodkin, M.; Diederich, M.; Dinkova-Kostova, A. T.; Efferth, T.; El Bairi, K.; Arkells, N.; Fan, T. P.; Fiebich, B. L.; Freissmuth, M.; Georgiev, M. I.; Gibbons, S.; Godfrey, K. M.; Gruber, C. W.; Heer, J.; Huber, L. A.; Ibanez, E.; Kijjoo, A.; Kiss, A. K.; Lu, A.; Macias, F. A.; Miller, M. J. S.; Mocan, A.; Müller, R.; Nicoletti, F.; Perry, G.; Pittalà, V.; Rastrelli, L.; Ristow, M.; Russo, G. L.; Silva, A. S.; Schuster, D.; Sheridan, H.; Skalicka-Woźniak, K.; Skaltsounis, L.; Sobarzo-Sánchez, E.; Brecht, D. S.; Stuppner, H.; Sureda, A.; Tzvetkov, N. T.; Vacca, R. A.; Aggarwal, B. B.; Battino, M.; Giampieri, F.; Wink, M.; Wolfender, J. L.; Xiao, J.; Yeung, A. W. K.; Lizard, G.; Popp, M. A.; Heinrich, M.; Berindan-Neagoe, I.; Stadler, M.; Daglia, M.; Verpoorte, R.; Supuran, C. T. Natural Products in Drug Discovery: Advances and Opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.
- (3) Amalraj, A.; Pius, A.; Gopi, S.; Gopi, S. Biological Activities of Curcuminoids, Other Biomolecules from Turmeric and Their Derivatives – A Review. *J. Tradit. Complement. Med.* **2017**, *7* (2), 205–233. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.05.005>.
- (4) Kotha, R. R.; Luthria, D. L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules* **2019**, *24* (16), 2930. <https://doi.org/10.3390/molecules24162930>.
- (5) Petronilho, S.; Maraschin, M.; Coimbra, M. A.; Rocha, S. M. *In Vitro* and *in Vivo* Studies of Natural Products: A Challenge for Their Valuation. The Case Study of Chamomile (*Matricaria Recutita* L.). *Ind. Crops Prod.* **2012**, *40*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.041>.
- (6) Araya-Sibaja, A. M.; Wilhelm, K.; González-Aguilar, G. A.; Vega-Baudrit, J. R.; Salazar-López, N. J.; Domínguez-Avila, J. A.; Navarro-Hoyos, M. Curcumin Loaded and Co-Loaded Nanosystems: A Review from a Biological Activity Enhancement Perspective. *Pharm. Nanotechnol.* **2020**, *9* (2), 85–100. <https://doi.org/10.2174/2211738508666201228150659>.
- (7) Dosoky, N. S.; Setzer, W. N. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of Curcuma Species. *Nutrients* **2018**, *10* (9), 10–17. <https://doi.org/10.3390/nu10091196>.

- (8) Ulloa, E. Caracterización de la comercialización Internacional de mora, cúrcuma y subproductos de yuca (harinas y chips) <http://sistemas.procomer.go.cr/DocsSEM/009C1885-9099-4D2F-8AC7-1CF6845B4E87.pdf> (accessed May 23, 2021).
- (9) HerbalGram. 2020 Herb Market Report. **2021**, 131. Disponible en <http://herbalgram.org/media/16752/hg131-online.pdf>.
- (10) Li, R.; Xiang, C.; Zhang, X.; An Guo, D.; Ye, M. Chemical Analysis of the Chinese Herbal Medicine Turmeric (*Curcuma Longa* L.). *Curr. Pharm. Anal.* **2010**, 6 (4), 256–268. <https://doi.org/10.2174/157341210793292356>.
- (11) Zamrus, S. N. H.; Akhtar, M. N.; Yeap, S. K.; Quah, C. K.; Loh, W. S.; Alitheen, N. B.; Zareen, S.; Tajuddin, S. N.; Hussin, Y.; Shah, S. A. A. Design, Synthesis and Cytotoxic Effects of Curcuminoids on HeLa, K562, MCF-7 and MDA-MB-231 Cancer Cell Lines. *Chem. Cent. J.* **2018**, 12 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0398-1>.
- (12) Li, M.; Ngadi, M. O.; Ma, Y. Optimisation of Pulsed Ultrasonic and Microwave-Assisted Extraction for Curcuminoids by Response Surface Methodology and Kinetic Study. *Food Chem.* **2014**, 165, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.115>.
- (13) Patil, S. S.; Bhasarkar, S.; Rathod, V. K. Extraction of Curcuminoids from *Curcuma Longa*: Comparative Study between Batch Extraction and Novel Three Phase Partitioning. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2019**, 49 (4), 407–418. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1575859>.
- (14) Osorio-Tobón, J. F.; Carvalho, P. I. N.; Rostagno, M. A.; Petenate, A. J.; Meireles, M. A. A. Extraction of Curcuminoids from Deflavored Turmeric (*Curcuma Longa* L.) Using Pressurized Liquids: Process Integration and Economic Evaluation. *J. Supercrit. Fluids* **2014**, 95, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.08.012>.
- (15) Wakte, P. S.; Sachin, B. S.; Patil, A. A.; Mohato, D. M.; Band, T. H.; Shinde, D. B. Optimization of Microwave, Ultra-Sonic and Supercritical Carbon Dioxide Assisted Extraction Techniques for Curcumin from *Curcuma Longa*. *Sep. Purif. Technol.* **2011**, 79 (1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.03.010>.
- (16) United States Pharmacopeial Convention. *USP39-NF34 Dietary Supplements*; 2016; pp. 6867–6868
- (17) Yadav, D. K.; Sharma, K.; Dutta, A.; Kundu, A.; Awasthi, A.; Goon, A.; Banerjee, K.; Saha, S. Purity Evaluation of Curcuminoids in the Turmeric Extract Obtained by Accelerated Solvent Extraction. *J. AOAC Int.* **2017**, 100 (3), 586–591. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0057>.
- (18) Patil, S. S.; Pathak, A.; Rathod, V. K. Optimization and Kinetic Study of Ultrasound

- Assisted Deep Eutectic Solvent Based Extraction: A Greener Route for Extraction of Curcuminoids from *Curcuma Longa*. *Ultrason. Sonochem.* **2021**, *70* (July 2020), 105267. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105267>.
- (19) Binello, A.; Grillo, G.; Barge, A.; Allegrini, P.; Ciceri, D.; Cravotto, G. A Cross-Flow Ultrasound-Assisted Extraction of Curcuminoids from *Curcuma Longa* L.: Process Design to Avoid Degradation. *Foods* **2020**, *9* (6). <https://doi.org/10.3390/foods9060743>.
- (20) Kaufmann, B.; Christen, P. Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13* (2), 105–113. <https://doi.org/10.1002/pca.631>.
- (21) Jayaprakasha, G. K.; Nagana Gowda, G. A.; Marquez, S.; Patil, B. S. Rapid Separation and Quantitation of Curcuminoids Combining Pseudo Two-Dimensional Liquid Flash Chromatography and NMR Spectroscopy. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, *937*, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.011>.
- (22) Ukrainczyk, M.; Hodnett, B. K.; Rasmuson, Å. C. Process Parameters in the Purification of Curcumin by Cooling Crystallization. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20* (9), 1593–1602. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00153>.
- (23) Heffernan, C.; Ukrainczyk, M.; Gamidi, R. K.; Hodnett, B. K.; Rasmuson, Å. C. Extraction and Purification of Curcuminoids from Crude Curcumin by a Combination of Crystallization and Chromatography. *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21* (6), 821–826. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00347>.
- (24) González-Albadalejo, J.; Sanz, D.; Claramunt, R.M.; Lavandera, J.L.; Alkorta, I.; Elguero, J. Curcuminay curcuminoides: Química, estudios estructurales y propiedades biológicas. *An. la Real Acad. Nac. Farm.* **2015**, *81*, 278–310.
- (25) Nair, A.; Amalraj, A.; Jacob, J.; Kunnumakkara, A. B.; Gopi, S. Non-Curcuminoids from Turmeric and Their Potential in Cancer Therapy and Anticancer Drug Delivery Formulations. *Biomolecules* **2019**, *9* (1). <https://doi.org/10.3390/biom9010013>.
- (26) Lozada-García, M. C.; Enríquez, R. G.; Ramírez-Apán, T. O.; Nieto-Camacho, A.; Palacios-Espinosa, J. F.; Custodio-Galván, Z.; Soria-Arteche, O.; Pérez-Villanueva, J. Synthesis of Curcuminoids and Evaluation of Their Cytotoxic and Antioxidant Properties. *Molecules* **2017**, *22* (4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules22040633>.
- (27) Hatamipour, M.; Ramezani, M.; Tabassi, S. A. S.; Johnston, T. P.; Sahebkar, A. Demethoxycurcumin: A Naturally Occurring Curcumin Analogue for Treating Non-Cancerous Diseases. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234* (11), 19320–19330. <https://doi.org/10.1002/jcp.28626>.
- (28) Balendiran, G. K.; Dabur, R.; Fraser, D. The Role of Glutathione in Cancer. *Cell Biochem.*

- Funct.* **2004**, 22 (6), 343–352. <https://doi.org/10.1002/cbf.1149>.
- (29) Ma, Z.; Wang, N.; He, H.; Tang, X. Pharmaceutical Strategies of Improving Oral Systemic Bioavailability of Curcumin for Clinical Application. *J. Control. Release* **2019**, 316, 359–380. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.053>.
- (30) Sharifi-Rad, J.; Rayess, Y. El; Rizk, A. A.; Sadaka, C.; Zgheib, R.; Zam, W.; Sestito, S.; Rapposelli, S.; Neffe-Skocińska, K.; Zielińska, D.; Salehi, B.; Setzer, W. N.; Dosoky, N. S.; Taheri, Y.; El Beyrouthy, M.; Martorell, M.; Ostrander, E. A.; Suleria, H. A. R.; Cho, W. C.; Maroyi, A.; Martins, N. Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food, Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications. *Front. Pharmacol.* **2020**, 11 (September), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01021>.
- (31) Xia, Y.; Shen, S.; Verma, I. M. NF-KB, an Active Player in Human Cancers. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, 2 (9), 823–830. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0112>.
- (32) Shegokar, R. *Immunomodulatory Effects of Curcumin in Infectious and Non Infectious Diseases*; Elsevier Inc., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40016-9.00008-7>.
- (33) Talib, W. H.; Alsalahat, I.; Daoud, S.; Abutayeh, R. F.; Mahmud, A. I. Plant-Derived Natural Products in Cancer Research: Extraction, Mechanism of Action, and Drug Formulation. *Molecules* **2020**, 25 (22). <https://doi.org/10.3390/molecules25225319>.
- (34) Almosa, H.; Alqriqri, M.; Denetiu, I.; Baghdadi, M. A.; Alkhaled, M.; Alhosin, M.; Aldajani, W. A.; Zamzami, M.; Ucisik, M. H.; Damiati, S. Cytotoxicity of Standardized Curcuminoids Mixture against Epithelial Ovarian Cancer Cell Line SKOV-3. *Sci. Pharm.* **2020**, 88 (1). <https://doi.org/10.3390/scipharm88010011>.
- (35) Kunwar, A.; Barik, A.; Mishra, B.; Rathinasamy, K.; Pandey, R.; Priyadarsini, K. I. Quantitative Cellular Uptake, Localization and Cytotoxicity of Curcumin in Normal and Tumor Cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2008**, 1780 (4), 673–679. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.11.016>.
- (36) Kong, Y.; Ma, W.; Liu, X.; Zu, Y.; Fu, Y.; Wu, N.; Liang, L.; Yao, L.; Efferth, T. Cytotoxic Activity of Curcumin towards CCRF-CEM Leukemia Cells and Its Effect on DNA Damage. *Molecules* **2009**, 14 (12), 5328–5338. <https://doi.org/10.3390/molecules14125328>.
- (37) Li, C.; Miao, X.; Li, F.; Adhikari, B. K.; Liu, Y.; Sun, J.; Zhang, R.; Cai, L.; Liu, Q.; Wang, Y. Curcuminoids: Implication for Inflammation and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Phyther. Res.* **2019**, 33 (5), 1302–1317. <https://doi.org/10.1002/ptr.6324>.
- (38) Joe, B.; Vijaykumar, M.; Lokesh, B. R. Biological Properties of Curcumin-Cellular and Molecular Mechanisms of Action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, 44 (2), 97–111. <https://doi.org/10.1080/10408690490424702>.

- (39) Ahmad, I.; Zahin, M.; Aqil, F.; Hasan, S.; Khan, M. S. A.; Owais, M. Bioactive Compounds from *Punica Granatum*, *Curcuma Longa* and *Zingiber Officinale* and Their Therapeutic Potential. *Drugs Future* **2008**, *33* (4), 329–346. <https://doi.org/10.1358/dof.2008.033.04.1186159>.
- (40) Hewlings, S.; Kalman, D. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods* **2017**, *6* (10), 92. <https://doi.org/10.3390/foods6100092>.
- (41) Del Prado-Audelo, M. L.; Caballero-Florán, I. H.; Meza-Toledo, J. A.; Mendoza-Muñoz, N.; González-Torres, M.; Florán, B.; Cortés, H.; Leyva-Gómez, G. Formulations of Curcumin Nanoparticles for Brain Diseases. *Biomolecules* **2019**, *9* (2), 1–28. <https://doi.org/10.3390/biom9020056>.
- (42) Xu, Y.; Shrestha, N.; Prétat, V.; Beloqui, A. An Overview of *in Vitro*, *Ex Vivo* and *in Vivo* Models for Studying the Transport of Drugs across Intestinal Barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.005>.
- (43) McCauley, J.; Zivanovic, A.; Skropeta, D. Bioassays for Anticancer Activities. In *Methods in Molecular Biology 1055*; 2013; Vol. 1055, pp 191–205. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-577-4_14.
- (44) Duse, L.; Agel, M. R.; Pinnapireddy, S. R.; Schäfer, J.; Selo, M. A.; Ehrhardt, C.; Bakowsky, U. Photodynamic Therapy of Ovarian Carcinoma Cells with Curcumin-Loaded Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060282>.
- (45) Craft, B. D.; Kerrihard, A. L.; Amarowicz, R.; Pegg, R. B. Phenol-Based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11* (2), 148–173. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x>.
- (46) Park, C. Y.; Lee, K. Y.; Gul, K.; Rahman, M. S.; Kim, A. N.; Chun, J.; Kim, H. J.; Choi, S. G. Phenolics and Antioxidant Activity of Aqueous Turmeric Extracts as Affected by Heating Temperature and Time. *Lwt* **2019**, *105*, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.014>.
- (47) Wahlström, B.; Blennow, G. A Study on the Fate of Curcumin in the Rat. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. **1978**, *43* (2), 86–92. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1978.tb02240.x>.
- (48) Ravindranath, V.; Chandrasekhara, N. Absorption and Tissue Distribution of Curcumin in Rats. *Toxicology* **1980**, *16* (3), 259–265. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(80\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0300-483X(80)90122-5).
- (49) Sharma, R.A.; Euden, S.A.; Platton, S.L.; Cooke, D.N.; Shafayat, A.; Hewitt, H.R.; Marczylo, T.H.; Morgan, B.; Hemingway, D.; Plummer, S.M.; et al. Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 6847–6854, doi:10.1158/1078-0432.CCR-

04-0744.

- (50) Ravindranath, V.; Chandrasekhara, N. *In Vitro* Studies on the Intestinal Absorption of Curcumin in Rats. *Toxicology* **1981**, *20* (2–3), 251–257. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(81\)90056-1](https://doi.org/10.1016/0300-483X(81)90056-1).
- (51) Mirzaei, H.; Shakeri, A.; Rashidi, B.; Jalili, A.; Banikazemi, Z.; Sahebkar, A. Phytosomal Curcumin: A Review of Pharmacokinetic, Experimental and Clinical Studies. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *85*, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.098>.
- (52) Zheng, B.; McClements, D. J. Formulation of More Efficacious Curcumin Delivery Systems Using Colloid Science: Enhanced Solubility, Stability, and Bioavailability. *Molecules* **2020**, *25* (12), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules25122791>.
- (53) Bhatia, S. *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*; 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3>.
- (54) Bonferoni, M. C.; Rossi, S.; Sandri, G.; Ferrari, F. Nanoparticle Formulations to Enhance Tumor Targeting of Poorly Soluble Polyphenols with Potential Anticancer Properties. *Semin. Cancer Biol.* **2017**, *46*, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.06.010>.
- (55) Davatgaran-Taghipour, Y.; Masoomzadeh, S.; Farzaei, M. H.; Bahramsoltani, R.; Karimi-Soureh, Z.; Rahimi, R.; Abdollahi, M. Polyphenol Nanoformulations for Cancer Therapy: Experimental Evidence and Clinical Perspective. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 2689–2702. <https://doi.org/10.2147/IJN.S131973>.
- (56) Kumar, S.; Dilbaghi, N.; Saharan, R.; Bhanjana, G. Nanotechnology as Emerging Tool for Enhancing Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs. *Bionanoscience* **2012**, *2* (4), 227–250. <https://doi.org/10.1007/s12668-012-0060-7>.
- (57) Sanjay, S. S.; Pandey, A. C. A Brief Manifestation of Nanotechnology; 2017; pp 47–63. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3655-9_2.
- (58) Wilhelm-Romero, K.; Vega-Baudrit, J. V.; Navarro-Hoyos, M.; Araya-Sibaja, A. M. Nanomaterials for Drug Delivery and Pharmaceutical Formulations: Classification, Composition, and Preparation Methods. **2021**.
- (59) Rahman, H. S.; Othman, H. H.; Hammadi, N. I.; Yeap, S. K.; Amin, K. M.; Samad, N. A.; Alitheen, N. B. Novel Drug Delivery Systems for Loading of Natural Plant Extracts and Their Biomedical Applications. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 2439–2483. <https://doi.org/10.2147/IJN.S227805>.
- (60) Battaglia, L.; Gallarate, M. Lipid Nanoparticles: State of the Art, New Preparation Methods and Challenges in Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9* (5), 497–508. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.673278>.

- (61) Ezzati Nazhad Dolatabadi, J.; Omid, Y. Solid Lipid-Based Nanocarriers as Efficient Targeted Drug and Gene Delivery Systems. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, *77*, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.016>.
- (62) Garzón S., M. D. L.; Hernández L., A.; Vázquez, M. L.; Villafuerte R., L.; García F., B. Preparación de Nanopartículas Sólidas Lipídicas (SLN), y de Acarreadores Lipídicos Nanoestructurados (NLC). *Rev. Mex. Ciencias Farm.* **2008**, *39* (4), 50–66.
- (63) Kashyap, D.; Tuli, H. S.; Yerer, M. B.; Sharma, A.; Sak, K.; Srivastava, S.; Pandey, A.; Garg, V. K.; Sethi, G.; Bishayee, A. Natural Product-Based Nanoformulations for Cancer Therapy: Opportunities and Challenges. *Semin. Cancer Biol.* **2021**, *69* (June 2019), 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.014>.
- (64) Mahmoudi, R.; Hassandokht, F.; Ardakani, M. T.; Karimi, B.; Roustazadeh, A.; Tarvirdipour, S.; Barmak, M. J.; Nikseresht, M.; Baneshi, M.; Mousavizadeh, A.; Shirazi, M. S.; Alipour, M.; Bardania, H. Intercalation of Curcumin into Liposomal Chemotherapeutic Agent Augments Apoptosis in Breast Cancer Cells. *J. Biomater. Appl.* **2021**, *35* (8), 1005–1018. <https://doi.org/10.1177/0885328220976331>.
- (65) Nasery, M. M.; Abadi, B.; Poormoghadam, D. Curcumin Delivery Mediated by Bio-Based. **2020**, 1–29.
- (66) Jadid, M. F. S.; Shademan, B.; Chavoshi, R.; Seyyedsani, N.; Aghaei, E.; Taheri, E.; Goleij, P.; Hajazimian, S.; Karamad, V.; Behroozi, J.; Sabet, M. N.; Isazadeh, A.; Baradaran, B. Enhanced Anticancer Potency of Hydroxytyrosol and Curcumin by PLGA-PAA Nano-Encapsulation on PANC-1 Pancreatic Cancer Cell Line. *Environ. Toxicol.* **2021**, *36* (6), 1043–1051. <https://doi.org/10.1002/tox.23103>.
- (67) Huang, X.; Huang, X.; Gong, Y.; Xiao, H.; McClements, D. J.; Hu, K. Enhancement of Curcumin Water Dispersibility and Antioxidant Activity Using Core-Shell Protein-Polysaccharide Nanoparticles. *Food Res. Int.* **2016**, *87*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.009>.
- (68) Tan, C.; Xie, J.; Zhang, X.; Cai, J.; Xia, S. Polysaccharide-Based Nanoparticles by Chitosan and Gum Arabic Polyelectrolyte Complexation as Carriers for Curcumin. *Food Hydrocoll.* **2016**, *57*, 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.021>.
- (69) Dos Santos, P. D. F.; Francisco, C. R. L.; Coqueiro, A.; Leimann, F. V.; Pinela, J.; Calhella, R. C.; Porto Ineu, R.; Ferreira, I. C. F. R.; Bona, E.; Gonçalves, O. H. The Nanoencapsulation of Curcuminoids Extracted from: *Curcuma Longa* L. and an Evaluation of Their Cytotoxic, Enzymatic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities. *Food Funct.* **2019**, *10* (2), 573–582. <https://doi.org/10.1039/c8fo02431f>.
- (70) Gaur, P. K.; Mishra, S.; Verma, A.; Verma, N. Ceramide–Palmitic Acid Complex Based Curcumin Solid Lipid Nanoparticles for Transdermal Delivery: Pharmacokinetic and

- Pharmacodynamic Study. *J. Exp. Nanosci.* **2016**, *11* (1), 38–53. <https://doi.org/10.1080/17458080.2015.1025301>.
- (71) Sadegh Malvajerdi, S.; Azadi, A.; Izadi, Z.; Kurd, M.; Dara, T.; Dibaei, M.; Sharif Zadeh, M.; Akbari Javar, H.; Hamidi, M. Brain Delivery of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Preparation, Optimization, and Pharmacokinetic Evaluation. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (1), 728–739. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00510>.
- (72) Ji, H.; Tang, J.; Li, M.; Ren, J.; Zheng, N.; Wu, L. Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles with Brij78 and TPGS Improved *in Vivo* Oral Bioavailability and *in Situ* Intestinal Absorption of Curcumin. *Drug Deliv.* **2016**, *23* (2), 459–470. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.918677>.
- (73) Dolatabadi, S.; Karimi, M.; Nasirizadeh, S.; Hatamipour, M.; Golmohammadzadeh, S.; Jaafari, M. R. Preparation, Characterization and *in Vivo* Pharmacokinetic Evaluation of Curcuminoids-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs). *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *62* (September 2020), 102352. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102352>.
- (74) Haider, M.; Abdin, S. M.; Kamal, L.; Orive, G. Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030288>.
- (75) Wang, P.; Zhang, L.; Peng, H.; Li, Y.; Xiong, J.; Xu, Z. The Formulation and Delivery of Curcumin with Solid Lipid Nanoparticles for the Treatment of on Non-Small Cell Lung Cancer Both *in Vitro* and *in Vivo*. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (8), 4802–4808. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.047>.
- (76) Sun, J.; Bi, C.; Chan, H. M.; Sun, S.; Zhang, Q.; Zheng, Y. Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Have Prolonged *in Vitro* Antitumour Activity, Cellular Uptake and Improved *in Vivo* Bioavailability. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2013**, *111*, 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.06.032>.
- (77) Rafiee, Z.; Nejatian, M.; Daeihamed, M.; Jafari, S. M. Application of Different Nanocarriers for Encapsulation of Curcumin. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59* (21), 3468–3497. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1495174>.
- (78) National Institutes of Health (NIH). (2022). *Dietary Supplement Label Database*. <https://dslod.od.nih.gov/api-guide> (accesado 31 de enero de 2022)
- (79) Blainski, A.; Lopes, G.; de Mello, J. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* **2013**, *18*, 6852–6865, doi:10.3390/molecules18066852.

- (80) Platzer, M.; Kiese, S.; Herfellner, T.; Schweiggert-Weisz, U.; Eisner, P. How does the phenol structure influence the results of the folin-ciocalteu assay? *Antioxidants* **2021**, *10*, 1–13, doi:10.3390/antiox10050811.
- (81) Guija-Poma, E.; Inocente-Camones, M.; Ponce-Pardo, J.; Zarzosa-Norabuena, E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz. Médico* **2015**, *15*, 57–60, doi:10.24265/horizmed.2015.v15n1.08.
- (82) Wilhelm Romero, K.; Quirós, M.I.; Vargas Huertas, F.; Vega-Baudrit, J.R.; Navarro-Hoyos, M.; Araya-Sibaja, A.M. Design of Hybrid Polymeric-Lipid Nanoparticles Using Curcumin as a Model: Preparation, Characterization, and In Vitro Evaluation of Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin-Loaded Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. **2021**, *13*, 4207, doi:10.3390/polym13234207.
- (83) Monrad, J.K.; Howard, L.R.; King, J.W.; Srinivas, K.; Mauromoustakos, A. Subcritical Solvent Extraction of Anthocyanins from Dried Red Grape Pomace. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 2862–2868, doi:10.1021/jf904087n.
- (84) Chao, I.-C.; Wang, C.-M.; Li, S.-P.; Lin, L.-G.; Ye, W.-C.; Zhang, Q.-W. Simultaneous Quantification of Three Curcuminoids and Three Volatile Components of *Curcuma longa* Using Pressurized Liquid Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Molecules* **2018**, *23*, 1568, doi:10.3390/molecules23071568.
- (85) Rungruang, R.; Ratanathavorn, W.; Boohud, N.; Selamassakul, O.; Kaisangsri, N. Antioxidant and anti-aging enzyme activities of bioactive compounds isolated from selected Zingiberaceae plants. *Agric. Nat. Resour.* **2021**, *55*, 153–160, doi:10.34044/j.anres.2021.55.1.20.
- (86) Pal, K.; Chowdhury, S.; Dutta, S.K.; Chakraborty, S.; Chakraborty, M.; Pandit, G.K.; Dutta, S.; Paul, P.K.; Choudhury, A.; Majumder, B.; et al. Analysis of rhizome colour content, bioactive compound profiling and ex-situ conservation of turmeric genotypes (*Curcuma longa* L.) from sub-Himalayan terai region of India. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *150*, 112401, doi:10.1016/j.indcrop.2020.112401.
- (87) Revathy, S.; Elumalai, S.; Benny, M.; Antony, B. Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.) by Column Chromatography. *J. Exp. Sci.* **2011**, *2*, 21–25.
- (88) Sepahpour, S.; Selamat, J.; Manap, M.Y.A.; Khatib, A.; Razis, A.F.A. Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. *Molecules* **2018**, *23*, 1–17, doi:10.3390/molecules23020402.
- (89) Skiba, M.B.; Luis, P.B.; Alfafara, C.; Billheimer, D.; Schneider, C.; Funk, J.L. Curcuminoid Content and Safety-Related Markers of Quality of Turmeric Dietary

- Supplements Sold in an Urban Retail Marketplace in the United States. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, 1800143, doi:10.1002/mnfr.201800143.
- (90) Quirós-Fallas, M.I.; Vargas-Huertas, F.; Quesada-Mora, S.; Azofeifa-Cordero, G.; Wilhelm-Romero, K.; Vásquez-Castro, F.; Alvarado-Corella, D.; Sánchez-Kopper, A.; Navarro-Hoyos, M. Polyphenolic HRMS Characterization, Contents and Antioxidant Activity of *Curcuma longa* Rhizomes from Costa Rica. *Antioxidants* **2022**, *11*, 620, doi:10.3390/antiox11040620.
- (91) Jiang, H.; Somogyi, Á.; Jacobsen, N.E.; Timmermann, B.N.; Gang, D.R. Analysis of curcuminoids by positive and negative electrospray ionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1001–1012, doi:10.1002/rcm.2401.
- (92) Jia, S.; Du, Z.; Song, C.; Jin, S.; Zhang, Y.; Feng, Y.; Xiong, C.; Jiang, H. Identification and characterization of curcuminoids in turmeric using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1521*, 110–122, doi:10.1016/j.chroma.2017.09.032.
- (93) Luaces, P.; Pascual, M.; Pérez, A.G.; Sanz, C. An Easy-to-Use Procedure for the Measurement of Total Phenolic Compounds in Olive Fruit. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1656, doi:10.3390/antiox10111656.
- (94) Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152–178. 10.1016/S0076-687999017-1.
- (95) Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302, doi:10.1021/jf0502698.
- (96) Komonsing, N.; Khuwijtjaru, P.; Nagle, M.; Müller, J.; Mahayothee, B. Effect of drying temperature together with light on drying characteristics and bioactive compounds in turmeric slice. *J. Food Eng.* **2022**, *317*, 110695, doi:10.1016/j.jfoodeng.2021.110695.
- (97) Choi, Y.; Ban, I.; Lee, H.; Baik, M.Y.; Kim, W. Puffing as a novel process to enhance the antioxidant and anti-inflammatory properties of *Curcuma longa* l. (turmeric). *Antioxidants* **2019**, *8*, 2–4, doi:10.3390/antiox8110506.
- (98) Cai, Y.-Z.; Mei Sun; Jie Xing; Luo, Q.; Corke, H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2872–2888, doi:10.1016/j.lfs.2005.11.004.
- (99) Shang, Y.-J.; Qian, Y.-P.; Liu, X.-D.; Dai, F.; Shang, X.-L.; Jia, W.-Q.; Liu, Q.; Fang, J.-G.; Zhou, B. Radical-Scavenging Activity and Mechanism of Resveratrol-Oriented

- Analogues: Influence of the Solvent, Radical, and Substitution. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5025–5031, doi:10.1021/jo9007095.
- (100) Niki, E. Antioxidant Capacity: Which Capacity and How to Assess It? *J. Berry Res.* **2011**, *15*, 1–10, doi:10.3233/BR-2011-018.
- (101) Foti, M.C.; Daquino, C.; Geraci, C. Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH • Radical in Alcoholic Solutions. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2309–2314, doi:10.1021/jo035758q.
- (102) Tamta, A.; Prakash, O.; Punetha, H.; Pant, A.K. Chemical composition and in vitro antioxidant potential of essential oil and rhizome extracts of *Curcuma amada* Roxb. *Cogent Chem.* **2016**, *2*, 1168067, doi:10.1080/23312009.2016.1168067.
- (103) Karmakar, I.; Dolai, N.; Saha, P.; Sarkar, N.; Bala, A.; Haldar, P.K. Scavenging activity of *Curcuma caesia* rhizome against reactive oxygen and nitrogen species. *Orient. Pharm. Exp. Med.* **2011**, *11*, 221–228, doi:10.1007/s13596-011-0030-6.
- (104) Jayaprakasha, G.K.; Jaganmohan Rao, L.; Sakariah, K.K. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chem.* **2006**, *98*, 720–724, doi:10.1016/j.foodchem.2005.06.037.
- (105) Navarro-Hoyos, M.; Alvarado-Corella, D.; Moreira-Gonzalez, I.; Arnaez-Serrano, E.; Monagas-Juan, M. Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts from *Uncaria tomentosa* Bark and Leaves. *Antioxidants* **2018**, *7*, 65, doi:10.3390/antiox7050065.
- (106) Navarro, M.; Arnaez, E.; Moreira, I.; Quesada, S.; Azofeifa, G.; Wilhelm, K.; Vargas, F.; Chen, P. Polyphenolic Characterization, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of *Mangifera indica* Cultivars from Costa Rica. *Foods* **2019**, *8*, 384, doi:10.3390/foods8090384.
- (107) Payton, F.; Sandusky, P.; Alworth, W.L. NMR Study of the Solution Structure of Curcumin. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 143–146, doi:10.1021/np060263s.
- (108) Prasad, D.; Praveen, A.; Mahapatra, S.; Mogurampelly, S.; Chaudhari, S.R. Existence of β -diketone form of curcuminoids revealed by NMR spectroscopy. *Food Chem.* **2021**, *360*, 130000, doi:10.1016/j.foodchem.2021.130000.
- (109) Sadeghi-Ghadi, Z.; Behjou, N.; Ebrahimnejad, P.; Mahkam, M.; Goli, H.R.; Lam, M.; Nokhodchi, A. Improving Antibacterial Efficiency of Curcumin in Magnetic Polymeric Nanocomposites. *J. Pharm. Innov.* **2022**, doi:10.1007/s12247-022-09619-z.
- (110) Sharma, M.; Sharma, S.; Wadhwa, J. Improved uptake and therapeutic intervention of curcumin via designing binary lipid nanoparticulate formulation for oral delivery in

- inflammatory bowel disorder. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2019**, *47*, 45–55, doi:10.1080/21691401.2018.1543191.
- (111) Gupta, U.; Singh, V.; Kumar, V.; Khajuria, Y. Spectroscopic Studies of Cholesterol: Fourier Transform Infra-Red and Vibrational Frequency Analysis. *Mater. Focus* **2014**, *3*, 211–217, doi:10.1166/mat.2014.1161.
- (112) Gopalan, K.; Jose, J. Development of amphotericin b Based organogels against mucocutaneous fungal infections. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **2020**, *56*, doi:10.1590/s2175-97902020000117509.
- (113) Kumara, P.; Mohanb, C.; Uma Shankara, M.K.S.; Gulatia, M. Physiochemical characterization and release rate studies of solid dispersions of Ketoconazole with Pluronic F127 and PVP K-30. *Iran. J. Pharm. Res.* **2011**, *10*, 685–694.
- (114) Hwang, D.; Ramsey, J.D.; Kabanov, A. V. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *156*, 80–118, doi:10.1016/j.addr.2020.09.009.
- (115) Zweers, M.L.T.; Grijpma, D.W.; Engbers, G.H.M.; Feijen, J. The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, *66B*, 559–566, doi:10.1002/jbm.b.10046.
- (116) Jinno, J.; Kamada, N.; Miyake, M.; Yamada, K.; Mukai, T.; Odomi, M.; Toguchi, H.; Liversidge, G.G.; Higaki, K.; Kimura, T. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J. Control. Release* **2006**, *111*, 56–64, doi:10.1016/j.jconrel.2005.11.013.
- (117) Souza, M.P.; Vaz, A.F.M.; Correia, M.T.S.; Cerqueira, M.A.; Vicente, A.A.; Carneiro-da-Cunha, M.G. Quercetin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles for Functional Food Applications. *Food Bioprocess Technol.* **2014**, *7*, 1149–1159, doi:10.1007/s11947-013-1160-2.
- (118) Valencia, M.S.; Silva Júnior, M.F. da; Xavier-Júnior, F.H.; Veras, B. de O.; Albuquerque, P.B.S. de; Borba, E.F. de O.; Silva, T.G. da; Xavier, V.L.; Souza, M.P. de; Carneiro-da-Cunha, M. das G. Characterization of curcumin-loaded lecithin-chitosan bioactive nanoparticles. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **2021**, *2*, 100119, doi:10.1016/j.carpta.2021.100119.
- (119) Yen, F.-L.; Wu, T.-H.; Lin, L.-T.; Cham, T.-M.; Lin, C.-C. Nanoparticles formulation of *Cuscuta chinensis* prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 1771–1777, doi:10.1016/j.fct.2008.01.021.
- (120) Akhlaghi, S.; Rabbani, S.; Alavi, S.; Alinaghi, A.; Radfar, F.; Dadashzadeh, S.; Haeri, A. Green formulation of curcumin loaded lipid-based nanoparticles as a novel carrier for

- inhibition of post-angioplasty restenosis. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *105*, 110037, doi:10.1016/j.msec.2019.110037.
- (121) Gao, J.; Ming, J.; He, B.; Fan, Y.; Gu, Z.; Zhang, X. Preparation and characterization of novel polymeric micelles for 9-nitro-20(S)-camptothecin delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *34*, 85–93, doi:10.1016/j.ejps.2008.01.016.
- (122) Xiong, X.Y.; Tam, K.C.; Gan, L.H. Release kinetics of hydrophobic and hydrophilic model drugs from pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles. *J. Control. Release* **2005**, *103*, 73–82, doi:10.1016/j.jconrel.2004.11.018.
- (123) Vandenhoute, M.; Snoeck, D.; Vanderleyden, E.; De Belie, N.; Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P. Stability of Pluronic® F127 bismethacrylate hydrogels: Reality or utopia? *Polym. Degrad. Stab.* **2017**, *146*, 201–211, doi:10.1016/j.polymdegradstab.2017.10.003.
- (124) Craig, D.Q.. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. *Int. J. Pharm.* **2002**, *231*, 131–144, doi:10.1016/S0378-5173(01)00891-2.
- (125) PubChem. Curcumin Water Solubility. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin#section=Solubility&fullscreen=true> (consultado el 10 de enero del 2021).
- (126) Guo, X.; Li, W.; Wang, H.; Fan, Y.-Y.; Wang, H.; Gao, X.; Niu, B.; Gong, X. Preparation, characterization, release and antioxidant activity of curcumin-loaded amorphous calcium phosphate nanoparticles. *J. Non. Cryst. Solids* **2018**, *500*, 317–325, doi:10.1016/j.jnoncrysol.2018.08.015.
- (127) Jiang, X.; Li, S.; Qiu, X.; Cong, J.; Zhou, J.; Miu, W. Curcumin Inhibits Cell Viability and Increases Apoptosis of SW620 Human Colon Adenocarcinoma Cells via the Caudal Type Homeobox-2 (CDX2)/Wnt/ β -Catenin Pathway. *Med. Sci. Monit.* **2019**, *25*, 7451–7458, doi:10.12659/MSM.918364.
- (128) Han, X.; Guo, L.; Jiang, X.; Wang, Y.; Wang, Z.; Li, D. Curcumin Inhibits Cell Viability by Inducing Apoptosis and Autophagy in Human Colon Cancer Cells. *Proc. Anticancer Res.* **2019**, *3*, doi:10.26689/par.v3i2.982.
- (129) Sahu, P.K.; Sahu, P.K.; Sahu, P.L.; Agarwal, D.D. Structure activity relationship, cytotoxicity and evaluation of antioxidant activity of curcumin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1342–1347, doi:10.1016/j.bmcl.2015.12.013.
- (130) Adeyeni, T.A.; Khatwani, N.; San, K.; Ezekiel, U.R. BMI1 is downregulated by the natural compound curcumin, but not by bisdemethoxycurcumin and dimethoxycurcumin. *Physiol. Rep.* **2016**, *4*, e12906, doi:10.14814/phy2.12906.
- (131) Cao, A.; Li, Q.; Yin, P.; Dong, Y.; Shi, H.; Wang, L.; Ji, G.; Xie, J.; Wu, D. Curcumin induces apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells and colon carcinoma HT-29

- cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis* **2013**, *18*, 1391–1402, doi:10.1007/s10495-013-0871-1.
- (132) Chen, X.; Zhang, T.-Y.; Wu, Y.-C.; Gong, P.-X.; Li, H.-J. Foxtail millet prolamin as an effective encapsulant deliver curcumin by fabricating caseinate stabilized composite nanoparticles. *Food Chem.* **2022**, *367*, 130764, doi:10.1016/j.foodchem.2021.130764.
- (133) Xiao, J.; Nian, S.; Huang, Q. Assembly of kafirin/carboxymethyl chitosan nanoparticles to enhance the cellular uptake of curcumin. *Food Hydrocoll.* **2015**, *51*, 166–175, doi:10.1016/j.foodhyd.2015.05.012.
- (134) Jyoti, K.; Bhatia, R.K.; Martis, E.A.F.; Coutinho, E.C.; Jain, U.K.; Chandra, R.; Madan, J. Soluble curcumin amalgamated chitosan microspheres augmented drug delivery and cytotoxicity in colon cancer cells: In vitro and in vivo study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *148*, 674–683, doi:10.1016/j.colsurfb.2016.09.044.
- (135) Wang, P.; Zhang, L.; Peng, H.; Li, Y.; Xiong, J.; Xu, Z. The formulation and delivery of curcumin with solid lipid nanoparticles for the treatment of on non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 4802–4808, doi:10.1016/j.msec.2013.07.047.
- (136) Low, L.E.; Tan, L.T.-H.; Goh, B.-H.; Tey, B.T.; Ong, B.H.; Tang, S.Y. Magnetic cellulose nanocrystal stabilized Pickering emulsions for enhanced bioactive release and human colon cancer therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *127*, 76–84, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.037.
- (137) Chuah, L.H.; Roberts, C.J.; Billa, N.; Abdullah, S.; Rosli, R. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *116*, 228–236, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.01.007.
- (138) Jiang, H.; Geng, D.; Liu, H.; Li, Z.; Cao, J. Co-delivery of etoposide and curcumin by lipid nanoparticulate drug delivery system for the treatment of gastric tumors. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 3665–3673, doi:10.1080/10717544.2016.1217954.