

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**DESARROLLO DE MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON PRODUCTOS
BIOLÓGICOS**

Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Mecánico

AUTOR:

MARCO ANTONIO TEJADA CARDEÑA

ASESOR:

FERNANDO GILBERTO TORRES GARCIA

Lima, mayo de 2023

Informe de Similitud

Yo, Fernando Gilberto Torres García, docente de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor de la tesis titulado DESARROLLO DE MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON PRODUCTOS BIOLÓGICOS del autor MARCO ANTONIO TEJADA CARDEÑA.

dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 18%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 12/05/2023.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de Suficiencia Profesional, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha: 26 de junio de 2023

Torres García, Fernando Gilberto	
DNI: 07879100	
ORCID: 0000-0002-3123-266X	

RESUMEN

La baja solubilidad acuosa de productos biológicos como la curcumina es un problema que limita su uso terapéutico en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades y que puede ser superado al cargar estos productos en nanopartículas de almidón.

El objetivo principal de la presente tesis es desarrollar métodos de fabricación de nanopartículas cargadas con curcumina. Primero, se obtuvo almidón de papas comerciales de la variedad Huamantanga. Además, se fabricaron nanopartículas de almidón cargadas con curcumina mediante nanoprecipitación, método que requiere una fase solvente para disolver el almidón y una fase no solvente para la formación de las nanopartículas. Posteriormente, se caracterizaron las nanopartículas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), dispersión dinámica de luz (DLS), calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis). Finalmente, se evaluó el efecto de la urea y el tripolifosfato de sodio (STPP) en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas fabricadas.

Se obtuvo que los rendimientos de extracción de las nanopartículas de almidón con y sin carga de curcumina están entre 94.26 y 56.71 %. Los tamaños de las nanopartículas fabricadas están entre 46 y 74 nm y los índices de polidispersidad entre 0.213 y 0.386, lo que demuestra una distribución de tamaño homogénea.

Se logró desarrollar los métodos de fabricación de nanopartículas cargadas con curcumina que permitieron cargar la curcumina dentro de las nanopartículas de almidón y se determinó que la formulación óptima está compuesta de 0.15 g de urea y 0.4 g de STPP por presentar la más alta eficiencia de carga, 86 %, y el más bajo índice de polidispersidad, 0.238. Los resultados expuestos servirán como base para el desarrollo de materiales con aplicaciones biomédicas a partir de recursos naturales.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Mary Cardeña y Marco Tejada Cáceres, quienes me han apoyado y alentado durante mi desarrollo profesional y académico.

Al Dr. Fernando G. Torres, por la asesoría brindada y paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales de la Sección Ingeniería Mecánica de la Pontificia Universidad Católica del Perú, por hacer posible la elaboración de este documento con sus equipos.

Al Centro de Caracterización de Materiales de la Pontificia Universidad Católica del Perú (CAM-PUCP) por su apoyo en las facilidades para la caracterización de especímenes mediante el espectrofotómetro UV-Vis.

A los miembros del grupo POLYCOM por su amistad y motivación para finalizar el proyecto.

Este trabajo fue financiado por el CONCYTEC-PROCIENCIA en el marco de la convocatoria E063-201901.BM. Proyecto titulado “Sistemas de fabricación avanzada de nanopartículas de almidón a partir de fuentes nativas peruanas para la liberación controlada de productos biológicos” con N° de contrato 05-2020-FONDECYT-BM.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	3
Agradecimientos	4
Introducción	7
Capítulo 1 Marco Teórico.....	10
1.1 Biopolímeros	10
1.1.1 Almidón	12
1.2 Productos biológicos	15
1.2.1 Curcumina.....	16
1.3 Nanopartículas.....	18
1.4 Propiedades físicas de las nanopartículas.....	20
1.4.1 Tamaño de las partículas.....	22
1.4.2 Carga superficial	23
1.4.3 Eficiencia de carga y capacidad de carga	27
1.5 Nanopartículas a base de biopolímeros.....	27
1.5.1 Nanopartículas de almidón	29
1.6 Sistemas de nanopartículas de almidón cargados con curcumina.....	33
Capítulo 2 Métodos experimentales.....	38
2.1 Obtención de almidón	38
2.1.1 Materiales y reactivos	38
2.1.2 Procedimiento	39
2.2 Fabricación de nanopartículas de almidón por nanoprecipitación	40
2.2.1 Materiales y reactivos	40
2.2.2 Procedimiento	41
2.3 Fabricación de sistemas de nanopartículas cargadas con productos biológicos	46
2.3.1 Materiales y reactivos	46
2.3.2 Procedimiento	47
2.4 Lista de nanopartículas de almidón fabricadas mediante nanoprecipitación	51

2.5	Técnicas de caracterización.....	51
2.5.1	Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	51
2.5.2	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	53
2.5.3	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	55
2.5.4	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	58
2.5.5	Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis).....	58
Capítulo 3	Análisis y discusión de resultados.....	61
3.1	Porcentajes de rendimiento de almidón	61
3.2	Porcentaje de rendimiento de las nanopartículas de almidón	61
3.3	Resultados	64
3.3.1	Caracterización del tamaño de las nanopartículas	64
3.3.2	Eficiencia de carga y capacidad de carga de los sistemas de nanopartículas cargadas con curcumina.....	66
3.3.3	Caracterización de las nanopartículas de almidón mediante FTIR-ATR	69
3.3.4	Caracterización térmica de las nanopartículas	74
3.3.5	Caracterización de las nanopartículas de almidón por AFM	79
3.3.6	Solubilidad de los sistemas	80
Conclusiones	81
Bibliografía	83

INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son productos naturales que se encuentran comúnmente en verduras, frutas y cereales. Un polifenol que ha demostrado su eficacia como compuesto anticancerígeno es la curcumina, extraído de rizomas de la planta *Curcuma Longa* (Deng et. al, 2020).

Uno de los problemas con la administración oral de la curcumina es su baja biodisponibilidad la cual es causada por su baja solubilidad en el agua. Esta característica reduce su eficacia terapéutica a nivel clínico. Además, se ha reportado que la curcumina se degrada al estar expuesto en solución acuosa con condiciones de pH fisiológico y a la luz ultravioleta (Miskeen et. al, 2021).

Una de las estrategias para mejorar la solubilidad acuosa y estabilidad de la curcumina, superar la baja biodisponibilidad de la curcumina, y mejorar el efecto terapéutico en células objetivo es el uso de nanopartículas poliméricas como portadores de la curcumina (Li et. al, 2015; Deljoo et al., 2019). Las nanopartículas de almidón se han empleado para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de la curcumina (Troncoso y Torres, 2020). Sin embargo, aún no se ha reportado un estudio de las nanopartículas de almidón, obtenido de papa nativa comercial del Perú, cargadas con curcumina fabricadas por nanoprecipitación.

Por lo expuesto, se propone el desarrollo de métodos de fabricación de nanopartículas de almidón, polímero extraído de *Solanum tuberosum ssp. Andigena var Huamantanga*, cargadas con curcumina mediante nanoprecipitación y se identificará la fórmula óptima para fabricar sistemas cargados a partir del estudio de la influencia de la urea y el tripolifosfato de sodio en las propiedades fisicoquímicas de dichos sistemas como el tamaño, la eficiencia de carga y la capacidad de carga.

La presente tesis podrá contribuir con el desarrollo de un nuevo enfoque que aprovecha la nanotecnología para aplicaciones biomédicas. El tamaño del mercado mundial de la nanotecnología en medicina, o nanomedicina, fue valorado aproximadamente en 171 695 millones de dólares en 2020 y se proyecta que alcance 393 046 millones de dólares en 2030 (Allied Market Research, 2022). Así mismo, el mercado mundial de polifenoles se valoró en 1600 millones US\$ en el año 2021 y se prevé su crecimiento por la prevalencia de las enfermedades crónicas como la diabetes, el aumento de la población geriátrica y la conciencia de los consumidores sobre la salud debido a los efectos del Covid-19 (Grand View Research, 2022).

Se encuentra en constante investigación las nanopartículas de almidón como sistemas de administración de polifenoles, como la curcumina, por la biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad y la abundante disponibilidad del almidón. Así mismo, se ha demostrado la mejora de la solubilidad de la curcumina y la protección de la degradación del polifenol al ser cargado por las nanopartículas de almidón (Miskeen et. al, 2021).

Se detallará la metodología de fabricación de las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina y se mostrarán los resultados de la caracterización de las nanopartículas a través de técnicas que incluyen a la Dispersión dinámica de luz (DLS), calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia ultravioleta-visible y la microscopía de fuerza atómica (AFM).

Objetivo General

El objetivo general de la presente tesis es desarrollar métodos de fabricación de nanopartículas cargadas con curcumina

Objetivos específicos

- Revisar el estado de arte de la fabricación de nanopartículas de almidón cargadas con curcumina
- Elaborar un diseño experimental de métodos de fabricación de las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina
- Extraer el almidón de papas comerciales de la variedad Huamantanga
- Fabricar nanopartículas de almidón mediante la técnica de nanoprecipitación
- Fabricar nanopartículas de almidón cargadas con curcumina mediante nanoprecipitación
- Analizar el efecto de los aditivos utilizados sobre propiedades de las nanopartículas fabricadas
- Caracterizar las nanopartículas fabricadas mediante dispersión dinámica de luz (DLS)
- Cuantificar la eficiencia de carga y capacidad de carga de las nanopartículas cargadas con curcumina mediante espectroscopia ultravioleta-visible
- Caracterizar las nanopartículas fabricadas mediante reflectancia total atenuada en conjunto con espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR-ATR)
- Caracterizar térmicamente las nanopartículas fabricadas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)
- Caracterizar morfológicamente las nanopartículas fabricadas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

1.1 Biopolímeros

Los polímeros naturales, o también llamados biopolímeros, son cadenas largas de unidades repetitivas unidas por enlaces covalentes, fabricadas por organismos vivos. Los biopolímeros se pueden extraer de algas, bacterias, plantas, animales y otras fuentes naturales (Carsí et al., 2019; Gonzales et al., 2020; Sanchis, Carsí, Gómez, et al., 2017; F. G. Torres et al., 2011). La ventaja de los biopolímeros, frente a los polímeros sintéticos convencionales, se debe a ciertas características propias del material como su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad (Abdul Khalil et al., 2017). Debido a las mencionadas características, la administración de fármacos, el apósito para heridas, ingeniería de tejidos, sensores biomédicos, matrices tisulares quirúrgicas, entre otros, son prometedoras aplicaciones de los biopolímeros en el campo de la medicina (Biswas et. al, 2021). La Figura 1 representa gráficamente las aplicaciones médicas de los biopolímeros. La primera aplicación mencionada consiste en la administración del fármaco al sitio de acción dentro del organismo a través de diversas rutas (oral, parenteral, transdérmica, tópica, entre otras) para conseguir su efecto terapéutico. Un sistema de administración de fármacos es una formulación que permite la introducción de dicha sustancia terapéutica en el cuerpo y mejora su eficacia y seguridad al controlar la velocidad, tiempo y lugar de liberación del fármaco (Bruschi, 2015). Los sistemas de administración controlada de fármacos son capaces de liberar el fármaco en lugares específicos del cuerpo y están compuestos por el agente terapéutico, la matriz portadora y la fracción de orientación (Maghsoudi et. al, 2017). La liberación del agente terapéutico puede desencadenarse por diversos estímulos, como los físicos (sonoforesis, temperatura, luz, campo magnético o campo eléctrico), químicos (bioquímicos, hipoxia o pH), ambientales o la combinación de más de un estímulo (Biswas et. al, 2021). El desarrollo de un sistema de administración se puede lograr con una conjugación exitosa entre un agente terapéutico y un vehículo de administración de

fármacos. Sin embargo, el acoplamiento de un fármaco con un vehículo de administración depende de la estructura química, ya sea hidrofílica o hidrofóbica, de las moléculas del fármaco. Por lo tanto, es necesario un diseño racional de un vehículo de administración de fármacos para que la conjugación tenga éxito. Las microcápsulas, microesferas, nanocápsulas, nanoesferas, conjugaciones de polímero-fármaco, micelas, liposomas e hidrogeles son tipos de sistemas de administración de fármacos (Biswas et. al, 2021). Un sistema de administración de nanopartículas es un sistema en el que se utilizan transportadores de escala nanométrica para cargar o adsorber compuestos bioactivos, ya sea para mejorar su absorción en el tracto gastrointestinal mediante endocitosis activa o para mejorar la bioactividad en la circulación corporal mediante una orientación específica (Qiu et. al, 2016).

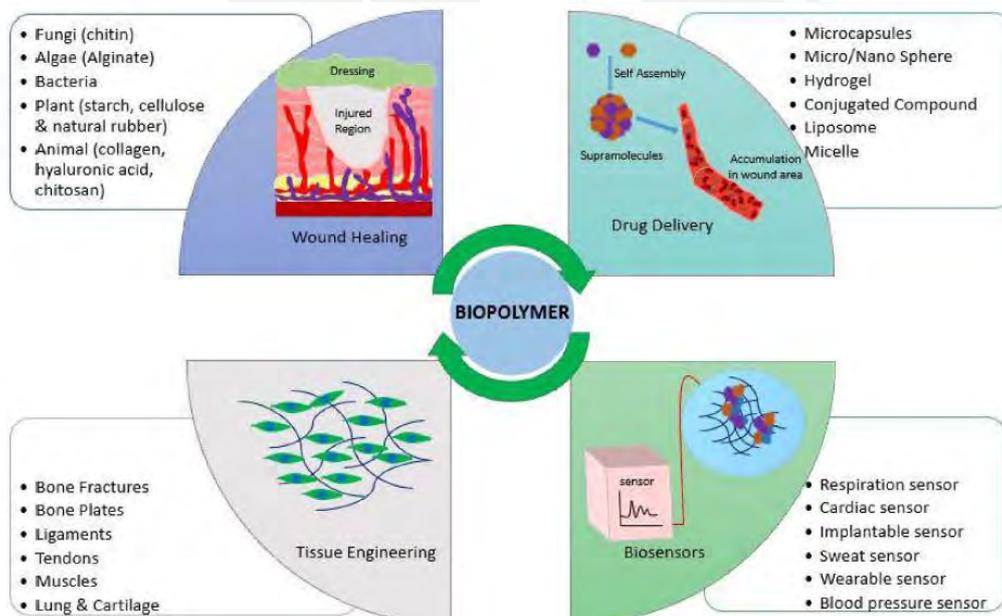


Figura 1 Aplicaciones de los biopolímeros en el campo de la medicina

Tomado de "Recent Advancement of Biopolymers and Their Potential Biomedical Applications" por Biswas et.

al (2021)

1.1.1 Almidón

El almidón es un biopolímero semicristalino que está compuesto por 2 macromoléculas conocidas como la amilosa y la amilopectina (Figura 2) (Torres et. al, 2011). La amilosa se caracteriza por ser un polisacárido lineal, mientras que la amilopectina es ramificada y representa principalmente el dominio cristalino del gránulo de almidón que es caracterizada por las cadenas ordenadas y empaquetadas. Los gránulos de almidón nativo consisten en laminillas cristalinas, laminillas amorfas y un material amorfo de fondo compuesto de amilosa y amilopectina en una configuración desordenada (Figura 3). Las laminillas cristalinas están compuestas de cadenas cortas de doble hélice de amilopectina, y las laminillas amorfas de puntos de ramificación de la amilopectina y algunas moléculas de amilosa (Protserov et. al, 2002).

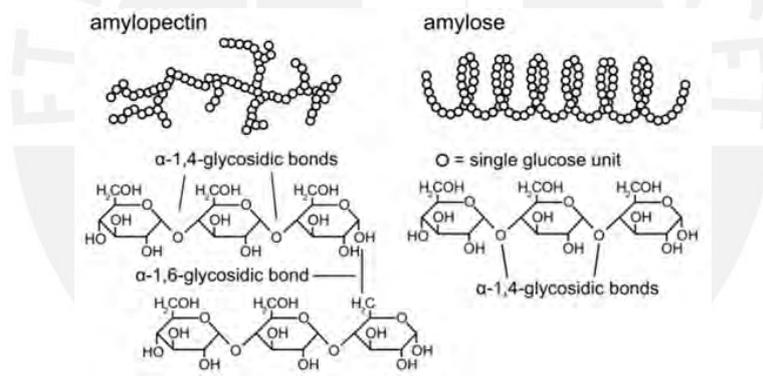


Figura 2 Forma y estructura química de la amilopectina y la amilosa

Tomado de "Printable acid-modified corn starch as non-toxic, disposable hydrogel-polymer electrolyte in supercapacitors", por Willfahrt et. al. (2019)

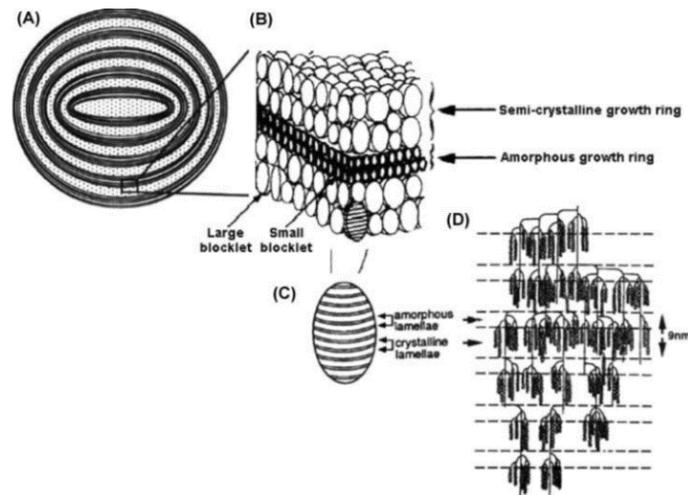


Figura 3 Estructura del gránulo de almidón que muestra aros de crecimiento semicristalinos y amorfos (A) que consisten de una pila de bloques grandes y pequeños (B), las cuales están compuestas de laminillas amorfas y cristalinas de amilopectina (C). Se ubican las dobles hélices alineadas en las laminillas cristalinas y los puntos de ramificación de la amilopectina en las laminillas amorfas (D)

Tomado de “Application of ultra high pressure (UHP) in starch chemistry”, por Kim et. al. (2012)

El almidón se puede extraer de fuentes botánicas comerciales como el maíz, el trigo, la papa y la yuca, y de fuentes no convencionales como las variedades nativas de las papas cultivadas en el territorio peruano (Troncoso y Torres, 2020). La relación de amilosa y amilopectina varía con la fuente botánica de la cual es extraída el almidón (Torres et al., 2018).

Los almidones nativos como el almidón extraído de la papa contienen pequeñas cantidades de grupos fosfato enlazados al C-3 y C-6 de las unidades de glucosa correspondientes a la amilopectina (Nazarian-Firouzabadi y Visser, 2017; Xu et. al, 2017). Además, Torres et. al (2018) reportaron que los gránulos de almidón de papa tenían forma elíptica con una superficie lisa (Figura 4).

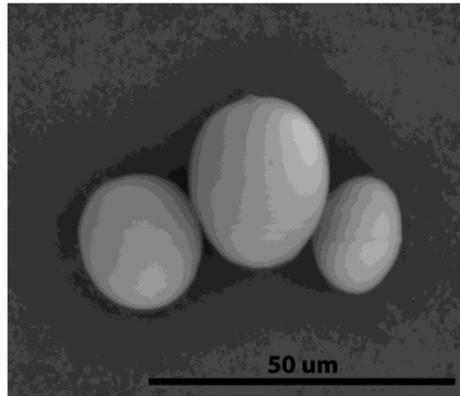


Figura 4 Forma del gránulo de almidón

Tomado de “Tailoring the properties of native Andean potato starch nanoparticles using acid and alkaline treatments”, por Torres et al, 2018)

El almidón es soluble en soluciones altamente alcalinas (Farrag et. al, 2018). Sin embargo, a pesar de que el almidón es hidrofílico por la abundancia de los grupos hidroxilo, es poco soluble en agua fría ya que las moléculas del agua no perturban los enlaces de hidrógeno que operan entre las cadenas de los polisacáridos (Guo et. al, 2017). Roberts y Cameron (2002) mencionan que los gránulos de almidón no se disuelven en agua fría por la integridad de su estructura cristalina.

Los gránulos de almidón al ser calentados con presencia de agua o al ser suspendidos en una solución alcalina, experimentan la gelatinización, el cual provoca el hinchamiento de los gránulos, la liberación de la amilosa y la amilopectina y la formación de una pasta de almidón (Torres et. al, 2011; Torres et. al, 2019; Sintov y Yariv, 2022). Además, luego de la gelatinización, puede ocurrir la retrogradación que consiste en la reasociación de las moléculas de amilosa y amilopectina con el tiempo y la cristalización de agrupaciones de doble hélice. Es decir, la retrogradación permite la transición de un estado amorfo a un estado más ordenado (Sintov y Yariv, 2022, Liu et. al, 2007).

La técnica de obtención del almidón influye en las propiedades del almidón como la temperatura de gelatinización, la retrogradación, la viscosidad, entre otras (Troncoso y Torres, 2020).

El almidón ha sido usado en aplicaciones biomédicas como implantes de sustitución ósea, apósito para heridas, sistemas de administración de fármacos, sustratos para cultivo de células, entre otros (Torres et. al, 2011; Torres et. al, 2013).

1.2 Productos biológicos

Los productos biológicos son moléculas complejas producidas por organismos vivos que se utilizan en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Los polifenoles, los terpenoides, esteroides cardiotónicos y los polisacáridos son ejemplos de productos biológicos, los cuales difieren de los medicamentos sintéticos en la frecuencia de aparición de diferentes átomos, radicales y configuraciones espaciales (Deng et al., 2020). Los polifenoles son productos biológicos que se encuentran presentes en las plantas y se dividen por su estructura química en ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, flavonoides, curcuminoides entre otros (Cione et al., 2020).

Mucho de los ingredientes farmacéuticos activos (APIs) están preparados en su forma cristalina y se caracterizan por presentar propiedades fisicoquímicas que no cambian durante un almacenamiento prolongado. Sin embargo, son poco solubles en el agua y, por esa razón, su biodisponibilidad está muy limitada. Más del 75% de los candidatos a fármacos y el 40% de los fármacos comercializados son poco solubles en agua (Grzybowska et. al, 2016).

Una forma prometedora de superar este inconveniente es transformar los productos farmacéuticos cristalinos a su estado amorfo pero la desventaja de los APIs amorfos es que pueden incluso volver rápidamente a sus formas cristalinas, lo que puede ocurrir durante la fabricación, el almacenamiento o disolución (Grzybowska et. al, 2016).

Una solución es la fabricación de nanopartículas a base de polímeros para cargar los fármacos ya que se puede cambiar el estado cristalino de los fármacos a amorfo y obtener partículas con mayor solubilidad y gran estabilidad de almacenamiento (Li et al, 2016; El-Naggar et. al, 2015; Rutkaite et. al, 2012; Acevedo-Guevara et. al, 2018; Pathak et. al, 2015), el cual se puede comprobar a través de las técnicas de DSC, FTIR y XRD.

1.2.1 Curcumina

La curcumina es un polifenol natural que se extrae de los rizomas de la cúrcuma, o científicamente denominado como *Curcuma longa*, el cual pertenece a la familia Zingiberaceae (Chin et al., 2014). La curcumina extraída en forma de polvo es de color amarillo anaranjado. La curcumina pertenece al grupo curcuminoide y su fórmula molecular es $C_{21}H_{20}O_6$ (Sun et al., 2013). La estructura química de la curcumina se muestra en la Figura 5. Además, la curcumina es un polifenol cristalino cuya temperatura de fusión es aproximadamente $180^{\circ}C$ (Rachmawati et. al, 2013). Se ha reportado que los cristales de la curcumina tienen la forma de varillas cilíndricas (Athira y Jyothi, 2015; Miskeen et. al, 2021). Lestari e Indrayante (2014) reportaron que la curcumina es estable hasta $70^{\circ}C$ por 10 minutos, pero a $100^{\circ}C$ empieza a descomponerse y su degradación incrementa.

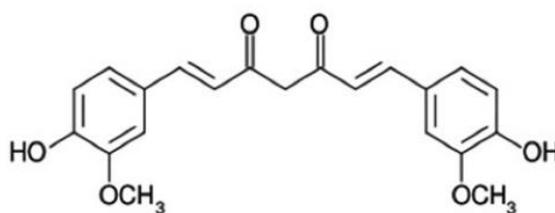


Figura 5. Estructura química de la curcumina

Tomado de "Alkaline-based curcumin extraction from selected zingiberaceae for antimicrobial and antioxidant activities", por Othman et al., 2019

La curcumina es soluble en solventes como el etanol, metanol, acetona y dimetilsulfóxido, pero es poco soluble en el agua debido a su naturaleza cristalina y a la alta hidrofobicidad de la

curcumina (Li et. al, 2016). La hidrofobicidad de la curcumina es causada por la cadena de alqueno conjugada y la ausencia de un fuerte grupo polar (Jagannathan et. al, 2012; Lee et. al, 2013; Hazra et. al, 2014). Así mismo, los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares presentes en la curcumina en fase cristalina inhibe la disolución acuosa de la curcumina (Li et. al, 2016). Mohanty et. al (2012) indicó que la solubilidad acuosa de la curcumina es 0.0004 mg/ml a pH 7.4.

La curcumina es generalmente conocido como seguro (GRAS) según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Kotha y Luthria, 2019). La curcumina exhibe propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antineoplásicas y quimiopreventivas; sin embargo, uno de los problemas con la administración oral del producto biológico es su baja solubilidad en el agua. Cuando un fármaco es administrado oralmente en una forma de dosificación sólida, ya sea por tableta o cápsula, este debe primero disolverse en los fluidos gastrointestinales antes de ser absorbido y llegar al torrente sanguíneo, desde donde procede a ejercer su efecto en el organismo (Dunne et. al, 1999; Savjani et. al, 2012). La curcumina administrada al ser poco soluble en el agua no es absorbida adecuadamente en el intestino, lo que causa la excreción de la mayor parte a través de las heces. La proporción de la curcumina absorbida por el organismo sufre un rápido metabolismo por el hígado y el plasma, lo que ocasiona la conversión de la curcumina en sus metabolitos hidrosolubles (glucoronidos y sulfatos), los cuales son excretados por la orina (Mohanty et al., 2012; Liu et al., 2016). Es decir, la baja solubilidad de la curcumina en el agua causa una baja absorción, rápido metabolismo y rápida excreción de la curcumina en el organismo, y por consiguiente su biodisponibilidad es baja (Mohanty et al., 2012; Liu et al., 2016). La Figura 6 representa gráficamente la baja biodisponibilidad de la curcumina explicado anteriormente. Estudios clínicos demuestran que una dosis oral única elevada de hasta 12 g/día de curcuminoides son bien tolerados (Kotha y Luthria, 2019).

Se requiere que un fármaco candidato tenga una solubilidad superior a $10\mu M$ con la finalidad de facilitar las pruebas preclínicas (Fink et. al, 2020). La curcumina tiene una solubilidad de $1.09\mu M$.

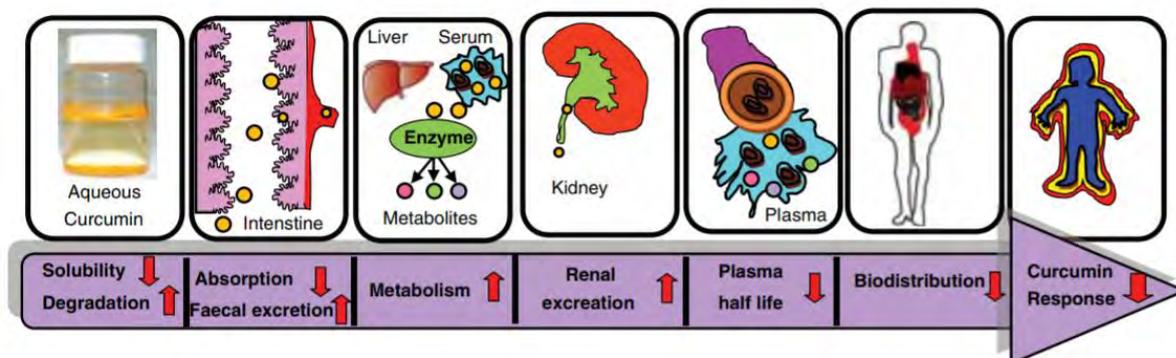


Figura 6 Obstáculos asociados a la administración de curcumina que causa una baja biodisponibilidad y reducida eficacia terapéutica a nivel clínico

Tomado de "Emerging role of nanocarriers to increase the solubility and bioavailability of curcumin" por Mohanty et al., 2012)

1.3 Nanopartículas

En general, las nanopartículas se refieren a las partículas con dimensiones entre 1 y 100 nm. Sin embargo, las partículas con dimensiones menor a $1\mu m$ son comúnmente denominadas como nanopartículas en el campo de la farmacia y la medicina (Wu et. al, 2011, El-Naggar et. al, 2015).

Las nanopartículas pueden ser usados como vehículos de administración de fármacos, agentes de diagnóstico por imagen, genes, proteínas y péptidos. La incorporación de los fármacos en las nanopartículas ya sea en su núcleo o superficie, mejoran la solubilidad del agua, la estabilidad y permeabilidad del fármaco. Además, las nanopartículas aportan ventajas en pediatría porque podrían reducir la dosis de los fármacos antineoplásicos y sus efectos secundarios (Nieto et. al ,2021).

En comparación con las micropartículas, las nanopartículas tienen mayor relación superficie/volumen, tal y como se demuestra en la Figura 7 (Wu et. al, 2011; El-Naggar et. al, 2015). Las nanopartículas es que son más adecuadas para la administración intravenosa que las micropartículas ya que las nanopartículas distribuidas en el torrente sanguíneo deben ser significativamente menor de 5 μm , sin formar aglomerados, para no causar un bloqueo capilar y embolismo (Singh y Lillard Jr, 2009; Wu et. al, 2011). A medida que el tamaño de un material se disminuye hasta la escala nanométrica, aumenta la energía superficial. Una mayor energía superficial significa una condición energética desfavorable o inestable. Por esa razón, las nanopartículas se aglomeran o adsorben moléculas de sus alrededores para reducir la energía superficial y ser más estables (Tsuda y Konduru, 2016).

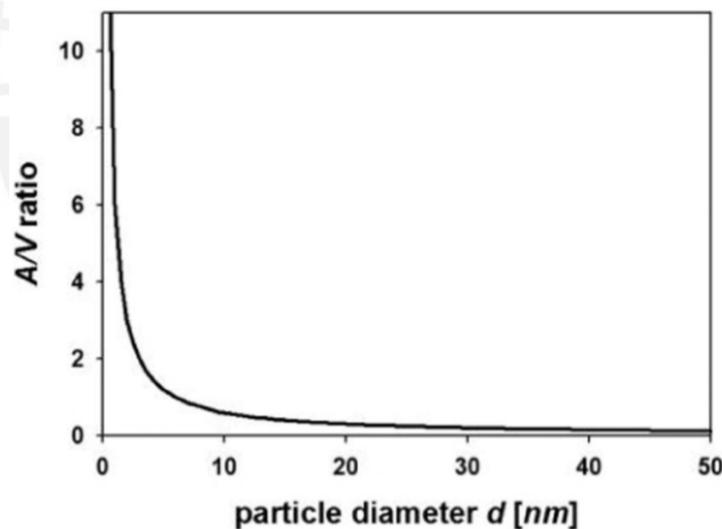


Figura 7 La relación superficie-volumen en función del diámetro de partículas esféricas

Tomado de "The role of natural processes and surface energy of inhaled engineered nanoparticles on aggregation and corona formation" por Tsuda y Konduru (2016)

Según las características fisicoquímicas de las nanopartículas, estas pueden ser clasificadas en nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas metálicas, nanopartículas

cerámicas, nanopartículas semiconductoras y nanopartículas de carbono. Los materiales usados para fabricar las nanopartículas poliméricas y lipídicas les confieren a las partículas biocompatibilidad, biodegradabilidad, no inmunogenicidad, no toxicidad, y una alta eficiencia de carga del fármaco. Las nanopartículas poliméricas y lipídicas (Figura 8) son las más aprobadas clínicamente en la terapia (Nieto et. al ,2021). Las nanopartículas poliméricas fabricadas a partir de polímeros naturales y sintéticos han recibido la mayor parte de la atención debido a su estabilidad y facilidad de modificación de la superficie. Además, pueden ser hechas a medida para lograr una liberación controlada del fármaco y una localización específica de la enfermedad ajustando las características del polímero (Singh y Lillard Jr, 2009).

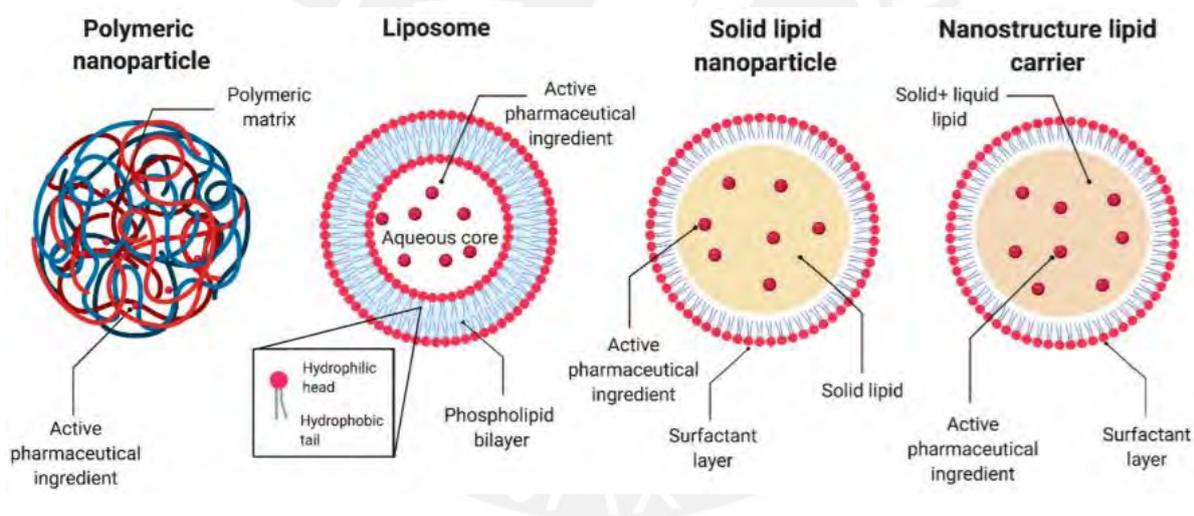


Figura 8 Esquema representativo de las nanopartículas poliméricas y lipídicas aplicadas como sistemas de administración de fármacos

Tomado de "Polymeric and Lipid Nanoparticles: Which Applications in Pediatrics?" por Nieto et. al (2021)

1.4 Propiedades físicas de las nanopartículas

El tamaño, la forma y la carga superficial son propiedades físicas de las nanopartículas.

La carga superficial y la hidrofobicidad son propiedades de la superficie de las nanopartículas, las cuales influyen en la estabilidad de las partículas e interacción con las células (Zahin et. al,

2020). La estabilidad es uno de los aspectos fundamentales para garantizar la seguridad y eficacia de los productos farmacéuticos (Wu et. al, 2011). Por esa razón, es necesario controlar la estabilidad y el tamaño de las nanopartículas fabricadas para el transporte del fármaco correspondiente. La Figura 9 muestra una representación gráfica de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas.

Los tamaños de las partículas, las cualidades de la superficie y las propiedades de las nanopartículas pueden ser fabricadas o controladas por los métodos sintéticos en función de su aplicación final (Jacob et. al, 2018).

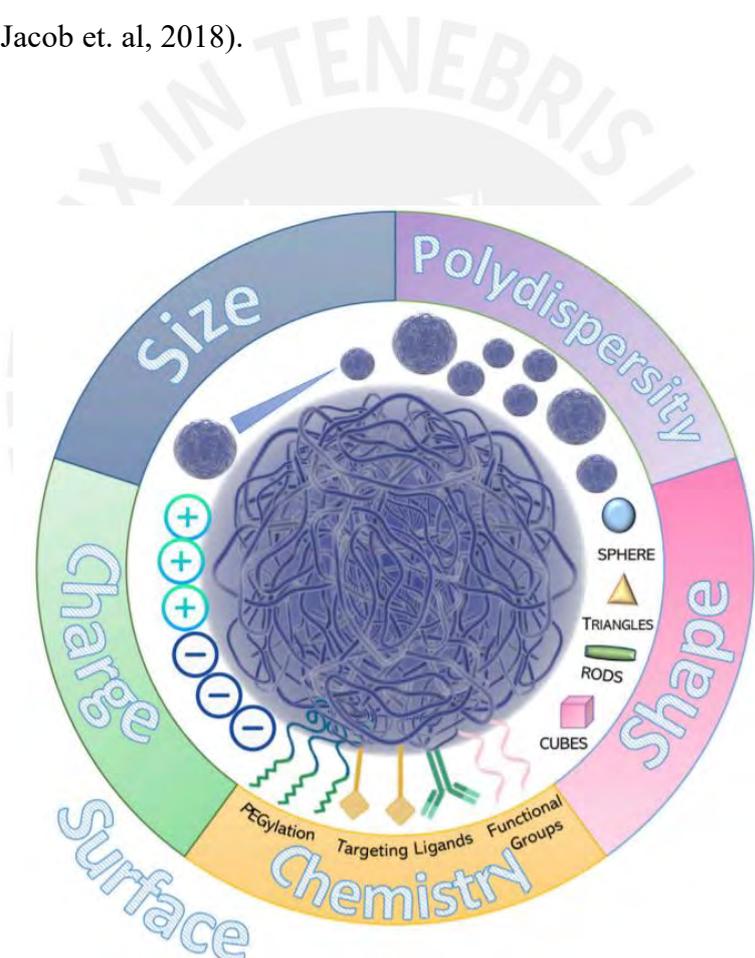


Figura 9 Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas

Tomado de "Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors" por Gagliardi et. al

(2021)

1.4.1 Tamaño de las partículas

El tamaño de las partículas y la distribución de los tamaños determinan la distribución in vivo, el destino biológico, toxicidad y capacidad de focalización de las nanopartículas como sistemas de administración. Las nanopartículas pueden ser extravasados a través del endotelio y epitelio, de los tumores, o pueden penetrar microcapilares (Singh y Lillard Jr, 2009).

Una distribución del tamaño de la partícula monodispersa y controlada es importante para aplicaciones farmacéuticas o biomédicas (Gutiérrez et al., 2020). Además, una distribución estrecha de las dimensiones de las partículas garantiza que el fármaco administrado por todas ellas tenga el mismo destino biológico (Zhang et. al, 2004). Según Gaumet et al. (2008), las nanopartículas deben ser más pequeños que un tamaño límite para poder atravesar el endotelio y, así, poder penetrar en los tumores de distintas zonas del cuerpo.

Las partículas al ser más pequeñas tienen mayor relación área superficial/volumen, por lo tanto, la mayoría del fármaco asociado con las partículas estarían en o cerca de su superficie, permitiendo una liberación más rápida del fármaco. Además, hay mayor riesgo de aglomeración durante el almacenamiento, transporte y dispersión. Por otro lado, las partículas con mayor tamaño al permitir cargar más fármaco por tener mayor núcleo presentan una liberación más lenta. Por lo tanto, el control del tamaño de las partículas proporciona un medio para ajustar las tasas de liberación del fármaco (Singh y Lillard Jr, 2009).

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) determina el diámetro hidrodinámico, la distribución del tamaño y el índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas (Bhatia, 2016; Torres et al., 2019).

Un gráfico de intensidad versus tamaño de la partícula y el índice de polidispersidad otorgan información sobre la distribución del tamaño de las partículas en una muestra. En dicho gráfico se puede visualizar una distribución monodispersa (distribución estrecha) o polidispersa

(distribución amplia). Además, se puede visualizar si hay una o más poblaciones (grupos de tamaño) de partículas. El índice de polidispersidad puede tomar valores desde 0 hasta 1. Valores menores a 0.1 puede ser un indicador de gran homogeneidad (monodispersidad) en la población de las partículas, mientras que altos valores indican polidispersidad o incluso presencia de varias poblaciones (Gaumet et al., 2008). Un valor de PDI de 0.1 a 0.25 indica una estrecha distribución de tamaños, mientras que un valor superior a 0.5 indica una amplia distribución (Wu et. al, 2011; El-Feky et. al,2015).

Las nanopartículas con tamaño promedio menor a 200 nm pueden ser usados para transportar sustancias activas para mejorar su absorción (Qiu et. al, 2016).

1.4.2 Carga superficial

La carga superficial es una propiedad física de las nanopartículas comúnmente estimada por la técnica del potencial zeta, el cual permite entender la estabilidad física de las nanosuspensiones (Singh y Lillard Jr, 2009; Joseph y Singhvi, 2019).

El potencial zeta ζ es el potencial electrocinético en el plano (o límite) de deslizamiento (slipping plane) de una partícula que se mueve bajo un campo eléctrico. Cuando una partícula cargada es dispersada, una doble capa adsorbida o doble capa eléctrica (EDL), conformada por la capa Stern y la capa difusa, se desarrolla en su superficie. La capa Stern es la capa interior que consiste principalmente de iones o moléculas con carga opuesta a la de la partícula, mientras que la capa difusa o capa Gouy, ubicada encima de la capa Stern, está formada por iones o moléculas con carga igual y opuesta (Bhattacharjee, 2016; Wu et. al, 2011). El periférico a la capa Stern es el plano de deslizamiento (Nutan y Reddy, 2010). La Figura 10 muestra la representación gráfica de la doble capa eléctrica. El movimiento de las partículas cargadas con su doble capa adsorbida hacia el electrodo opuesto al aplicar un campo eléctrico a una dispersión es conocido como electroforesis, la cual es representada gráficamente en la

Figura 11. Durante la electroforesis, el plano de deslizamiento es la interfase entre el dispersante y las partículas cargadas móviles.

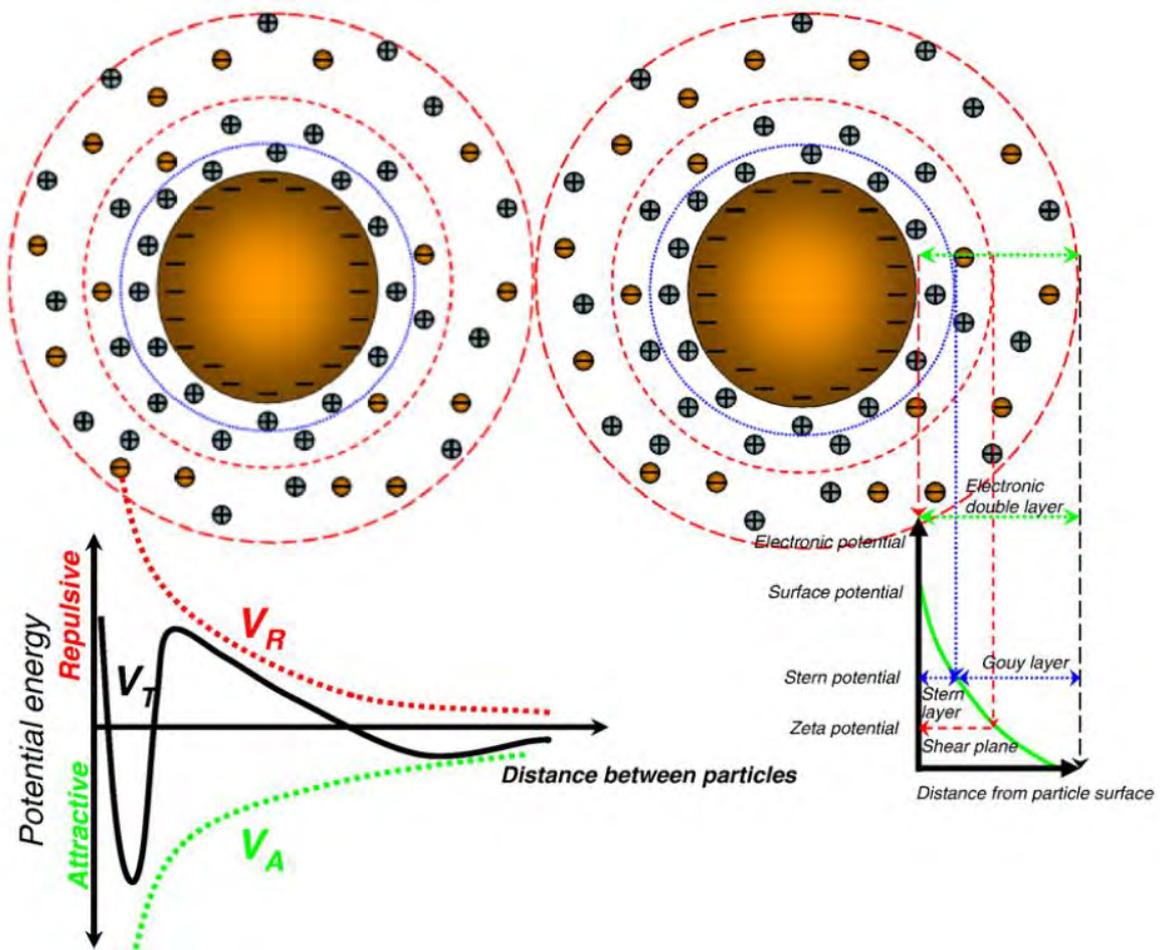


Figura 10. Representación gráfica de la doble capa eléctrica y de la clásica teoría DLVO.

Tomado de "Physical and chemical stability of drug nanoparticles" por Wu et.al (2011)

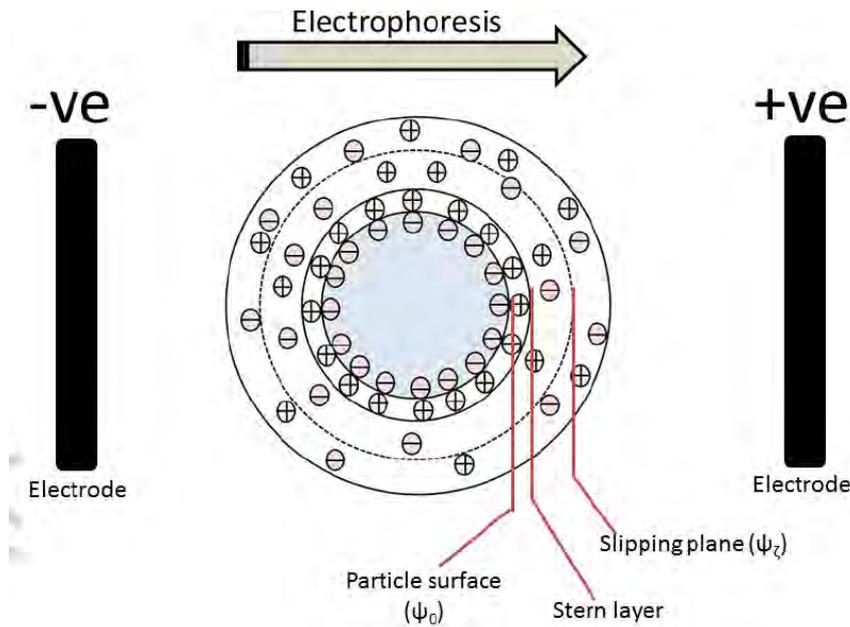


Figura 11 Representación gráfica de la electroforesis

Tomada de "DLS and zeta potential - What they are and what they are not?" por Bhattacharjee (2016)

El valor de potencial zeta se obtiene de manera indirecta mediante la técnica de electroforesis y proporciona información de la interacción de las nanopartículas con el ambiente biológico y los compuestos bioactivos ya que el potencial zeta depende de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la nanopartícula y la fase líquida (Bhatia, 2016; Ramawat & Mérillon, 2015). Además, el potencial zeta puede ser utilizado para evaluar la hidrofobicidad de la superficie de la nanopartícula y la naturaleza del material cargado dentro de la partícula o el material recubierto en su superficie (Bhatia, 2016). Puede ser usado para determinar si un material activo es cargado dentro de la nanopartícula o está en la superficie (Singh y Lillard Jr, 2009)

El valor del potencial zeta indica el grado de repulsión entre las partículas cargadas en una dispersión. Altos valores del potencial zeta indica que las partículas están altamente cargadas y que debido a la repulsión eléctrica se evita la aglomeración de las partículas, mientras que valores bajos indican que es probable las partículas se aglomeren ya que la atracción vence a la repulsión (Kumar, 2019). Bhattacharjee (2016) menciona que las nanopartículas se califican

como altamente inestable, relativamente estable, moderadamente estable y altamente estable si el potencial zeta (positivo o negativo) está en el rango de 0 a 10 mV, 10 a 20 mV, 20 a 30 mV y de 30 mV a más respectivamente. Los altos valores de potencial zeta ya sean positivos o negativos indican alta estabilidad coloidal de las nanopartículas.

La repulsión electrostática y la estabilización estérica son mecanismos a través de los cuales las suspensiones coloidales pueden ser estabilizadas, y pueden conseguirse al adicionar al medio estabilizadores iónicos y no iónicos, respectivamente. El primer mecanismo puede ser descrito por la teoría clásica Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), la cual asume que las fuerzas que actúan sobre las partículas coloidales en un medio incluyen fuerzas electrostáticas repulsivas y fuerzas atractivas de Van der Waals. Las fuerzas repulsivas se originan en la superposición de la doble capa eléctrica (EDL) que rodea a las partículas en el medio y, por lo tanto, impiden la aglomeración coloidal (Wu et. al, 2011). La energía potencial total (V_T) de la interacción partícula-partícula es una suma del potencial de repulsión (V_R) generado de las dobles capas eléctricas y el potencial de atracción (V_A) de las fuerzas de Van der Waals. El V_R depende del tamaño de la partícula, la distancia entre partículas, el potencial zeta, la concentración de iones y la constante dieléctrica del medio. El V_R es extremadamente sensible a la concentración de iones en el medio. El V_R disminuye al incrementar la fuerza iónica en el medio porque la EDL disminuye, causado por el screening de la carga superficial. En consecuencia, se incrementa la susceptibilidad de las partículas dispersadas para formar aglomerados. Por otro lado, el V_A es determinada por la constante de Hamaker, tamaño de la partícula, distancia entre partículas (Wu et. al, 2011). En la Figura 10 se mostró un gráfico de energía potencial versus distancia entre las partículas, la cual demuestra que las fuerzas atractivas son más dominantes en pequeñas y largas distancias, mientras que las fuerzas repulsivas prevalecen a distancias intermedias y crean una repulsión neta entre las partículas dispersas, evitando así la aglomeración.

La estabilización estérica puede ser conseguida con la adición de sustancias, como los surfactantes no iónicos, en el medio. Los estabilizadores anfífilos al ser adsorbidos en la superficie de la partícula pueden estabilizar una dispersión incluso cuando no hay potencial zeta significativo (Nutan y Reddy, 2010). La fracción estabilizadora debe ser suficientemente larga y densa para mantener una barrera estérica capaz de minimizar la interacción partícula-partícula hasta un nivel en el que las fuerzas de atracción VDW sean menores que las fuerzas estéricas repulsivas (Wu et. al, 2011).

Algunos polímeros, conocidos como polielectrolitos, pueden ionizarse en medio acuoso y actuar electrostática y estéricamente. El grado de ionización depende del pH y la fuerza iónica del medio de dispersión (Nutan y Reddy, 2010).

1.4.3 Eficiencia de carga y capacidad de carga

Ambas variables están relacionadas a la cuantificación de las sustancias activas incorporadas dentro de las nanopartículas, cuyos valores pueden ser determinados mediante los siguientes métodos analíticos: Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o cromatografía de gases (Rivas et. al, 2017). En la Sección 2.4.5. se presenta a detalle los cálculos empleados para hallar la eficiencia de carga (EC) y la capacidad de carga (CC) mediante espectroscopía UV-Vis.

1.5 Nanopartículas a base de biopolímeros

Los biopolímeros y sus derivados son materiales adecuados para fabricar nanopartículas, que serán usadas como vehículos de administración de fármacos, ya que se caracterizan por la facilidad de funcionalidad, la solubilidad en agua, la no toxicidad, la biodegradabilidad y la biocompatibilidad. Los biopolímeros, además de reducir la degradación enzimática antes de la liberación de un agente terapéutico en los sitios objetivo, pueden reducir la toxicidad del

fármaco con una liberación controlada de la sustancia activa (Biswas et. al, 2021). La Figura 12 muestra polímeros naturales y sintéticos usados para fabricar nanopartículas pediátricas.

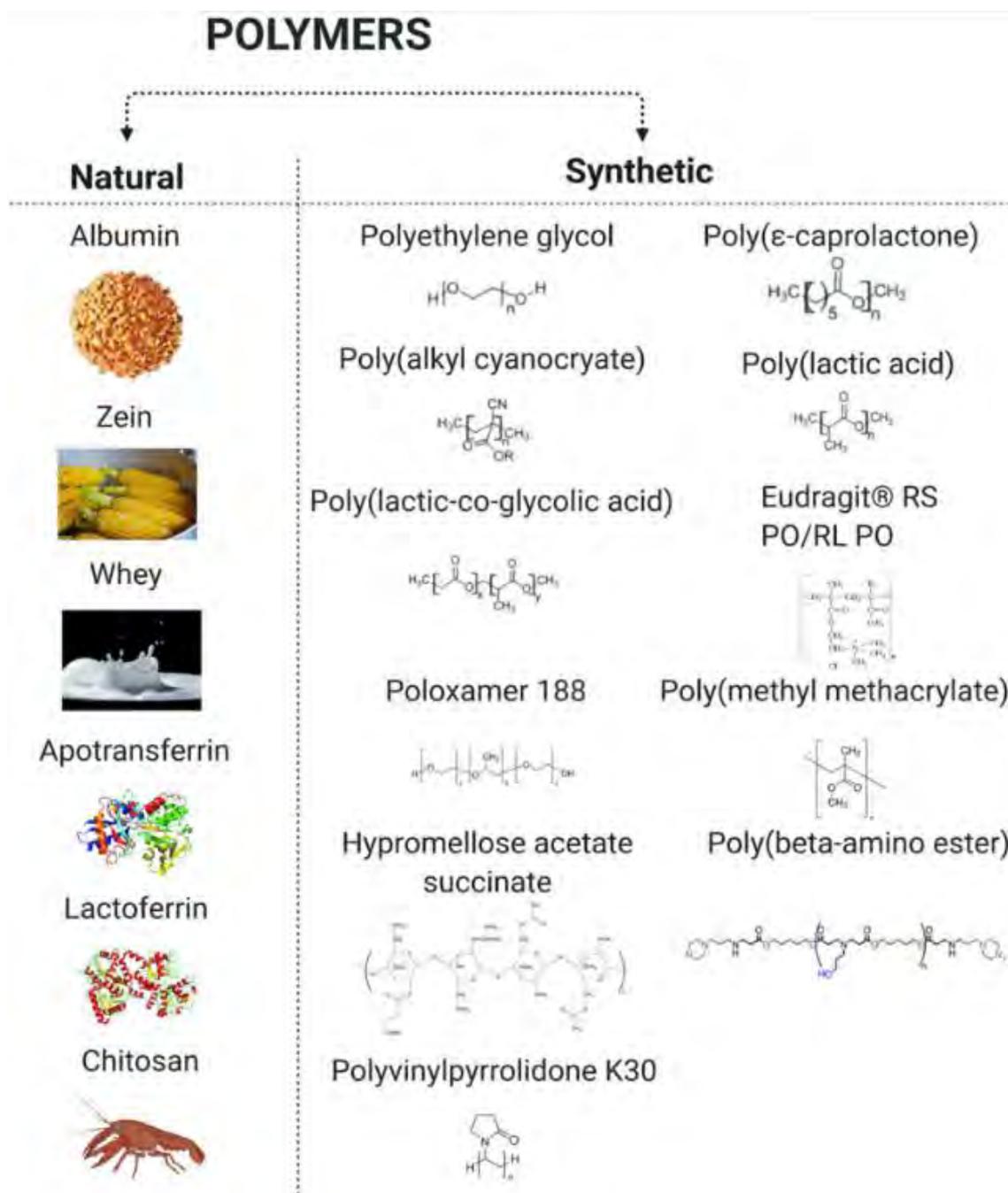


Figura 12 Polímeros naturales y sintéticos usados para fabricar nanopartículas pediátricas

Tomado de "Polymeric and Lipid Nanoparticles: Which Applications in Pediatrics?" por Nieto González et. al

(2021)

1.5.1 Nanopartículas de almidón

La fabricación de las nanopartículas, a partir del almidón, se puede realizar mediante dos vías: a) el método ascendente y b) el método descendente. El primer método consiste en la formación de nanopartículas mediante la acumulación controlada de amilosa y amilopectina, regulada por el autoensamblaje. Uno de los procesos ascendentes más comunes es la nanoprecipitación, la cual requiere de dos fases, la primera consiste en un solvente apropiado para la disolución del polímero y la segunda, es una fase no solvente en la cual, sustancias como el etanol son usadas para desolvatar al polímero y de esta manera producir las nanopartículas (Farrag et al., 2018).

Por otro parte, el método descendente consiste en descomponer la estructura nativa de los gránulos de almidón. Uno de los procesos descendentes más empleados es la hidrólisis ácida. En este, a partir de la descomposición de la estructura de los gránulos y la remoción de las fases amorfas, se obtienen nanopartículas con un mayor grado de cristalinidad, incluso superior al de los gránulos de almidón (Troncoso y Torres, 2020).

La nanoprecipitación e hidrólisis ácida son los procesos de fabricación de nanopartículas de almidón comúnmente reportados en la literatura científica. Las ventajas del primer método a comparación de la hidrólisis ácida son el menor requerimiento de tiempo y energía, y el uso de reactivos no tóxicos (Torres et. al, 2019). La fuente botánica y las variedades de una misma fuente botánica del almidón, la cantidad de amilosa del biopolímero y el método de fabricación de las nanopartículas influyen en las propiedades finales de las nanopartículas (Torres et. al, 2019). Torres et. al (2019) demostraron que el método de fabricación de las nanopartículas influye en las propiedades de las nanopartículas como el tamaño de la partícula, cristalinidad y contenido de amilosa.

1.5.1.1 Nanoprecipitación

La nanoprecipitación se basa en la reducción de la calidad del solvente en el que se disuelve la composición principal de las nanopartículas. Esta variación de la calidad del solvente puede lograrse alterando el pH, las condiciones de solubilidad o la adición de una fase no solvente (Rivas et. al, 2017). La nanoprecipitación con una fase no solvente requiere la preparación de una fase orgánica y una fase acuosa, la cual tiene mayor tensión superficial, y la sucesiva adición de una fase a otra bajo agitación magnética. La diferencia de las tensiones superficiales promueve la difusión del solvente orgánico. Posteriormente, sucede la precipitación gradual del polímero y la formación de nanopartículas (Torres et. al, 2019). La Figura 13 muestra el esquema de formación de nanopartículas mediante nanoprecipitación.

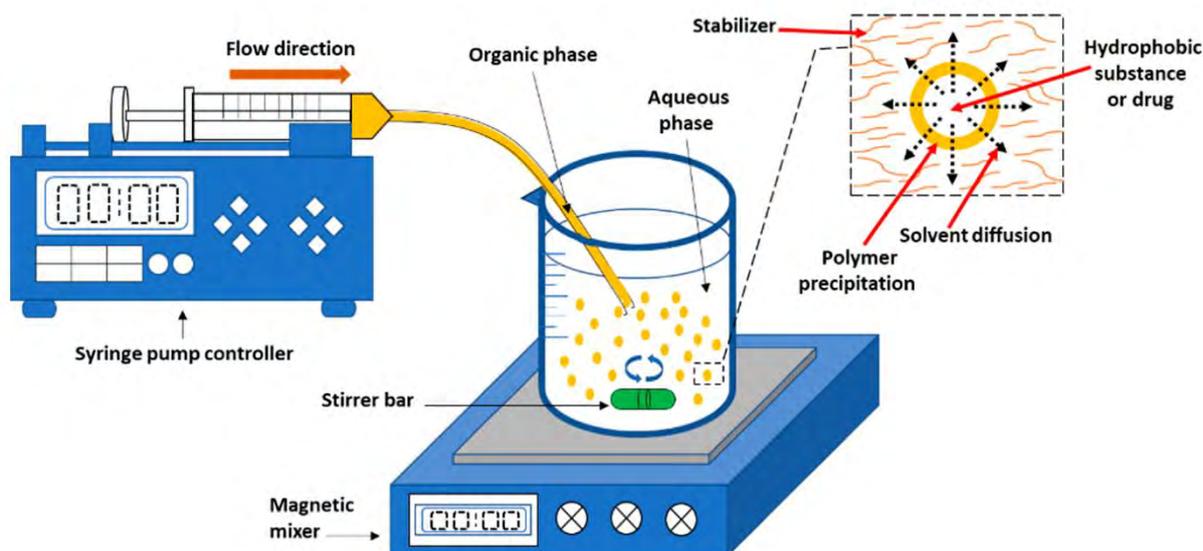


Figura 13 Esquema de formación de nanopartículas mediante nanoprecipitación

Tomado de "Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles", por Pulingam et. al (2022)

Los parámetros de fabricación de nanopartículas mediante nanoprecipitación como la relación solvente y no solvente, la concentración de almidón, el tipo de surfactante, el no solvente y la

gelatinización de los gránulos de almidón afectan al tamaño de la partícula y la distribución (Sadeghi et. al, 2017).

Se ha reportado en la literatura la adición de reactivos para la formación de la solución acuosa o solvente del almidón como el surfactante, la urea y un agente entrecruzante como el tripolifosfato de sodio (El-Feky et. al, 2015; Saari et. al, 2017; Farrag et. al, 2018). La adición de una surfactante afecta positivamente a las propiedades superficiales de las nanopartículas, causando la reducción de la hidrofobicidad y; por ende, incrementando su solubilidad (Hebeish et. al, 2014; Torres et. al, 2019). La urea previene la autoasociación de las moléculas de almidón, y facilita la solubilidad acuosa, la hinchazón y gelatinización de los gránulos de almidón (Farrag et. al, 2018; Wang et. al, 2013). Un solvente conformado por urea e hidróxido de sodio es ambientalmente amigable, no tóxico y de bajo costo (Chin et. al, 2011). Hu et. al (2016) reportaron que la viscosidad de la solución de almidón en agua y urea, con aspecto claro y transparente, se mantuvo constante durante 18 días a 5°C; la solución se mantenía estable. Además, mencionaron que la urea previene cambios estructurales del almidón.

La adición de un agente entrecruzante puede modificar el tamaño de las nanopartículas. Torres et. al (2019) reportaron, ante la adición de tripolifosfato como agente entrecruzante, el incremento en el tamaño de las nanopartículas de almidón obtenidas.

Los fármacos quimioterapéuticos son generalmente tóxicos para las células sanas y cancerosas, y se caracterizan por su baja solubilidad y estabilidad en la circulación sanguínea. Una de las maneras que ha demostrado evitar la ingesta de altas concentraciones de fármacos quimioterapéuticos y disminuir las posibilidades de efectos secundarios es el uso de sistemas de administración de fármacos dirigidos a base de almidón. Además, se han desarrollado sistemas de administración de drogas sensibles al pH para que los fármacos administrados oralmente sean estables y se mantengan activos bajo condiciones ácidas y enzimáticas del

tracto gastrointestinal (Troncoso y Torres, 2020). Se elaboró la Tabla 1 para mostrar los valores reportados en la literatura de los tamaños de las nanopartículas de almidón.

Tabla 1: Propiedades físicas de las nanopartículas de almidón fabricadas por nanoprecipitación

Biopolímero	Fase no solvente	Diámetro promedio (nm)	Referencia
Almidón de plátano nativo	Acetona	135.1	Acevedo-Guevara et. al (2018)
Almidón de plátano acetilado	Acetona	190.2	Acevedo-Guevara et. al (2018)
Almidón de maíz nativo	Etanol	98.8	Sadeghi et. al (2017)
Almidón de maíz Amioca	Etanol	129.3	Sadeghi et. al (2017)
Hylon V	Etanol	93.8	Sadeghi et. al (2017)
Hylon VII	Etanol	132.9	Sadeghi et. al (2017)
Almidón de maíz normal	Etanol	13.9-316	Gutiérrez et. al (2020)
Almidón de alta amilosa de maíz	Etanol	22.3-50.3	Gutiérrez et. al (2020)
Almidón de alta amilopectina de maíz	Etanol	16.4 - >500	Gutiérrez et. al (2020)
Almidón de papa nativa	Etanol	165.31	Putro et. al (2020)
Almidón de vaina	Ácido clorhídrico (0.1 M)	92.4 – 165.3	Farrag et. al (2018)
Almidón de maíz	Ácido clorhídrico (0.1 M)	174.7 – 263.3	
Almidón de papa	Ácido clorhídrico (0.1 M)	91.2 – 154.5	
Almidón de quinua	Etanol	162.3-717.8	Jiang et. al (2022)

1.6 Sistemas de nanopartículas de almidón cargados con curcumina

Se ha reportado en la literatura la carga de fármacos en nanopartículas de almidón a través de la carga directa e indirecta. Cuando la fabricación de las nanopartículas y carga del fármaco ocurren simultáneamente se trata de una carga directa; mientras que en la carga indirecta la carga del fármaco sucede después de la fabricación de las nanopartículas (Moran et. al, 2021).

La fuente botánica del almidón, la modificación de la estructura química del polisacárido y el método de fabricación de las nanopartículas influyen en las características fisicoquímicas de las nanopartículas cargadas con fármacos. Un ejemplo de modificación química del almidón es la acetilación. Acevedo-Guevara et. al (2018) demostraron que la acetilación del almidón causa una mayor eficiencia de carga de la curcumina a comparación de las nanopartículas de almidón nativo debido a que el aumento de átomos de oxígeno (carboxilo e hidroxilo) en el almidón modificado permite que más moléculas de curcumina interaccionen con las nanopartículas de almidón a través de enlaces de hidrógeno. Miskeen et. al (2021) fabricaron nanopartículas de almidón entrecruzadas con ácido cítrico, las cuales tuvieron mayor diámetro y capacidad de carga que las nanopartículas no entrecruzadas por la mayor formación de enlaces de hidrógeno entre la curcumina y las nanopartículas, causada por la presencia de los grupos carbonilos en las nanopartículas entrecruzadas. Por otro lado, Farrag et. al (2018) estudió el efecto de la fuente botánica del almidón en la carga de la quercetina dentro de las nanopartículas poliméricas fabricadas por nanoprecipitación. Los autores indicaron que las nanopartículas de almidón de la papa tenían el mayor porcentaje de carga que las nanopartículas del maíz y de la vaina, cuya posible causa fue la mayor cantidad de amilopectina presente en el almidón de papa. Además, observaron que, con la introducción del fármaco en las nanopartículas de almidón de la papa, los sistemas tenían la forma de nanofibras, lo cual fue diferente a la forma esférica de las nanopartículas sin carga.

La modificación de los parámetros de la nanoprecipitación puede causar cambios en las características fisicoquímicas de las nanopartículas como la eficiencia de carga, tamaño, potencial zeta, entre otros. Li et. al (2015) confirmaron la influencia de la relación curcumina: almidón en el tamaño, potencial zeta, eficiencia de carga y capacidad de carga de las nanopartículas cargadas con curcumina. El-Naggar et. al (2015) reportaron la influencia de la concentración del tripolifosfato de sodio y del diclofenaco en el tamaño, eficiencia de carga, la naturaleza de la estructura y morfología de los sistemas cargados. A medida que incrementaba la concentración del STPP, el tamaño de las partículas y la eficiencia de carga del fármaco aumentaba a pesar de no haber una fuerte interacción química entre las nanopartículas entrecruzadas con el fármaco.

Se ha reportado que la carga de la curcumina al interior de la nanopartícula polimérica se debe principalmente a los enlaces de hidrógeno entre dicho fármaco y las cadenas poliméricas del almidón (Acevedo-Guevara et. al, 2018; Kemin y Chin; 2020; Miskeen et. al, 2021; Pang et. al, 2014).

Se ha reportado que las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina tienen una forma esférica cuya causa puede ser la agrupación de la curcumina y su recubrimiento de las moléculas del almidón durante la etapa de precipitación (Athira y Jyothi, 2015; Chin et. al, 2014; Miskeen et. al, 2021; Li et. al, 2016).

Con respecto al tamaño, Athira y Jyothi (2015) reportaron que las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina, producto de la carga indirecta, tuvieron mayor tamaño que las nanopartículas sin carga. Jiang et. al (2022) fabricaron nanopartículas de almidón de quinua cargadas con quercetina (855.23 nm) que eran significativamente más grandes que las nanopartículas vacías (166.25 nm), e informaron que la mayor parte de la quercetina estaba encerrada en el interior de las nanopartículas agrupadas. Acevedo-Guevara et. al (2018)

indicaron que la carga in situ o directa de la curcumina en las nanopartículas no tuvo efecto en el tamaño de las nanopartículas ni en la distribución de tamaños.

Así mismo, se ha reportado que las nanopartículas de almidón cargadas con fármacos se caracterizan por tener una estructura amorfa. El-Naggar et. al (2015) confirmaron la conversión de la estructura cristalina a estructura amorfa del diclofenaco, incorporado en las nanopartículas de almidón entrecruzadas con STPP, debido a la interacción del fármaco con las nanopartículas. Además, Li et. al (2016) examinaron las nanopartículas de almidón soluble cargadas con curcumina mediante XRD y DSC e indicaron que el estado de la curcumina era amorfo, estado que permite interactuar con el polímero. Además, el polímero puede prevenir el crecimiento del cristal de curcumina y mantener el estado amorfo. Por otro lado, Athira y Jyothi (2015) visualizaron dos temperaturas de fusión en las nanopartículas cargadas con curcumina correspondientes a la temperatura de fusión de cada componente del sistema, lo cual indica que la estructura del sistema y de la curcumina es cristalina.

Se ha estudiado la estructura química de la curcumina, nanopartículas de almidón y las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina a través de la técnica del FTIR. La principal interacción entre la curcumina y el polisacárido se realiza a través de los enlaces de hidrógeno ya que tanto el polímero como el fármaco se caracterizan por la presencia de grupos hidroxilo (Li et. al, 2015; Pang et. al, 2015). Además, Jiang et. al (2022) confirmaron la interacción entre las nanopartículas de almidón y los fenoles causado por enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los fenoles y los enlaces glucosídicos de las nanopartículas. Una evidencia de la interacción entre ambos componentes del nanosistema es el desplazamiento de los picos del grupo hidroxilo y el grupo C–O–C, característicos del almidón. Así mismo, el pico característico del grupo hidroxilo del anillo bencénico desaparece al estar cargado dentro de las nanopartículas de almidón (Li et. al, 2015; Pang et. al, 2015; Acevedo-Guevara et. al, 2018).

En previos estudios, se ha reportado el incremento significativo de la solubilidad acuosa de la curcumina cuando es cargada en nanopartículas de almidón. Pang et. al (2014) reportaron que la solubilidad de las nanopartículas de almidón-maleato cargadas con curcumina fue 0.06 mg/mL, mientras que Li et. al (2015) informó que la solubilidad de las nanopartículas de almidón soluble cargadas con curcumina fue 0.279 mg/mL. A comparación de la solubilidad de la curcumina nativa (0.0004 mg/ml), las solubilidades acuosas de los sistemas reportados fueron 150 y 697 veces mejor, respectivamente.

Acevedo-Guevara et. al (2018) reportaron que las nanopartículas de almidón nativa del plátano verde tenían una gran afinidad con la curcumina ya que su eficiencia de carga era mayor a 80 %; mientras que Nath (2020) informó la baja afinidad de la curcumina con las nanopartículas de almidón de semillas de yaca ya que la eficiencia de carga era mayor a 19%.

Diversos autores han determinado los parámetros óptimos de la fabricación de las nanopartículas de almidón cargados con fármacos. Li et. al (2015) indicaron que la formulación de relación curcumina/almidón de 3 wt %, usada para fabricar nanopartículas de almidón soluble cargadas con curcumina, fue la óptima por su mayor estabilidad coloidal, mayor capacidad de carga y eficiencia de carga a comparación de las demás formulaciones. Se comprobó la estabilidad coloidal a través de la apariencia de la solución acuosa de las nanopartículas (presencia de precipitados y partículas aglomeradas) y la variación del tamaño, PDI y potencial zeta durante un mes. Pathak et. al (2015) optimizaron la fabricación de nanoensamblajes supramoleculares, compuestas de lectina de soya (lípidos) y quitosano (polímero), cargadas con curcumina. Primero, optimizaron los nanotransportadores vacíos mediante la fabricación de nanopartículas usando diferentes relaciones de lecitina/quitosano y la selección de la formulación más monodispersa y con menor tamaño. Posteriormente, se utilizaron diferentes concentraciones de curcumina en etanol para cargar curcumina en los nanotransportadores. La formulación óptima se seleccionó en base a la eficiencia de carga y

capacidad de carga. Dandekar et. al (2012) optimizaron la fabricación de nanopartículas de almidón de propilo cargadas con docetaxel con respecto a varios parámetros, como la relación fármaco/polímero, el efecto de los surfactantes y la cantidad del surfactante ideal. Variaron un parámetro mientras que los demás parámetros se mantenían constantes; y seleccionaron la formulación óptima de cada variación en base al tamaño y distribución de las partículas. Posteriormente, caracterizaron fisicoquímicamente las partículas optimizadas y reportaron los valores del tamaño, potencial zeta, eficiencia de carga y el contenido del fármaco. Tanto la eficiencia como el contenido del fármaco fueron determinados solo para las partículas optimizadas debido a la formación de micropartículas o nanopartículas no homogéneas en otras condiciones experimentales. Se elaboró la Tabla 2 para mostrar los valores reportados en la literatura de los tamaños de las nanopartículas de almidón con las respectivas eficiencias de carga de curcumina.

Tabla 2: Valores de propiedades de las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina

Almidón	Técnica de procesamiento	Fase no solvente	Diámetro promedio (nm)	EC (%)	Referencia
Almidón de semillas de yuca	Nanoprecipitación	Acetona	371-411.72 (DLS)	19.32-57.34	Nath (2020)
Almidón de yuca	Nanoprecipitación	Acetona	50-200 (TEM)	66.57	Athira y Jyothi (2014)
Almidón de sagú nativo	Nanoprecipitación	Etanol	171	13	Chin et. al. (2014)
Almidón de plátano nativo	Nanoprecipitación	Acetona	147 (DLS)	85.23	Acevedo-Guevara et. al (2018)
Almidón de plátano acetilado	Nanoprecipitación	Acetona	201 (DLS)	90.63	Acevedo-Guevara et. al (2018)
Almidón soluble	Nanoprecipitación	Etanol	61.1 (DLS) 50-88 (SEM)	5.7-14.4	Maghsoudi et. al (2017)
Almidón soluble	Nanoprecipitación	Etanol	182-255.06	45.27-97.76	Li et. al (2015)

CAPÍTULO 2

MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.1 Obtención de almidón

2.1.1 Materiales y reactivos

La especie *Solanum tuberosum ssp. Andigena var Huamantanga*, mostrada en la Figura 14, fue la fuente natural que se usó para la obtención del almidón. Además, los reactivos que fueron utilizados son bisulfito de sodio y metanol, mostrados en la Figura 15.



Figura 14 Imagen representativa de las papas comerciales de la variedad Huamantanga

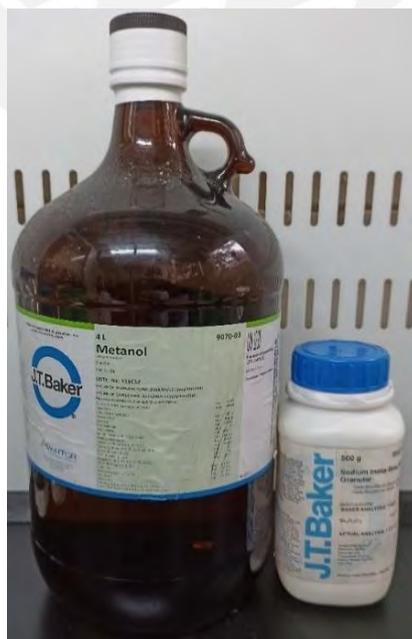


Figura 15 Imagen representativa de los reactivos usados en la extracción de almidón a partir de las papas

2.1.2 Procedimiento

El almidón fue extraído usando el método publicado por Torres et. al (2011). El procedimiento inicia con el lavado de los tubérculos con abundante agua de caño y agua destilada para luego ser pelados y cortados con cuchillo. Se remojaron las papas en una solución preparada al 0.01 % p/v de bisulfito de sodio con el fin de evitar su oxidación. Las muestras cortadas se homogeneizaron con licuadora. Posteriormente, la mezcla fue filtrada y se dejó durante 4 horas para la separación del almidón por decantación. Luego, el sobrenadante se desechó y el almidón sedimentado fue lavado las veces necesarias con agua destilada. Los precipitados con un aspecto granulado blanco fueron desengrasados por resuspensión en mezcla de agua y metanol con proporción de 1:1 (v/v) y decantado de nuevo durante 1 hora. El almidón restante obtenido fue secado a 60°C por 24 horas. Se muestra imágenes del proceso de extracción anteriormente descrito en la Figura 16.

Se calcula el rendimiento del almidón seco después de la extracción de las papas de variedad Huamantanga mediante la ecuación 1:

$$\text{Rendimiento de almidón (\%)} = \frac{\text{peso de almidón seco}}{\text{peso de papa pelada o cáscara fresca}} \times 100\% \quad (1)$$

En la presente tesis se realizó 3 veces la obtención del almidón a partir de la papa variedad Huamantanga para obtener un promedio del rendimiento de almidón extraído.

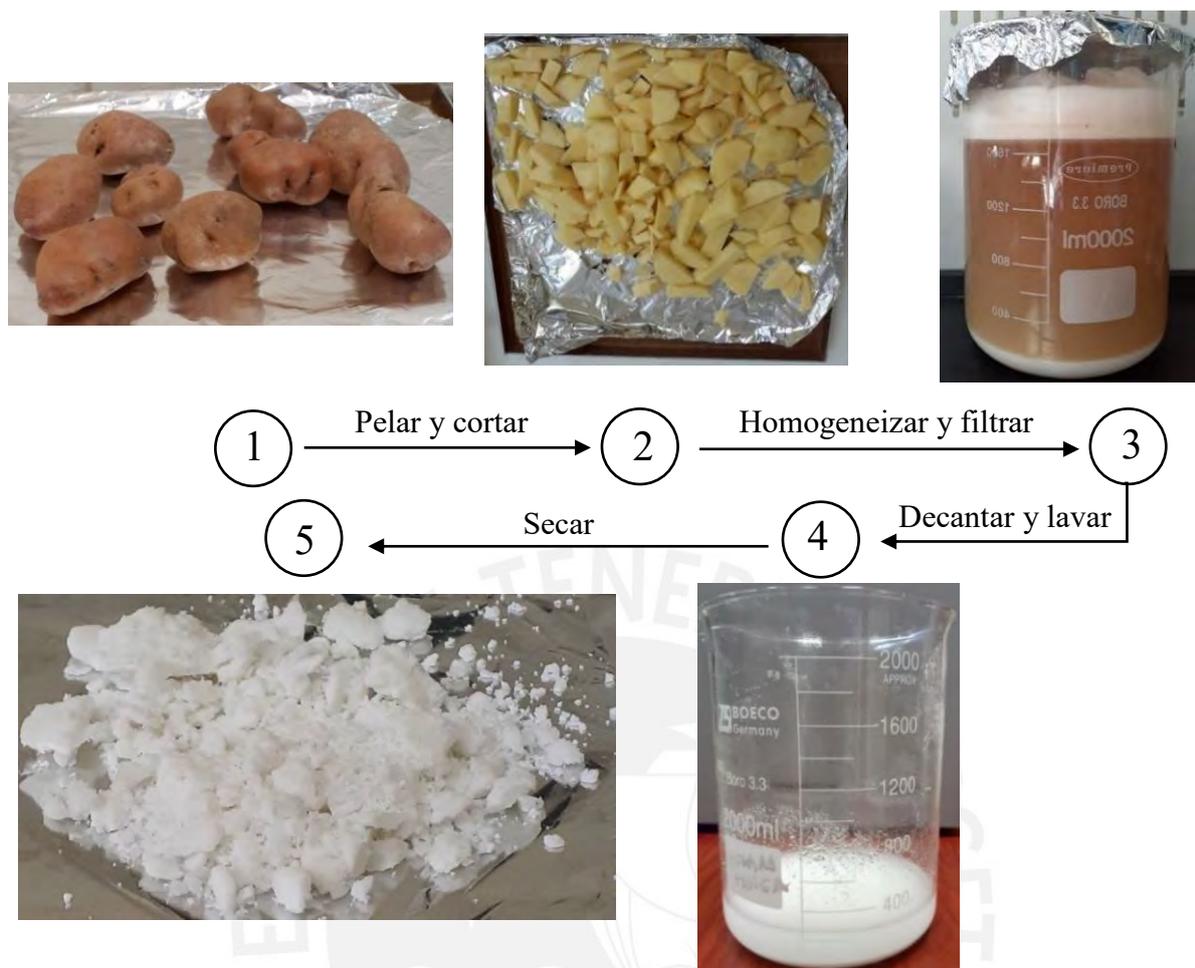


Figura 16 Esquema representativo de la extracción del almidón a partir de la papa de variedad Huamantanga

2.2 Fabricación de nanopartículas de almidón por nanoprecipitación

2.2.1 Materiales y reactivos

Se usaron los almidones extraídos de las papas comerciales de la variedad Huamantanga para la fabricación de las nanopartículas. Los reactivos usados, mostrados en la Figura 17, fueron hidróxido de sodio (NaOH), urea, Tween®80, tripolifosfato de sodio (STPP) y etanol.



Figura 17 Materiales y reactivos usados en la fabricación de nanopartículas de almidón

2.2.2 Procedimiento

Se siguió el proceso de nanoprecipitación detallado por Torres et al. (2019) para la fabricación de las nanopartículas de almidón. La fabricación de las nanopartículas consiste principalmente en la gelatinización del almidón, la precipitación de las nanopartículas, la extracción de las partículas y el secado (Figura 18).

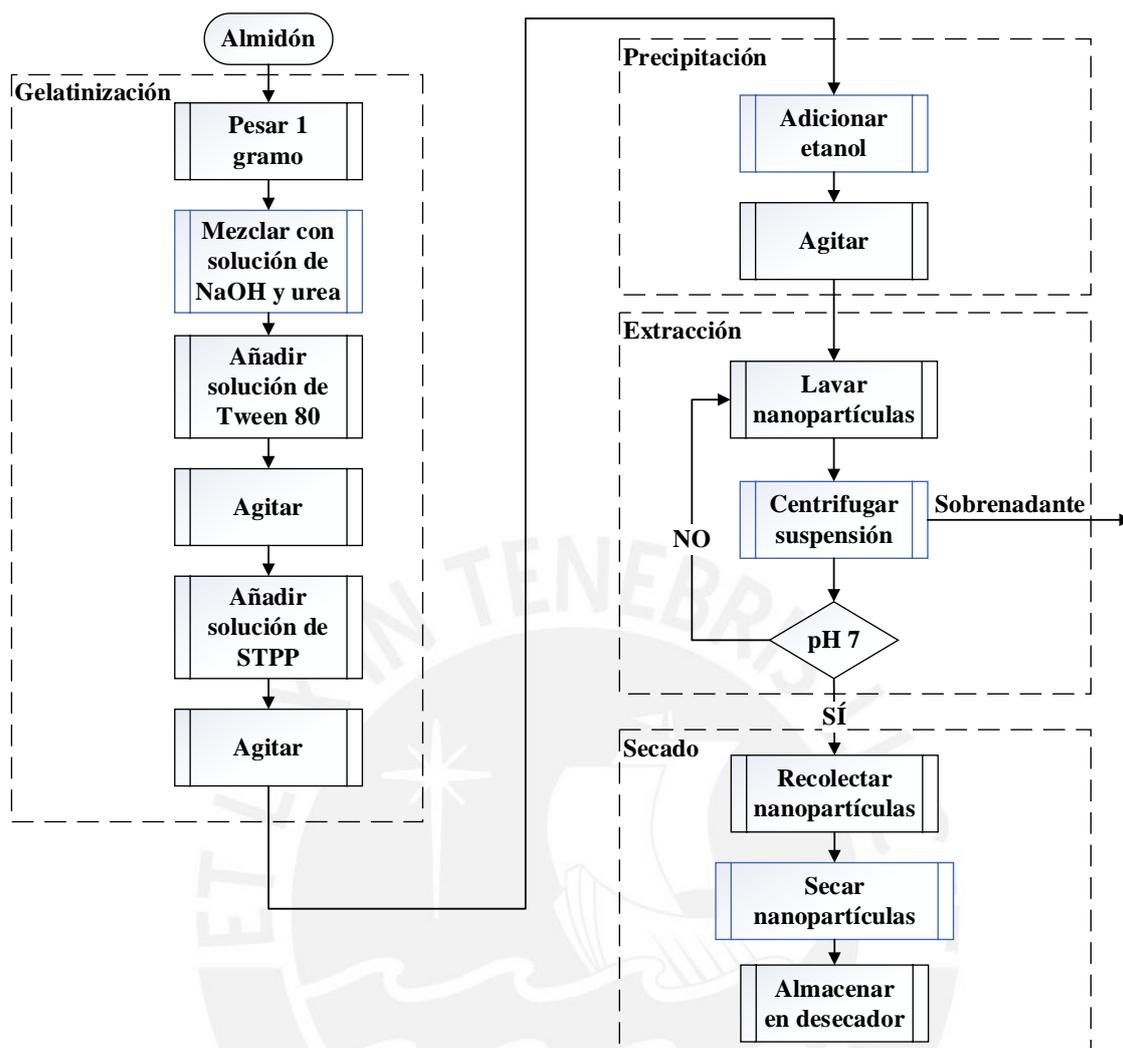


Figura 18 Diagrama de procesos de fabricación de nanopartículas a partir del almidón mediante nanoprecipitación

El método nanoprecipitación empezó con la disolución de 1g de almidón en una solución acuosa mediante agitación durante aproximadamente 1 hora o el tiempo necesario para que se aclare la solución. Se prepararon 4 diferentes soluciones acuosas de 70 mL para evaluar su efecto en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de almidón fabricadas:

- 0.3 g NaOH
- 0.3g NaOH + 0.15g Urea
- 0.3g NaOH + 0.3g Urea
- 0.3g NaOH + 0.6g Urea

Luego, se preparó la solución acuosa de Tween®80 al mezclar 0.2 gramos o 188 μL de Tween®80 con 20 mL de agua destilada. La solución se agregó por goteo a la mezcla de almidón anteriormente elaborada, sometida a agitación. Al finalizar el goteo, se mantuvo durante 1 hora la agitación de la mezcla. Después se vertió 10 mL de agua destilada o se adicionó por goteo 10 mL de una solución acuosa de 0.4 g de STPP con el fin de evaluar la influencia del agente entrecruzante en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de almidón a fabricar. Las muestras que contenía entrecruzante se mantuvieron en agitación durante 4 horas posterior al finalizar la adición por goteo del STPP. Posteriormente, se añadió por goteo 100 mL de etanol absoluto y, finalizado el goteo, se agitó la mezcla durante un día. La velocidad de agitación se mantuvo a 500 rpm durante la fabricación de las nanopartículas. El esquema de la formación de nanopartículas de almidón mediante nanoprecipitación se muestra en la Figura 19. Además, se muestran imágenes de la formación de las nanopartículas en la Figura 20.

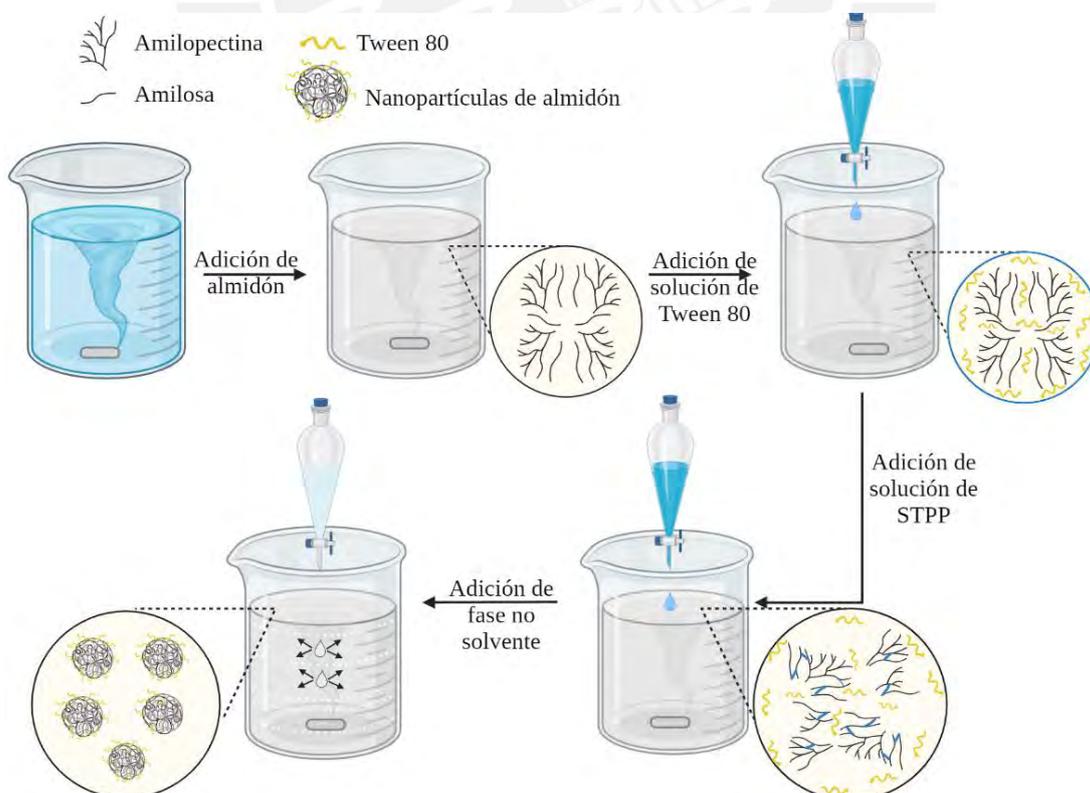


Figura 19 Esquema de formación de nanopartículas de almidón mediante nanoprecipitación

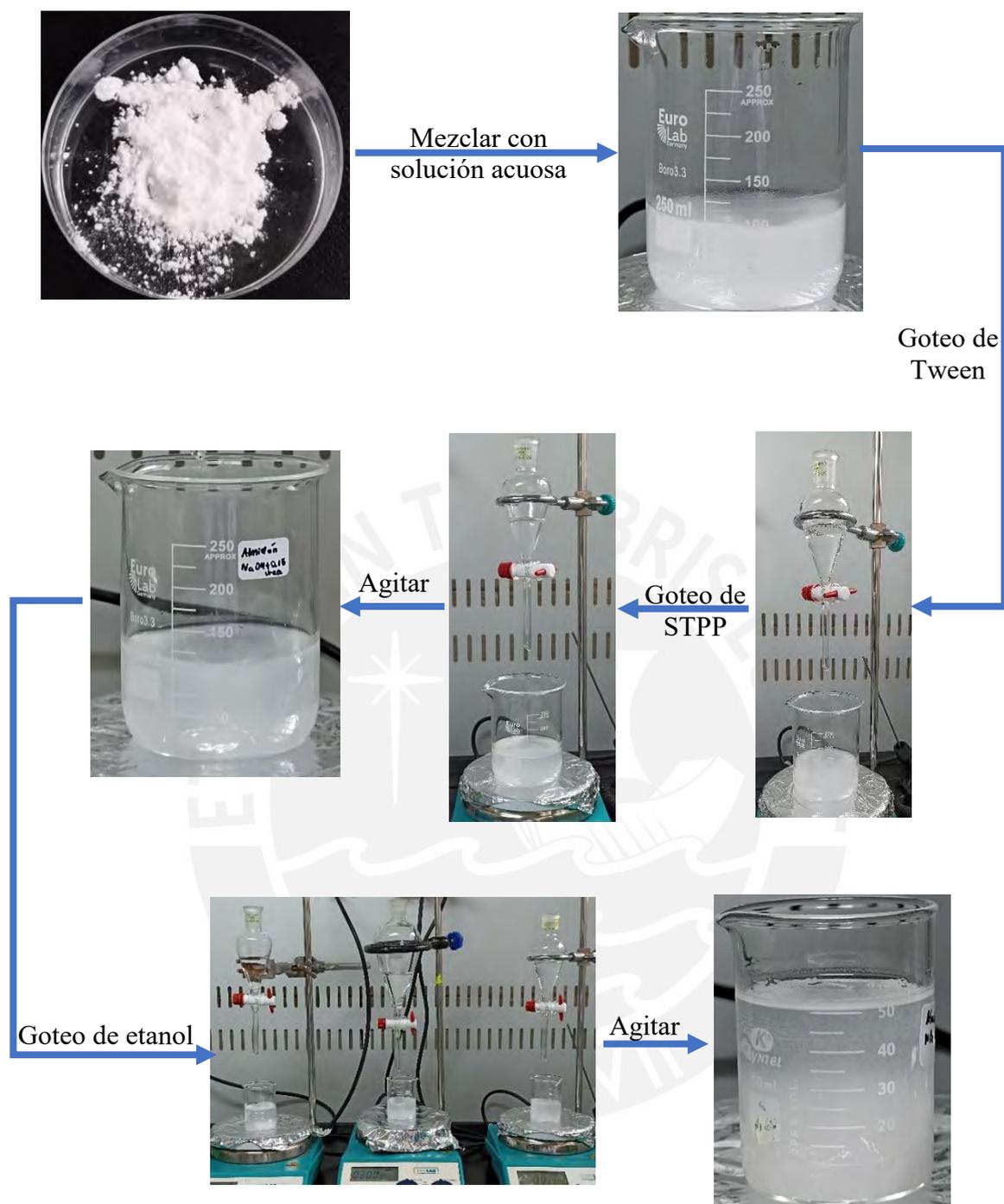


Figura 20 Esquema representativo de la fabricación de nanopartículas de almidón con agente entrecruzante

La mezcla resultante fue centrifugada a 7000 rpm por 10 minutos. Las nanopartículas precipitadas se recolectaron en un frasco y fueron lavadas dos veces hasta conseguir un pH 7 como se aprecia en la Figura 21.



Figura 21 Esquema representativo del lavado de nanopartículas de almidón

Se añadió 10 mL de agua destilada y 30 mL de etanol en el primer lavado, mientras que el último lavado se adicionó 30 mL de etanol. Después de cada lavada, se centrifugó cada suspensión a 7000 rpm por 5 minutos. Así mismo, el lavado sirvió para remover la urea e hidróxido de sodio remanente. Se recolectaron las nanopartículas precipitadas y se colocaron en una Petri cubierta con papel aluminio. Finalmente, las nanopartículas fueron secadas a 40 °C en una incubadora por 2 días.

Se fabricaron 3 veces las nanopartículas de almidón con los mismos parámetros de fabricación seleccionados con la finalidad de caracterizar cada muestra con la técnica de caracterización correspondiente 3 veces para obtener un promedio de cada evaluación.

Se calcula el rendimiento de las nanopartículas de almidón luego de ser secadas mediante la ecuación 2:

$$\text{Rendimiento de nanopartículas (\%)} = \frac{\text{peso de nanopartículas secas}}{\text{peso total de los aditivos sólidos incorporados}} \times 100\% \quad (2)$$

Los aditivos sólidos incorporados a las diferentes fórmulas de fabricación fueron el almidón, la urea y el STPP.

2.3 Fabricación de sistemas de nanopartículas cargadas con productos biológicos

2.3.1 Materiales y reactivos

Los mismos materiales empleados para la fabricación de las nanopartículas de almidón por nanoprecipitación y la curcumina, que se aprecian en la Figura 22, fueron usados para la fabricación de los sistemas de nanopartículas cargadas. La curcumina en polvo de *Curcuma longa* fue adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cuyo número de registro CAS es 458-37-7.



Figura 22 Materiales y reactivos usados para la fabricación de nanopartículas de almidón cargadas con curcumina

2.3.2 Procedimiento

Los sistemas de nanopartículas cargadas con curcumina fueron fabricados por nanoprecipitación, similar al proceso de fabricación de nanopartículas de almidón. La diferencia es la adición de la fase no solvente que se fabrica al disolver 10 mg de curcumina en 100 mL de etanol absoluto. La fabricación de las nanopartículas consiste principalmente en la gelatinización del almidón, la precipitación de las nanopartículas, la extracción de las partículas y el secado (Figura 23).

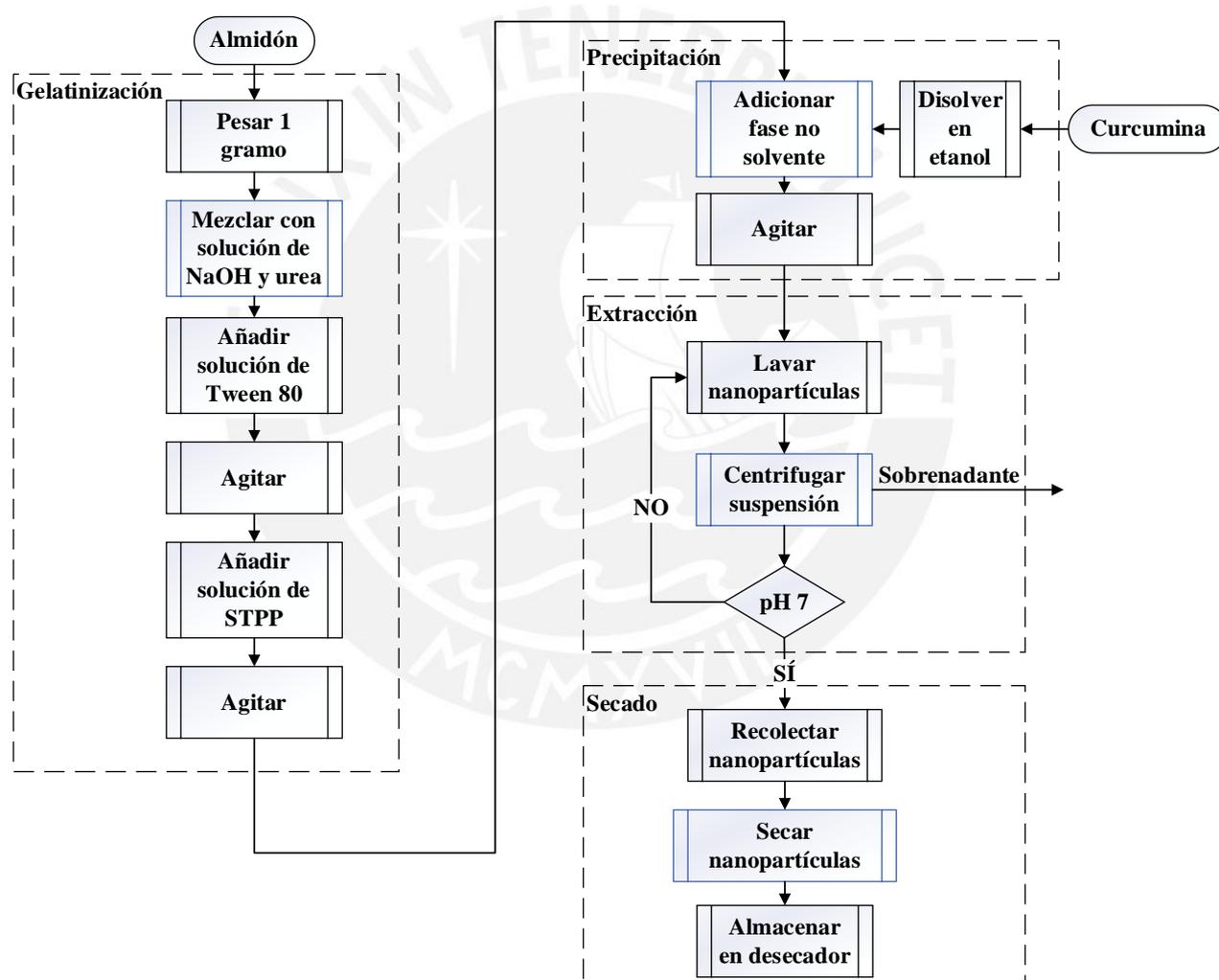


Figura 23 Diagrama de procesos de fabricación de nanopartículas cargadas con curcumina a partir del almidón mediante nanoprecipitación

Primero, se disolvió 1g de almidón en cada una de las 4 diferentes soluciones acuosas mencionadas en la Sección 2.2.2 mediante agitación durante aproximadamente 1 hora o el tiempo necesario para que se aclare la solución. Luego, se preparó la solución acuosa de Tween®80 al mezclar 0.2 gramos o 188 μL de Tween®80 con 20 mL de agua destilada. La solución se agregó por goteo a la mezcla de almidón anteriormente elaborada, sometida a agitación. Al finalizar el goteo, se mantuvo durante 1 hora la agitación de la mezcla.

El efecto de un agente entrecruzante también fue evaluado. Por esa razón, o bien se añadió 10 mL de agua destilada, o bien se adicionó por goteo la solución de 0.4 g de STPP en 10 mL de agua destilada a la mezcla acuosa de almidón. En caso se realice la segunda opción, al finalizar el goteo, se mantiene durante 4 horas la agitación de la mezcla. Posteriormente, se añadió por goteo la fase no solvente y, luego, se agitó la mezcla durante 1 día. El esquema de la formación de nanopartículas de almidón cargadas con curcumina mediante nanoprecipitación se muestra en la Figura 24.

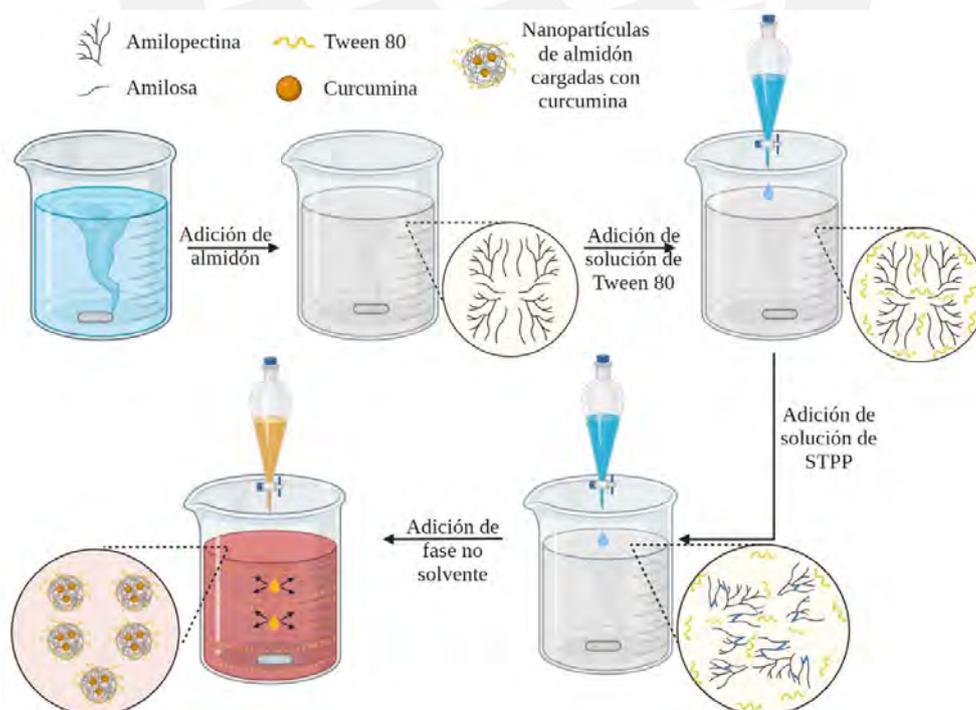


Figura 24 Esquema representativo de formación de nanopartículas de almidón cargadas con curcumina mediante nanoprecipitación

La mezcla resultante fue centrifugada a 7000 rpm por 10 minutos. Las nanopartículas precipitadas se recolectaron en un frasco. También, se recolecta y conserva el sobrenadante de cada mezcla centrifugada con el fin de utilizarlo en la cuantificación de la eficiencia de carga y la capacidad de carga de las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina mediante la espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), técnica descrita en la Sección 2.4.5. Se realizó el lavado de las nanopartículas, descrito en la Sección 2.2.2, para eliminar el exceso de curcumina en las superficies de dichas nanopartículas, remover los restos de urea e hidróxido de sodio, y alcanzar el pH 7. Se recolectaron las nanopartículas precipitadas y se colocaron en una Petri cubierta con papel aluminio. Finalmente, las nanopartículas fueron secadas a 40 °C en una incubadora por 2 días. Se elaboró la Figura 25 para representar gráficamente el proceso de fabricación de las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina.

Se fabricó 3 veces las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina con los mismos parámetros de fabricación seleccionados con la finalidad de caracterizar cada muestra con la técnica de caracterización correspondiente 3 veces para obtener un promedio de cada evaluación.

Se calcula el rendimiento de las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina luego de ser secadas mediante la ecuación 3:

$$\begin{aligned} & \text{Rendimiento de nanopartículas (\%)} \\ &= \frac{\text{peso de nanopartículas secas}}{\text{peso total de los aditivos sólidos incorporados}} \times 100\% \quad (3) \end{aligned}$$

Los aditivos sólidos incorporados a las diferentes fórmulas de fabricación fueron la curcumina, el almidón, urea y el STPP.

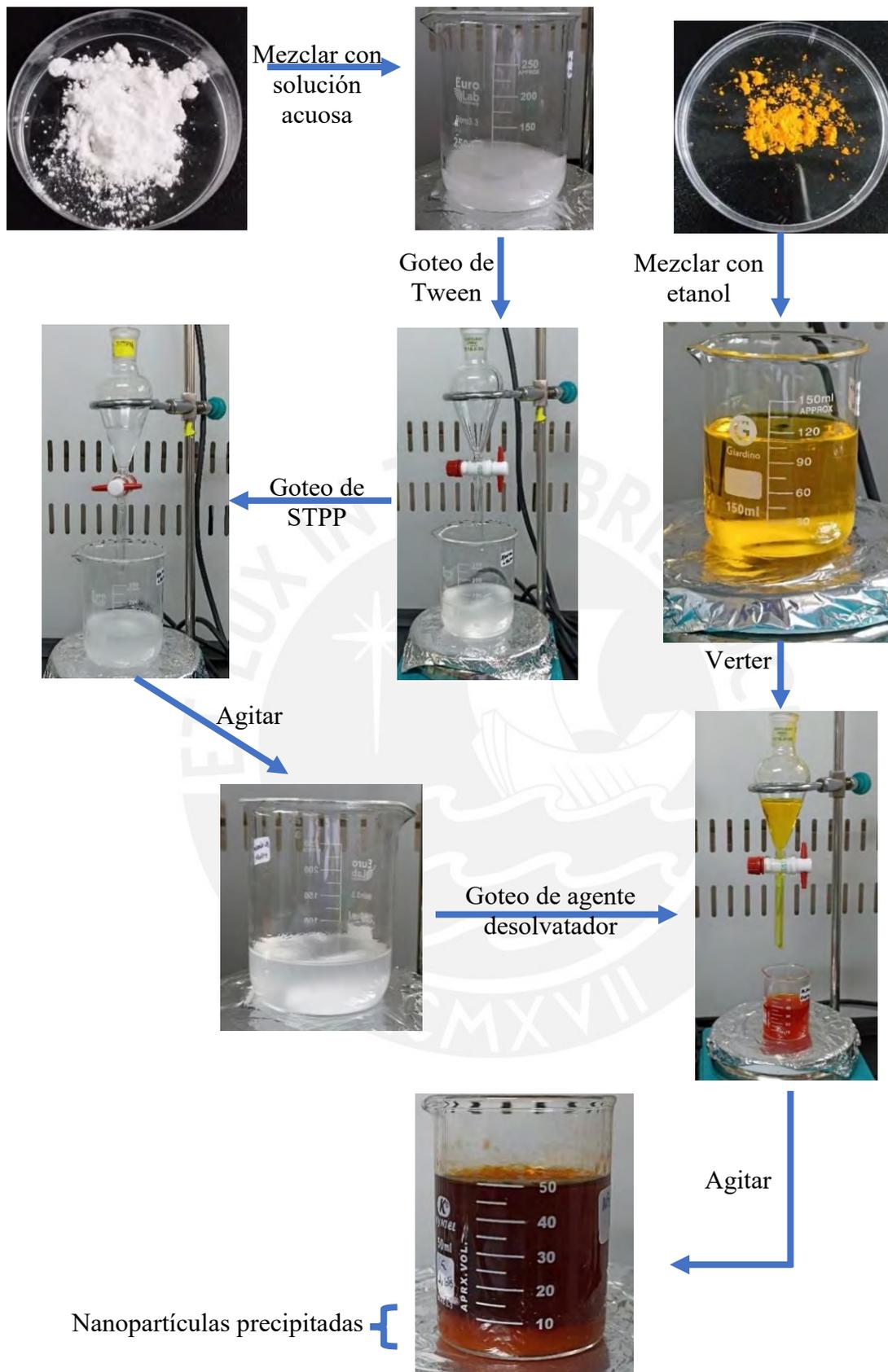


Figura 25 Esquema representativo de la fabricación de nanopartículas de almidón cargadas con curcumina

2.4 Lista de nanopartículas de almidón fabricadas mediante nanoprecipitación

Se visualizan los códigos de las nanopartículas fabricadas mediante el método de nanoprecipitación junto con las concentraciones de los materiales usados en su preparación en términos de porcentaje peso-volumen (p/v) en la Tabla 3. Dichas nanopartículas fueron caracterizadas mediante las técnicas de caracterización mencionadas en la Sección 2.5.

Tabla 3: Lista de nanopartículas de almidón fabricadas mediante nanoprecipitación

Muestra	Solución acuosa					Fase no solvente
	Almidón (%p/v)	NaOH (% p/v)	Urea (% p/v)	Tween (% p/v)	STPP (%p/v)	Curcumina (% p/v EtOH)
NP-H1	1	0.3	-	0.2	-	-
NP-H2	1	0.3	-	0.2	0.4	-
NP-H3	1	0.3	0.15	0.2	-	-
NP-H4	1	0.3	0.15	0.2	0.4	-
NP-H5	1	0.3	0.3	0.2	-	-
NP-H6	1	0.3	0.3	0.2	0.4	-
NP-H7	1	0.3	0.6	0.2	-	-
NP-H8	1	0.3	0.6	0.2	0.4	-
CURNP-H1	1	0.3	-	0.2	-	0.01
CURNP-H2	1	0.3	-	0.2	0.4	0.01
CURNP-H3	1	0.3	0.15	0.2	-	0.01
CURNP-H4	1	0.3	0.15	0.2	0.4	0.01
CURNP-H5	1	0.3	0.3	0.2	-	0.01
CURNP.H6	1	0.3	0.3	0.2	0.4	0.01
CURNP-H7	1	0.3	0.6	0.2	-	0.01
CURNP-H8	1	0.3	0.6	0.2	0.4	0.01

2.5 Técnicas de caracterización

A continuación, se describirá las técnicas de caracterización a emplear.

2.5.1 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se ha utilizado la microscopía de fuerza atómica (AFM) para evaluar la morfología y medir las dimensiones de las nanopartículas de almidón (Torres et al., 2015). Boyd et al. (2011) y Boufi et. al (2018) concluyeron que los resultados de las pruebas del AFM son coherentes con los

resultados obtenidos de la técnica del DLS. Los resultados de la AFM son confiables siempre que se evite la aglomeración y la degradación de las nanopartículas (Boyd y Cuenat, 2011). Por consiguiente, las pruebas fueron realizadas después de la sonicación¹ y filtración de las muestras para evitar la aglomeración de las nanopartículas.

La preparación de la muestra inicia con la dispersión de nanopartículas de almidón en etanol absoluto a una concentración de 5 mg/mL. Posteriormente, la suspensión fue sometida a sonicación 3 veces con una potencia de 60 W y una amplitud de 20% en intervalos de 2 min. La suspensión es filtrada por un filtro de jeringa de 0.22 μm con la finalidad de remover las impurezas y agrupaciones de las nanopartículas. Se vierte una gota de la suspensión sobre un disco de mica adherido a un disco de metal. Finalmente, la muestra se deja secando a 30 °C durante 2 horas en un horno. El proceso de preparación de la muestra se representó gráficamente en la Figura 26.

Se usó un microscopio de fuerza atómica Nanosurf Easyscan 2 equipado con un voladizo con una constante de resorte nominal de 48 N/m y un radio de punta de 7 nm en modo dinámico (Figura 27). La morfología de las nanopartículas se observó a temperatura ambiente con una velocidad de barrido de 1.5 líneas por segundo y una resolución de 256 puntos por línea sobre un área de exploración inicial de 50 x 50 μm .

¹ Sonicación: Proceso de aplicar energía sonora para agitar las partículas en un líquido. Se realiza dicho proceso mediante un homogeneizador ultrasónico o un baño ultrasónico con la finalidad de homogeneizar, desaglomerar y dispersar las partículas.

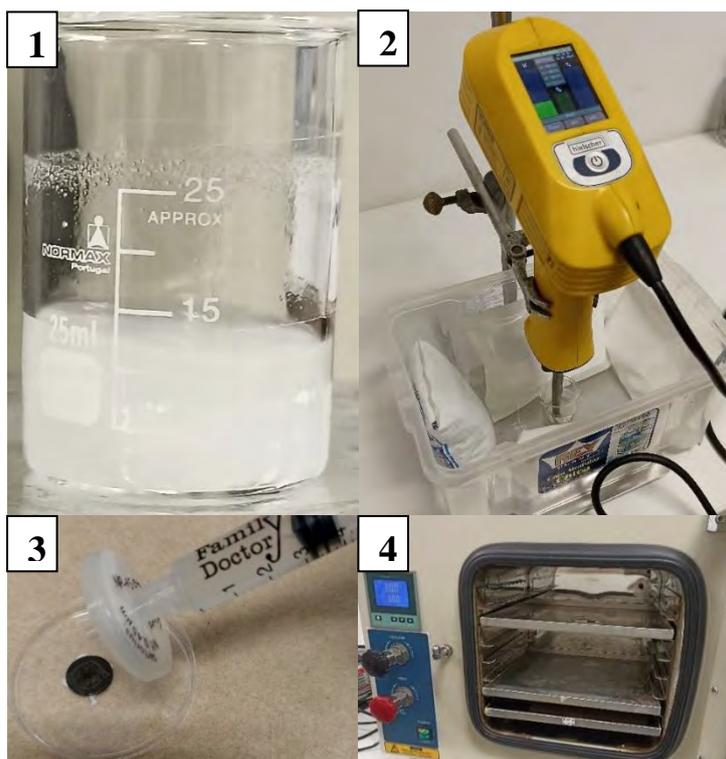


Figura 26 Preparación de las muestras para ensayos de AFM

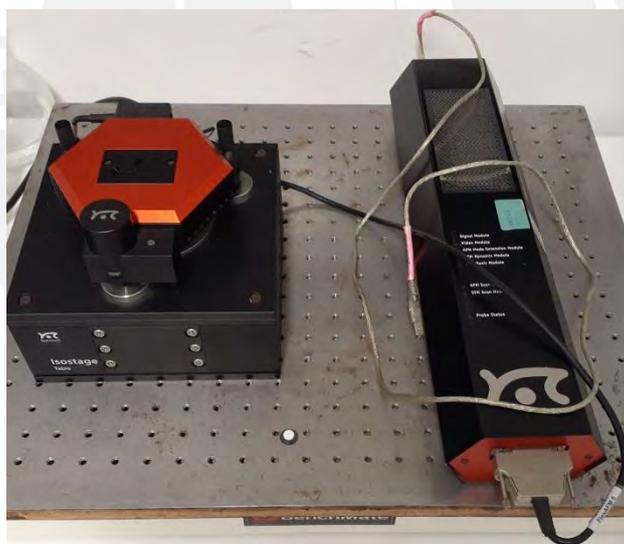


Figura 27 Microscopio de fuerza atómica (AFM) Nanosurf Easyscan 2

2.5.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Los ensayos de dispersión dinámica de luz fueron realizados usando un Malvern Nano-Zetasizer S90 Instrument que se visualiza en la Figura 28. Se dispersaron 30 mg de nanopartículas en 10 mL de agua destilada mediante agitación magnética a 400 rpm durante un

día. Después, la suspensión fue sometida a sonicación 3 veces con una potencia de 60 W y una amplitud de 20% en intervalos de 30 segundos. La suspensión es filtrada a través de un filtro de jeringas de $0.22 \mu m$ con la finalidad de remover las impurezas y agrupaciones de las nanopartículas. Se introdujeron cuidadosamente gotas de la suspensión en una cubeta descartable para evitar la formación de burbujas. Finalmente, se ubica dicha cubeta en el analizador de tamaño de partículas. Se midió 3 veces el tamaño y la distribución de tamaños de las nanopartículas, y cada medición se obtuvo cada 15 corridas de escaneo. La preparación de la muestra antes de ser escaneado se visualiza en la Figura 29.



Figura 28 Analizador de tamaño de partículas NanoS90 mediante dispersión dinámica de luz (DLS)

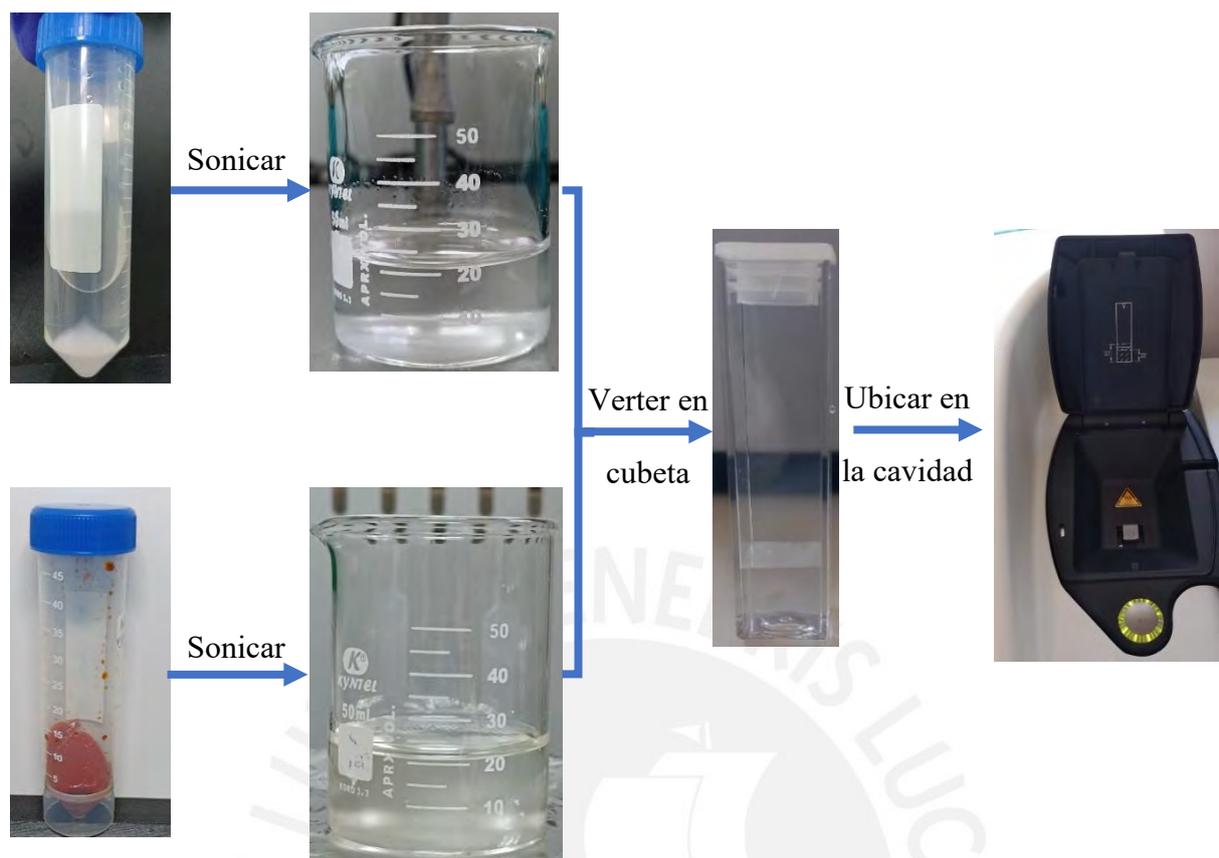


Figura 29 Imagen representativa de la preparación y caracterización de las muestras por DLS

2.5.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La técnica DSC permite caracterizar térmicamente los gránulos de almidón y las nanopartículas ya que identifica el proceso de gelatinización de las muestras de almidón en los termogramas del ensayo como el pico o la transición endotérmicos (Lecorre et al., 2012; Torres et al., 2011).

En el almidón, el proceso de gelatinización ocurre cuando una suspensión de almidón es calentada, y causa la hinchazón de los gránulos, la solubilización del almidón y el aumento de la viscosidad.

Asimismo, esta técnica es usada para investigar cualquier interacción fisicoquímica entre el fármaco y la matriz polimérica. La ausencia del pico de fusión del fármaco en el termograma DSC es generalmente un signo del estado amorfo del fármaco cargado por el polímero. Además, se identifica la diferencia del comportamiento térmico de la formulación desarrollada

con el del polímero y el fármaco mediante la visualización de los desplazamientos de los picos endotérmicos y exotérmicos.

Antes de realizar la caracterización, se requiere armar una portamuestra que contiene 8 mg de nanopartículas de almidón y otra portamuestra vacía que se utiliza como referencia. Cada portamuestra consiste de una tapa y una base de aluminio. Luego de armar cada portamuestra, se aplicó presión mediante la prensa manual a cada portamuestra para asegurar la hermeticidad.

La Figura 30 muestra el esquema de elaboración de portamuestras para ensayos DSC.

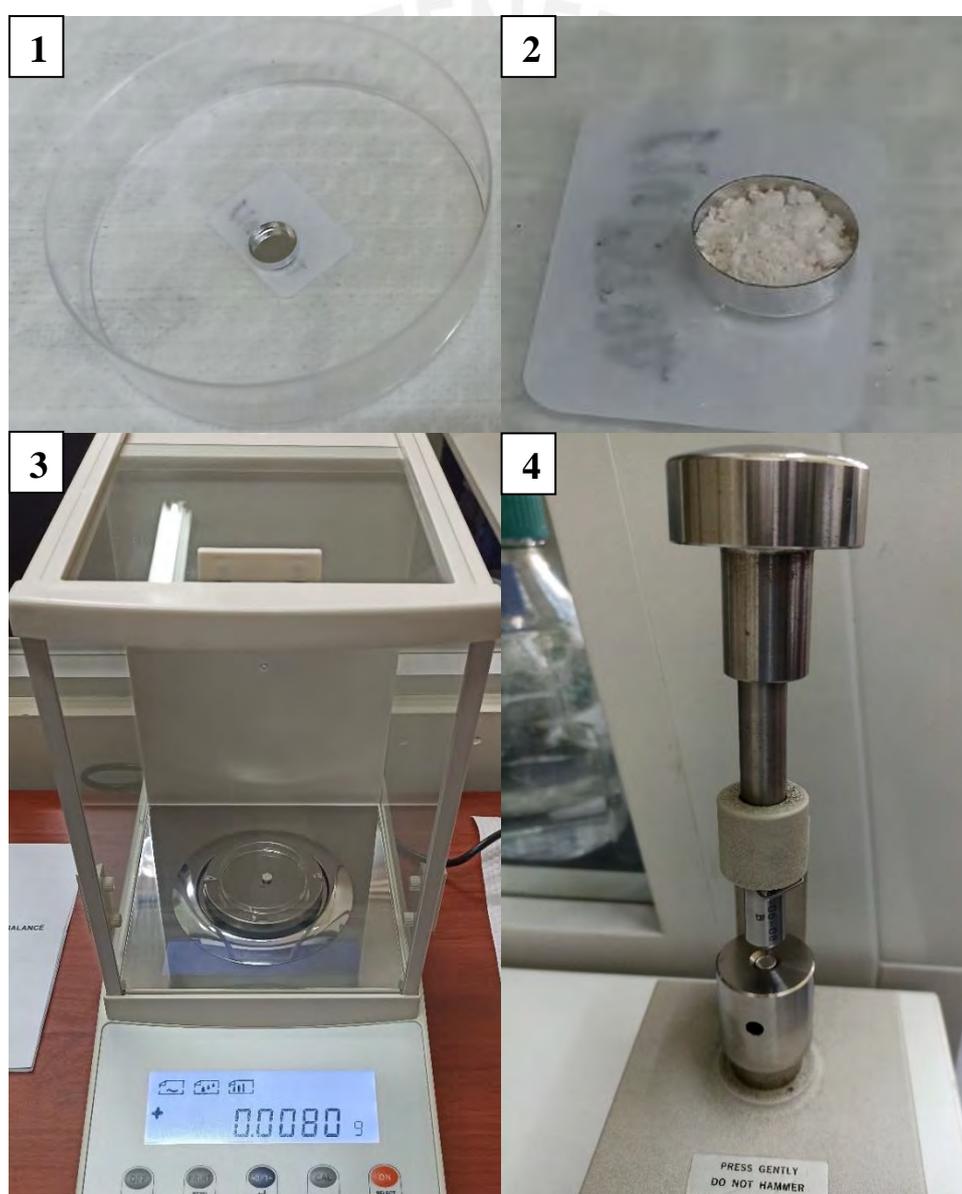


Figura 30 Esquema de elaboración de portamuestras para ensayos de DSC

Posteriormente, se encendió el calorímetro diferencial de barrido, modelo DSC 4000 de la marca Perkin Elmer, mostrado en la Figura 31. Luego, se ubicó cada portamuestra en el espacio correspondiente de la cámara del calorímetro (Figura 32). Finalmente, se obtuvo los termogramas de las nanopartículas fabricadas desde 30 hasta 250°C a una velocidad de escaneo de 5°C/min. Todas las medidas fueron realizadas con un flujo de 20 mL/min de nitrógeno atmosférico.



Figura 31 Calorímetro diferencial de barrido, modelo DSC 4000 de la marca Perkin Elmer

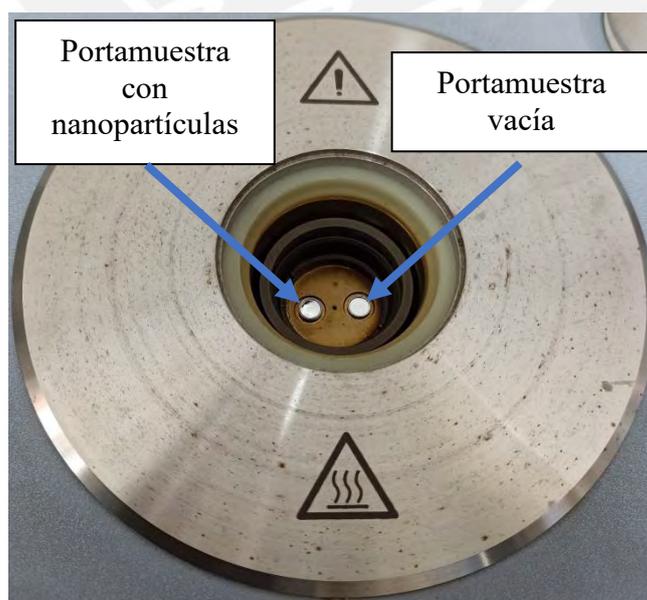


Figura 32 Ubicación de las portamuestras ubicadas en el calorímetro diferencial de barrido

2.5.4 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR del fármaco puro y de las nanopartículas cargadas con fármaco pueden obtenerse mediante esta técnica para comprobar la interacción fármaco-polímero y la estabilidad del fármaco (El-Houssiny et al. 2016). Cualquier desaparición de los picos FTIR del fármaco cargado indica la interacción entre el fármaco y el polímero (El-Houssiny et al, 2016).

Se usó el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) del equipo de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), modelo Spectrum Two de la marca Perkin Elmer, mostrado en la Figura 33. Las muestras secas fueron colocadas entre el accesorio ATR y el cristal de diamante. Se obtuvieron los espectros de las muestras al realizar un barrido desde 500 hasta 4000 cm^{-1} a temperatura ambiente con 8 barridos a una resolución de 8 cm^{-1} .



Figura 33 Accesorio ATR acoplado al equipo FTIR, modelo Spectrum Two de la marca Perkin Elmer.

2.5.5 Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)

Las nanopartículas cargadas con curcumina fueron separadas del medio líquido por centrifugación y la absorbancia ultravioleta de la curcumina remanente en el sobrenadante fue medido usando un espectrómetro UV-Vis.

La concentración de curcumina remanente en el sobrenadante se calculó en base a una ecuación de regresión lineal de una curva de calibración estándar. Para ello, se analizó la longitud de onda máxima, λ_{max} , en función de cada tipo de sistema. Luego, las curvas de calibración estándar fueron graficadas con al menos 4 concentraciones de curcumina establecidas, entre 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$, y sus respectivos valores de absorbancia UV hallados en cada longitud de onda máxima, λ_{max} .

Las soluciones estuvieron compuestas de agua (H_2O), etanol (EtOH), hidróxido de sodio (NaOH) y urea. Las cantidades de los materiales usados para la preparación de cada solución se muestran en la Tabla 4. La preparación de cada solución inicia con la disolución de la urea y del NaOH en agua destilada. Finalmente, el etanol se vierte en la solución acuosa.

Tabla 4: Cantidades referenciales de los materiales usados en la preparación de cada solución con un volumen final de 0.5 L

Solución	Urea (g)	NaOH (g)	H_2O (mL)	EtOH (mL)
NaOH + H_2O + EtOH	0	0.75	250	250
NaOH + 0.15 g Urea + H_2O + EtOH	0.375	0.75	250	250
NaOH + 0.3 g Urea + H_2O + EtOH	0.75	0.75	250	250
NaOH + 0.6 g Urea + H_2O + EtOH	1.5	0.75	250	250

El porcentaje de eficiencia de carga (EC) de la curcumina en las nanopartículas de almidón fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de carga (\%)} = \frac{CUR_{total}(mg) - CUR_{libre}(mg)}{CUR_{total}(mg)} \times 100$$

$$\text{Capacidad de carga } \left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{CUR_{total}(mg) - CUR_{libre}(mg)}{\text{masa total de las nanopartículas (g)}}$$

donde CUR_{total} es la masa de curcumina usada en la fabricación de los sistemas cargados de curcumina y CUR_{libre} es la masa de la curcumina remanente en el sobrenadante después de la centrifugación.



CAPÍTULO 3

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Porcentajes de rendimiento de almidón

En base al proceso descrito en el procedimiento de extracción de almidón de la Sección 2.1, se extrajo exitosamente el almidón a partir de la papa de variedad Huamantanga. Se obtuvo en promedio 13.45 ± 1.675 % de rendimiento de extracción del almidón. Los gránulos de almidón secos se muestran en la Figura 34.



Figura 34 Imagen representativa del almidón seco obtenido a partir de la papa de variedad Huamantanga

3.2 Porcentaje de rendimiento de las nanopartículas de almidón

Se logró fabricar exitosamente las nanopartículas de almidón con y sin carga de curcumina como se aprecia en la Figura 35. Los valores de rendimiento de extracción de las nanopartículas fabricadas se muestran en la Tabla 5.

El rendimiento de extracción de las nanopartículas de almidón preparadas sin la adición del tripolifosfato de sodio (NP-H1, NP-H3, NP-H5 y NP-H7) disminuye desde 91.73 hasta 56.43%. El rendimiento de extracción de las nanopartículas preparadas usando el agente entrecruzante (NP-H2, NP-H4, NP-H6 y NP-H8) disminuye desde 93.63 hasta 65.12%. Además, el rendimiento del método usado para preparar nanopartículas de almidón no

entrecruzadas cargadas con 10 mg de curcumina (CURNP-H1, CURNP-H3, CURNP-H5 y CURNP-H7) disminuye desde 89.55 hasta 54.77%. La misma tendencia sucede con las nanopartículas de almidón entrecruzadas cargadas con curcumina (CURNP-H2, CURNP-H4, CURNP-H6 y CURNP-H8), cuyos rendimientos de extracción disminuyeron desde 92.5 hasta 62.24 %, respectivamente. Es decir, a medida que incrementa la concentración de urea, se obtiene menos rendimiento de extracción de nanopartículas fabricadas.

El rendimiento del método usado para fabricar nanopartículas cargadas con curcumina fue ligeramente menor que el método usado para preparar nanopartículas de almidón nativo, a excepción de las nanopartículas CURNP-H5. Por ejemplo, el rendimiento de extracción de NP-H3 fue 80.24 y el del CURNP-H3 fue 79.51 %.

Se puede inferir que mientras más aumente la concentración de curcumina y urea, es posible que el sistema se sature y, en consecuencia, el rendimiento disminuya.

Por otro lado, al comparar las nanopartículas entrecruzadas y no entrecruzadas fabricadas con la misma concentración de urea y curcumina, se puede observar que el rendimiento de extracción de las nanopartículas preparadas usando agente entrecruzante es mayor, por ejemplo, el rendimiento de extracción de CURNP-H2 fue 92.5, el cual fue mayor al 89.55% de rendimiento de CURNP-H1. Se puede inferir que mientras más agente entrecruzante se adicione, el rendimiento aumente.

Se obtuvieron rendimientos de extracción de nanopartículas de almidón entre 54.77 y 93.63 %. Momenpoor et. al (2019) y Dong et. al (2022) reportaron rendimientos de extracción de nanopartículas de almidón, fabricadas mediante nanoprecipitación, de 92 y 94 %, respectivamente.



Figura 35 Nanopartículas de almidón (a) y nanopartículas de almidón cargadas con curcumina (b)

Tabla 5: Valores obtenidos después del secado de las nanopartículas del almidón a partir de las papas de variedad Huamantanga

	STPP (g) Urea (g)	0			0.4		
		$W_{aditivos}$ (g)	W_{seco} (g)	Rendimiento (%)	$W_{aditivos}$ (g)	W_{seco} (g)	Rendimiento (%)
NP-H	0	1	0.9173 ± 0.0243	91.73 ± 2.43	1.4	1.3109 ± 0.0088	93.63 ± 0.63
	0.15	1.15	0.9228 ± 0.0148	80.24 ± 1.29	1.55	1.3108 ± 0.0309	84.56 ± 1.99
	0.3	1.3	0.8727 ± 0.0197	67.13 ± 1.52	1.7	1.2949 ± 0.0012	76.17 ± 0.07
	0.6	1.6	0.9028 ± 0.0222	56.43 ± 1.39	2	1.3024 ± 0.0402	65.12 ± 2.01
CURNP-H	0	1.01	0.9045 ± 0.0134	89.55 ± 1.32	1.41	1.3043 ± 0.0350	92.5 ± 2.48
	0.15	1.16	0.9223 ± 0.0165	79.51 ± 1.43	1.56	1.2863 ± 0.0231	82.46 ± 1.48
	0.3	1.31	0.9126 ± 0.0263	69.66 ± 2.01	1.71	1.2808 ± 0.0004	74.9 ± 0.02
	0.6	1.61	0.8818 ± 0.0442	54.77 ± 2.74	2.01	1.2511 ± 0.0395	62.24 ± 1.97

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterización del tamaño de las nanopartículas

Se puede visualizar en la Tabla 6 que hay un incremento en el tamaño de las nanopartículas de almidón, NP-H, al adicionar tripolifosfato de sodio. Este resultado está acorde con lo reportado por Torres et. al (2019) quienes notificaron el aumento de tamaño de nanopartículas de almidón de papa al agregar STPP. En el caso de las nanopartículas cargadas con curcumina, CURNP-H, se aprecia la misma tendencia, a excepción de la fórmula preparada con 0.15g de urea y STPP (CURNP-H4) con tamaño de 65 nm, el cual es menor al tamaño de 70 nm de la fórmula preparada con 0.15 g de Urea sin STPP (CURNP-H3). El Feky et. al (2015) también reportó el aumento del tamaño de nanopartículas de almidón cargadas con fármaco indometacina al incrementar la concentración de STPP.

Se aprecia un aumento del tamaño e índice de polidispersidad (PdI) de las nanopartículas de almidón fabricadas sin STPP al ser cargadas con curcumina. Los valores del índice de polidispersidad (PdI) de las nanopartículas de almidón fabricadas sin STPP ni curcumina están entre 0.213 y 0.262, mientras que los valores de las nanopartículas no entrecruzadas cargadas con curcumina están entre 0.331 y 0.386. En el caso de las nanopartículas de almidón fabricadas con STPP, se aumenta el tamaño al adicionar la curcumina en las fórmulas preparadas con 0.3 g de urea (CURNP-H5) y sin urea (CURNP-H1). No hay una influencia de la carga de la curcumina en el PdI de las nanopartículas entrecruzadas.

Los valores del índice de polidispersidad (PdI) de todas las nanopartículas fabricadas están entre 0.213 y 0.386, lo que demuestra una distribución de tamaño homogénea. La Figura 36 muestra las gráficas de distribución de tamaños de las nanopartículas NP-H1 y CURNP-H1.

Tabla 6: Tamaño de la partícula, Pdl, potencial zeta, eficiencia de carga y capacidad de carga de las nanopartículas de almidón

	STPP (g) Urea (g)	0		0.4	
		d (nm)	PdI	d (nm)	PdI
NP-H	0	45.93 ± 0.3656	0.255 ± 0.004	49.81 ± 1.108	0.338 ± 0.005
	0.15	63.86 ± 1.200	0.262 ± 0.006	69.13 ± 1.053	0.256 ± 0.007
	0.3	61.29 ± 0.8905	0.242 ± 0.007	63.82 ± 1.021	0.214 ± 0.002
	0.6	61.99 ± 1.187	0.213 ± 0.007	74.11 ± 0.8056	0.256 ± 0.007
CURNP-H	0	53.35 ± 0.5341	0.386 ± 0.012	56.02 ± 0.9696	0.305 ± 0.021
	0.15	70.32 ± 0.1353	0.331 ± 0.034	65.06 ± 1.073	0.238 ± 0.006
	0.3	62.75 ± 1.538	0.371 ± 0.013	73.98 ± 1.182	0.263 ± 0.009
	0.6	68.51 ± 1.132	0.349 ± 0.035	69.36 ± 1.067	0.245 ± 0.011

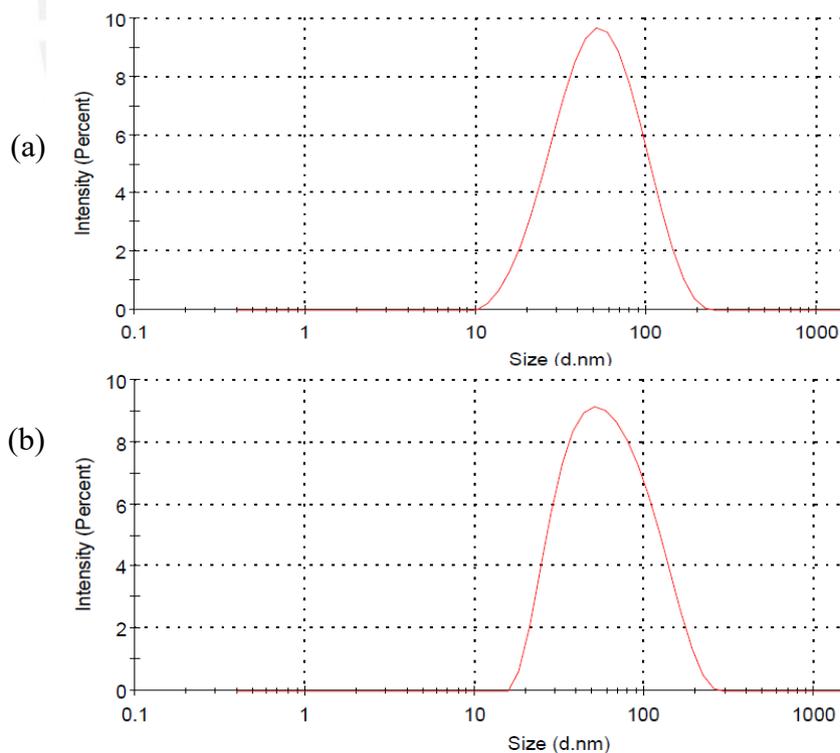


Figura 36 Distribución de tamaños representativos de las nanopartículas de almidón NP-HI (a) y CURNP-HI

(b)

3.3.2 Eficiencia de carga y capacidad de carga de los sistemas de nanopartículas cargadas con curcumina

Se muestra en la Tabla 7 las ecuaciones de las curvas de calibración estándar obtenidas luego de medir las absorbancias UV de la curcumina disuelta a concentraciones de 1, 3, 5, 7, 8 y 10 $\mu\text{g/mL}$ en cada uno de los 4 tipos de soluciones preparadas. Además, se muestran las gráficas de las curvas en la Figura 37, 38, 39 y 40 que cuentan con al menos 4 puntos de concentración. La absorbancia de la curcumina remanente en cada sobrenadante fue medida a la longitud de onda máxima λ_{Max} de la solución con la que se prepararon las nanopartículas.

Tabla 7: Ecuaciones de curvas de calibración estándar

Solución	Ecuación	λ_{Max} (nm)
NaOH + H_2O + EtOH	$Y = 0.0829 X - 0.0005$	463.98
NaOH + 0.15 g Urea + H_2O + EtOH	$Y = 0.1232 X + 0.0217$	468.29
NaOH + 0.3 g Urea + H_2O + EtOH	$Y = 0.2015X - 0.0042$	467.12
NaOH + 0.6 g Urea + H_2O + EtOH	$Y = 0.1299X + 0.0135$	468.73

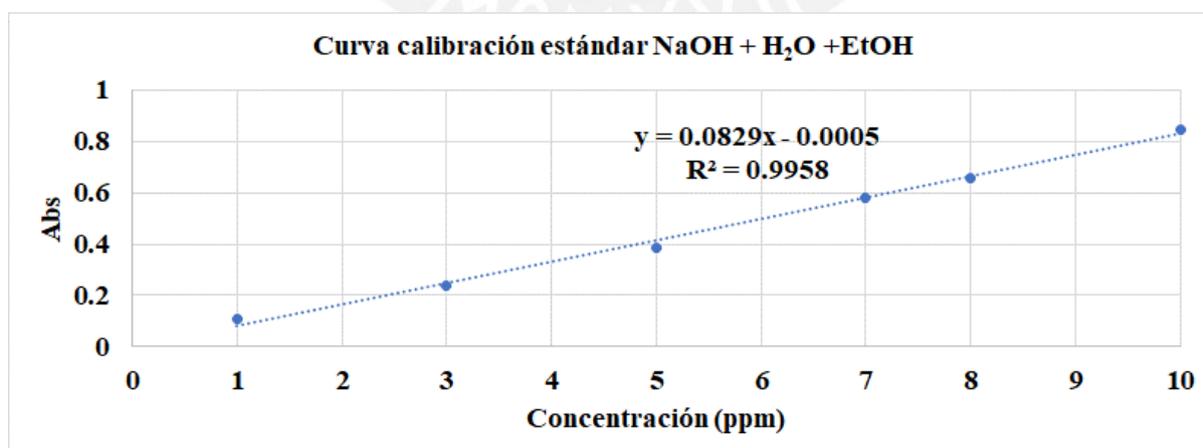


Figura 37 Gráfica de la curva de calibración estándar de la curcumina disuelta en NaOH + H_2O + EtOH

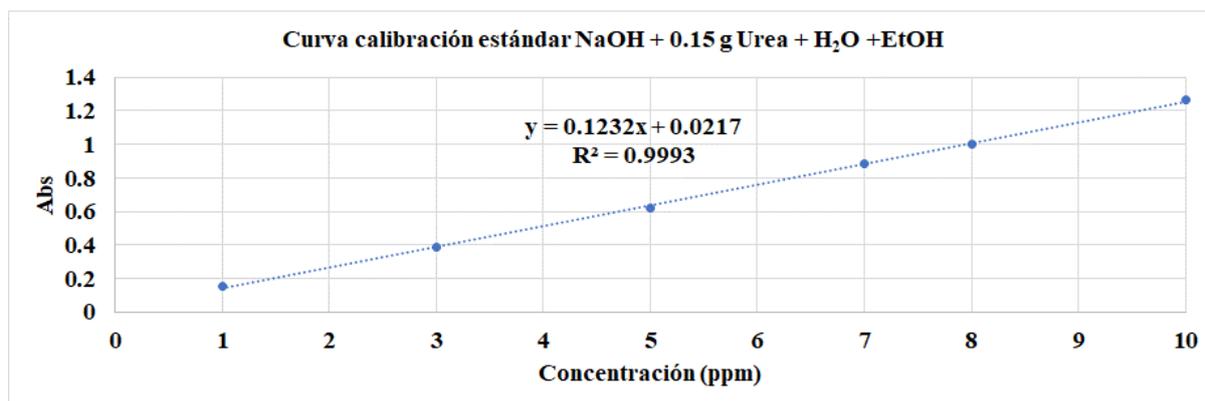


Figura 38 Gráfica de la curva de calibración estándar de la curcumina disuelta en NaOH + 0.15 g Urea + H₂O + EtOH

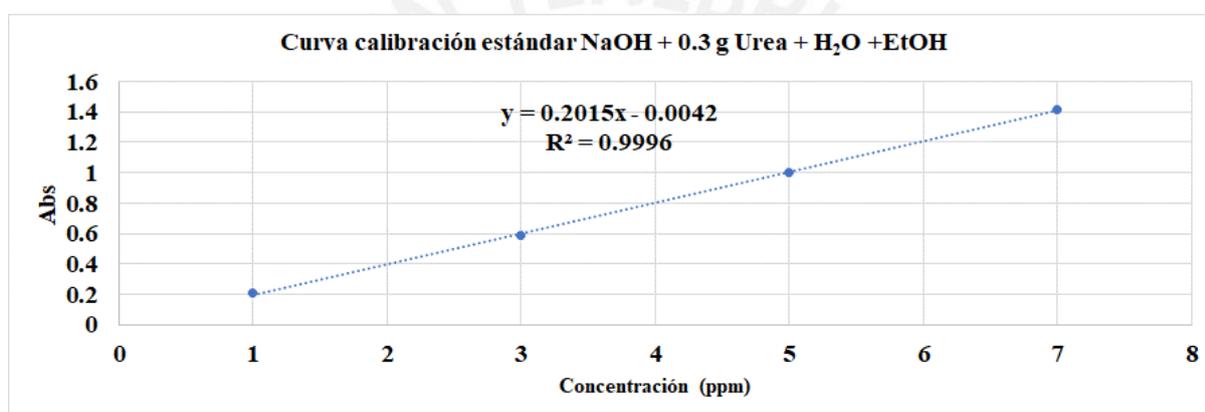


Figura 39 Gráfica de la curva de calibración estándar de la curcumina disuelta en NaOH + 0.3 g Urea + H₂O + EtOH

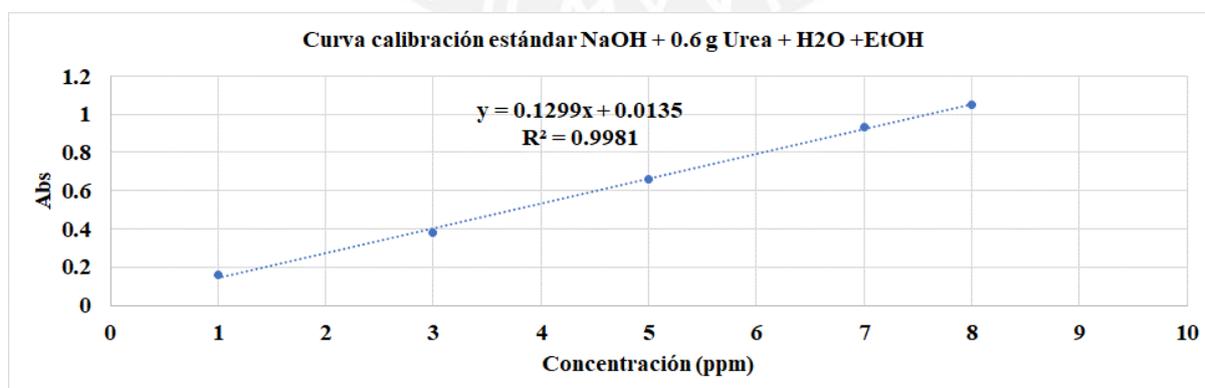


Figura 40 Gráfica de la curva de calibración estándar de la curcumina disuelta en NaOH + 0.6 g Urea + H₂O + EtOH

Se visualiza en la Tabla 8 los valores de la eficiencia de carga y la capacidad de carga de las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina con diferentes concentraciones de urea y tripolifosfato de sodio. Se demuestra que al adicionar el STPP en las nanopartículas fabricadas con y sin urea, se incrementa la eficiencia de carga de la curcumina. Miskeen et. al (2021) reportaron que las nanopartículas de almidón entrecruzadas con ácido cítrico cargaron 144.9 μg de curcumina en las matrices de los sistemas cargados, valor superior a los 75.7 μg de curcumina cargados por las nanopartículas no entrecruzadas, debido a la mayor formación de enlaces de hidrógeno entre la curcumina y las nanopartículas, causada por la presencia de los grupos carbonilos en las nanopartículas entrecruzadas. En la presente tesis, se demuestra la existencia de grupos $\text{P}=\text{O}$ y PO_2^- en las nanopartículas de almidón entrecruzadas con STPP, quienes pueden formar mayor presencia de curcumina mediante la mayor cantidad de enlaces de hidrógeno, lo que explicaría el aumento de la eficiencia de carga con la adición del STPP. Se esquematiza la interacción entre la curcumina y las nanopartículas de almidón en la Figura 41.

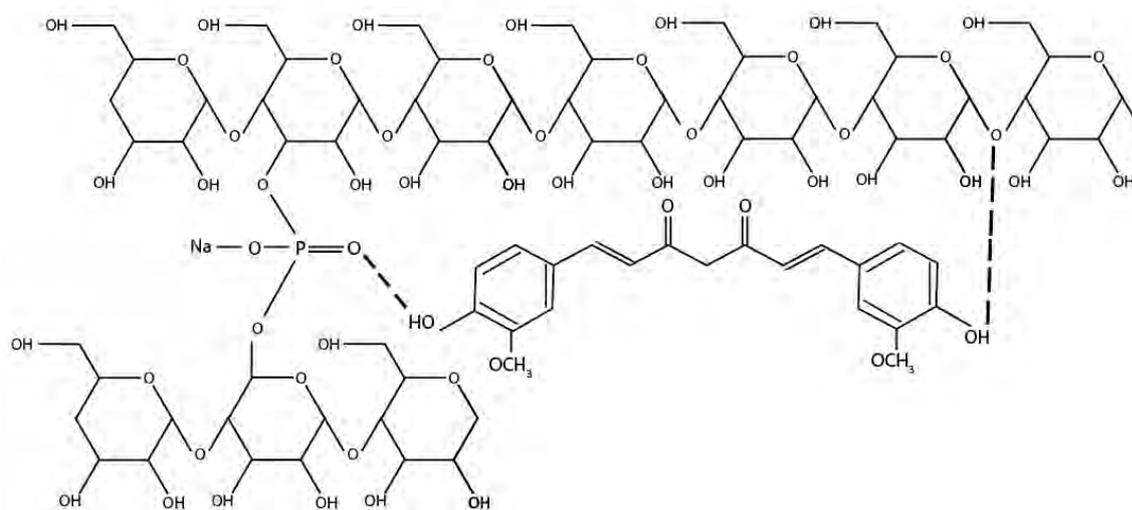


Figura 41 Esquema representativo de la interacción entre la curcumina y las moléculas de almidón. Inspirado de El-Naggar et. al (2015)

Tabla 8: Eficiencia de carga (EC) y capacidad de carga de las nanopartículas de almidón cargados con curcumina

	STPP (g) Urea (g)	0		0.4	
		EC (%)	CC (mg/g)	EC (%)	CC (mg/g)
CURNP- H	0	35.16±0.85	3.85±0.09	65.21±3.26	5.1±0.25
	0.15	72.55±0.47	7.97±0.05	86.35±0.23	6.63±0.02
	0.3	20.15±0.2	2.16±0.02	42.49±0.03	3.32±0.002
	0.6	44.66±0.48	5.25±0.06	53.31±0.23	4.36±0.02

3.3.3 Caracterización de las nanopartículas de almidón mediante FTIR-ATR

En la Figura 42, se muestran los espectros de las nanopartículas de almidón no entrecruzadas que presentan grupos -OH libres o enlazados inter o intramolecularmente y grupos C-O-C de los anillos glucosos a 3286 y 1016 cm^{-1} , respectivamente (Hebeish et. al, 2014; El Naggar et. al, 2015; Li et. al, 2016). Los picos que aparecen entre 940 y 1060 cm^{-1} están asociados a las vibraciones de estiramiento de C-C y C-O, y de flexión de los enlaces C-H (Li et. al, 2016; Miskeen et. al, 2021).

La diferencia entre los espectros está en la intensidad de los picos. La adición de la urea en la fabricación de las nanopartículas disminuye la intensidad de todos los picos en el siguiente orden: $0.3\text{g Urea} > 0.15\text{ g Urea} > 0.6\text{ g Urea}$. Hebeish et. al (2014) y Momenpoor et. al (2019) reportaron una disminución de intensidad de los picos de las nanopartículas de almidón fabricadas por nanoprecipitación comparado al almidón, y concluyeron que la estructura de las nanopartículas era bastante similar el almidón.

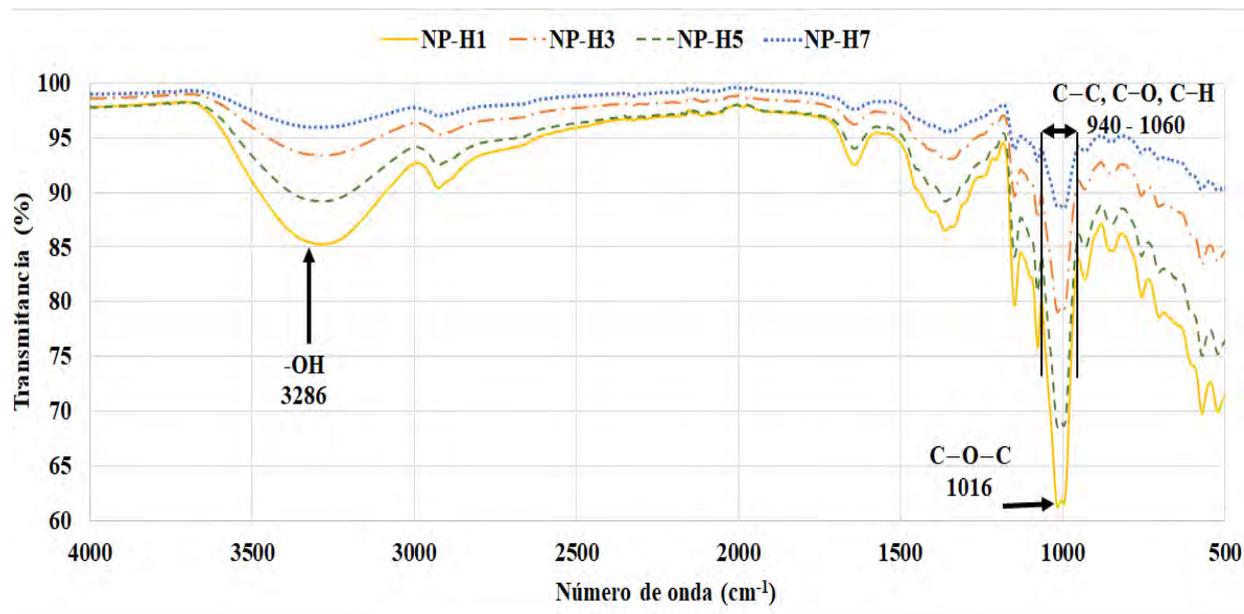


Figura 42 Espectros representativos FTIR de las nanopartículas no entrecruzadas: NP-H1 (sin urea), NP-H3 (0.15 g Urea), NP-H5 (0.3 g Urea), NP-H7 (0.6 g Urea)

A diferencia de los espectros FTIR de las nanopartículas no entrecruzadas, se distingue la aparición de tres picos a 1210 , 1150 y 890 cm^{-1} en los espectros de las nanopartículas entrecruzadas que se muestran en la Figura 43. El Naggar et. al (2015) reportaron que la aparición de un pico a 1212 cm^{-1} en el espectro FTIR de nanopartículas de almidón entrecruzadas con tripolifosfato de sodio correspondía a las vibraciones de estiramiento antisimétricas de los grupos PO_2^- presentes en los iones de tripolifosfato, el cual demostraba la formación de entrecruzamientos entre los grupos hidróxilo del almidón y los iones del entrecruzante (STPP). Además, identificaron otro pico a 1159 cm^{-1} , que está relacionado con el enlace $P=O$ del agente entrecruzante. Rodrigues et. al (2012) reportaron que un pico a 906 cm^{-1} en el espectro del tripolifosfato de sodio está relacionado a la presencia del enlace $P-O$. Adicionalmente, observaron un pico a 894 cm^{-1} en los espectros de nanopartículas fabricadas con quitosano y carragenina, entrecruzadas con tripolifosfato de sodio, e indicaron que la aparición de ese pico podía ser atribuido al desplazamiento del pico a 906 cm^{-1} del agente entrecruzante.

A partir de lo mencionado se puede identificar, en los espectros de las nanopartículas de almidón entrecruzadas, que las vibraciones de los grupos PO_2^- , P=O y P-O aparecen a 1210, 1150 y 890 cm^{-1} , respectivamente.

Además, la adición del tripolifosfato de sodio en el desarrollo de las nanopartículas de almidón causa la aparición de dos picos a 3368 y 3258 cm^{-1} como bien se aprecia en la Figura 43.

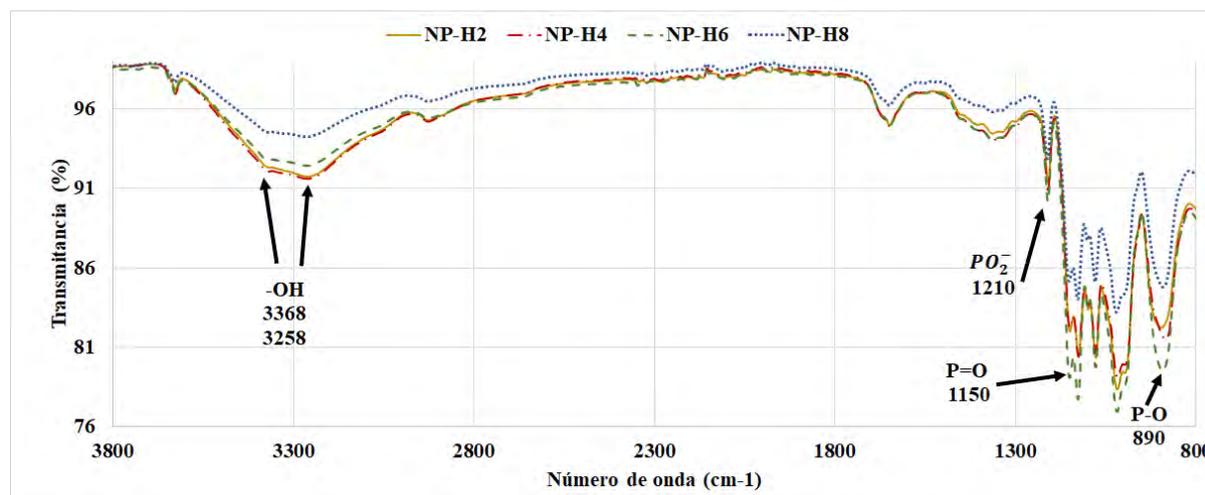


Figura 43 Espectros representativos FTIR de las nanopartículas entrecruzadas: NP-H2 (sin urea), NP-H4 (0.15 g Urea), NP-H6 (0.3 g Urea), NP-H8 (0.6 g Urea)

La intensidad del pico a 3286 cm^{-1} en los espectros de las nanopartículas no entrecruzadas NP-H1 y NP-H5 es mayor a la intensidad de los picos a 3368 y 3258 cm^{-1} de las nanopartículas entrecruzadas NP-H2 y NP-H6. Según El Naggar et. al (2015), este cambio es atribuido a la ruptura de los enlaces de hidrógeno, producto del entrecruzamiento. Por otro lado, al comparar los espectros de las nanopartículas no entrecruzadas NP-H3 y NP-H7 con los espectros de las nanopartículas entrecruzadas NP-H4 y NP-H8, la intensidad del pico a 3286 cm^{-1} es menor a la intensidad de los picos a 3368 y 3258 cm^{-1} . La Figura 44 muestra la comparación de los espectros de las nanopartículas no entrecruzadas NP-H1 y NP-H3 con los espectros de las nanopartículas entrecruzadas NP-H2 y NP-H4.

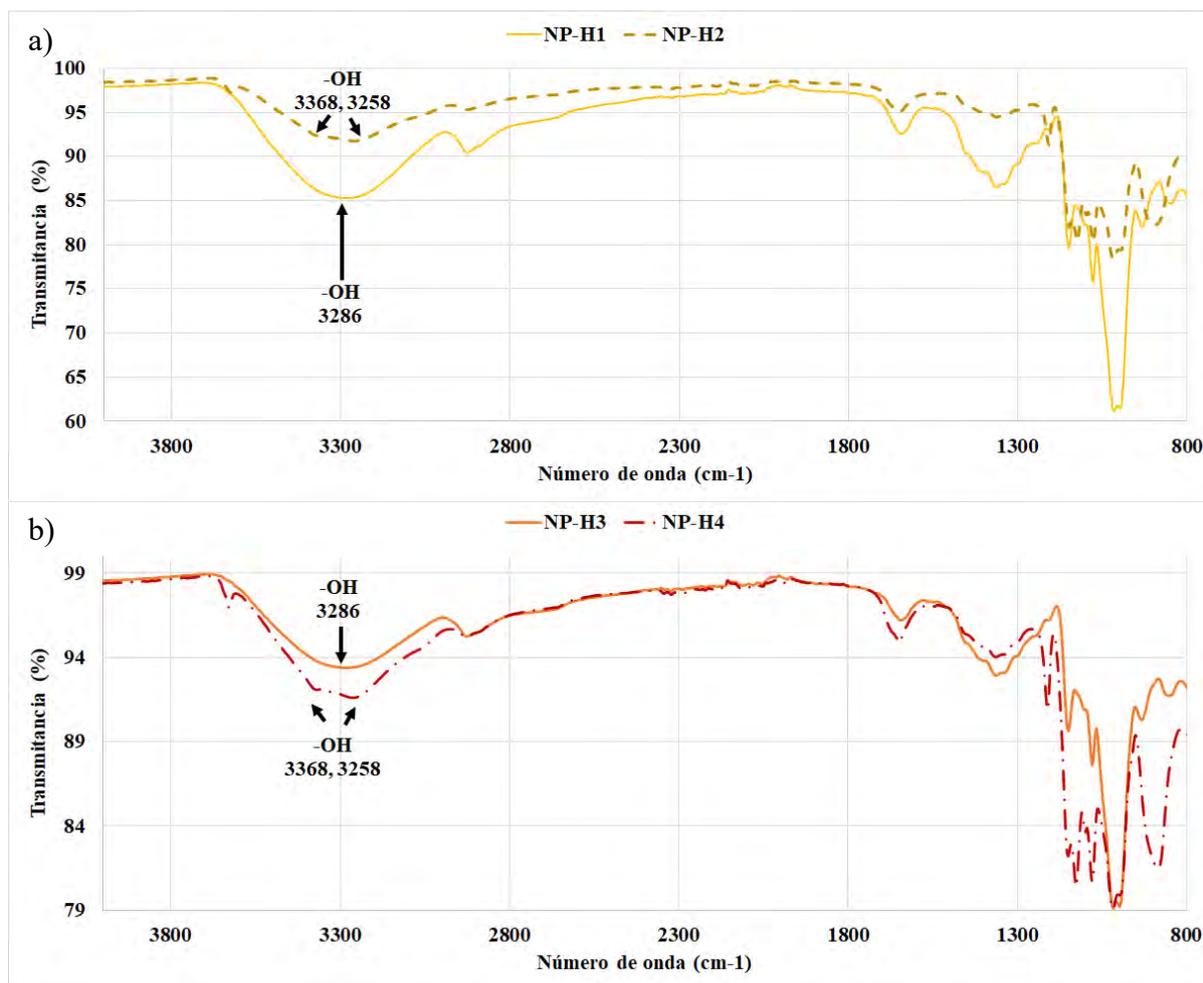


Figura 44 Comparación entre los espectros representativos de las nanopartículas NP-H1 y NP-H2 (a), y NP-H3 y NP-H4 (b)

El pico a 3507 cm^{-1} , característico de los grupos -OH del anillo bencénico de la curcumina, desaparece en todos los espectros de las nanopartículas cargadas con curcumina, mostrados en la Figura 45. Se ha reportado en otros estudios que los picos característicos de las nanopartículas de almidón se superponen a los picos de la curcumina, lo que sugeriría que la curcumina estaría siendo encapsulada al interior de las nanopartículas de almidón (Li et. al, 2015; Pang et. al, 2015; Acevedo-Guevara et. al, 2018).

Se identificó un desplazamiento ligero de los picos de $890\text{ y }1018\text{ cm}^{-1}$ propios de las nanopartículas de almidón entrecruzadas sin carga hacia $900\text{ y }1023\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, en los espectros de las nanopartículas de almidón entrecruzadas cargadas con curcumina que

se aprecia en la Figura 45. El desplazamiento puede ser atribuido por la interacción entre la curcumina y las nanopartículas de almidón mediante enlaces de hidrógeno (Miskeen et. al, 2021; Li et. al, 2016). Por otro lado, Acevedo-Guevara et. al (2018) reportaron que la intensidad de los picos a 1017 cm^{-1} de los espectros de las nanopartículas de almidón nativo de plátano cargadas con curcumina era mayor a la de las nanopartículas de almidón, e indicaron que dicho comportamiento se debe a la interacción de la curcumina y nanopartículas de almidón que ocurre a través de los enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo de las unidades de glucosa. En el presente estudio, se observa un aumento y reducción de intensidad de los picos ubicados entre 940 y 1060 cm^{-1} por la carga de la curcumina en las nanopartículas de almidón cargadas. En el caso de las nanopartículas entrecruzadas, se visualiza un incremento y disminución del pico a 900 cm^{-1} . Esto sugiere que hay una interacción entre la curcumina y las nanopartículas de almidón al visualizar los cambios en la intensidad de los picos característicos de las nanopartículas fabricadas (Li et. al, 2016).

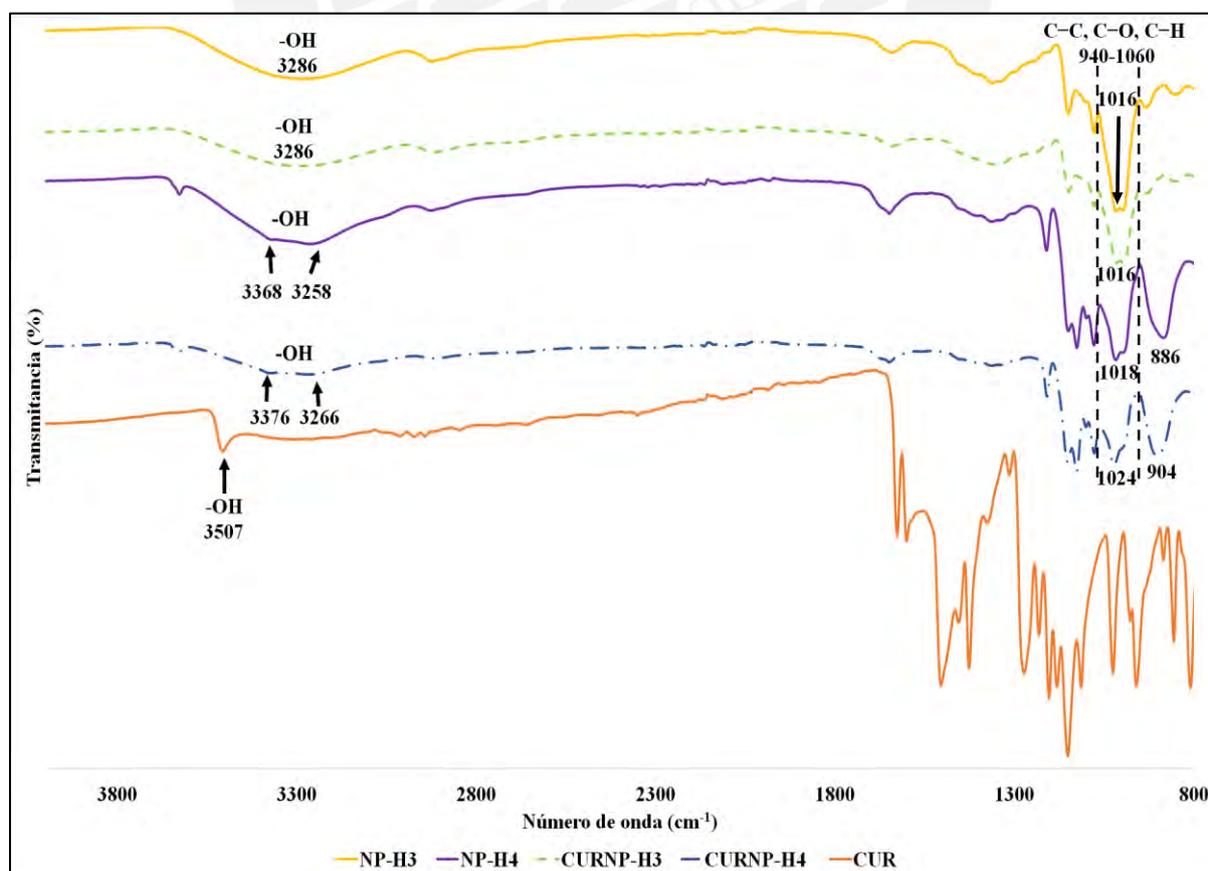


Figura 45 Espectros representativos FTIR de nanopartícula no entrecruzada de almidón NP-H3, nanopartícula entrecruzada de almidón NP-H4, nanopartícula no entrecruzada de almidón cargada con curcumina CURNP-H3, nanopartícula entrecruzada de almidón cargada con curcumina CURNP-H4 y curcumina

3.3.4 Caracterización térmica de las nanopartículas

Se visualiza un pico endotérmico en los termogramas de las nanopartículas de almidón fabricadas sin tripolifosfato de sodio, en el que se aprecian picos endotérmicos P_1 (Figura 46); mientras que los termogramas de las nanopartículas de almidón fabricadas con agente entrecruzante presentan 3 picos endotérmicos con picos P_1 , P_2 y P_3 (Figura 47). Sintov y Yariv (2022) han reportado también 3 picos endotérmicos en pruebas hechas con nanopartículas extraídas de almidón de maíz. Ellos asociaron los picos P_1 y P_2 a la disociación de las dobles hélices en la estructura cristalina de la amilopectina, seguido de las transiciones hélice-espiral, y el pico P_3 representa la fusión de los cristales de amilosa y complejos amilosa-lípido. Otros autores como Dong et. al (2022) reportaron que las nanopartículas de almidón, fabricadas por nanoprecipitación, exhiben dos regiones endotérmicas: la primera región que se registró entre 50 y 77 °C está relacionada con la fusión de los cristales de la amilopectina retrogradados, y la segunda que se apreció entre 120 y 162 °C corresponde a la reorganización de las moléculas de amilosa durante la formación de las nanopartículas.

En la Figura 46 se aprecian picos endotérmicos P_1 en 72.07 °C, 68.08, 66.97 y 64.89 °C con entalpías ΔH_1 de 227.6, 125.7, 178.5 y 160.3 J/g para NP-H1, NP-H3, NP-H5, NP-H7, respectivamente. Es decir, a medida que incrementa la concentración de la urea, disminuye la temperatura del P_1 . Además, el valor de mayor a menor entalpía ΔH_1 va en el siguiente orden: $\Delta H_{1NP-H1} > \Delta H_{1NP-H5} > \Delta H_{1NP-H7} > \Delta H_{1NP-H3}$. En otras palabras, la entalpía ΔH_1 de cualquier fórmula de fabricación que incluya urea es menor a la del NP-H1.

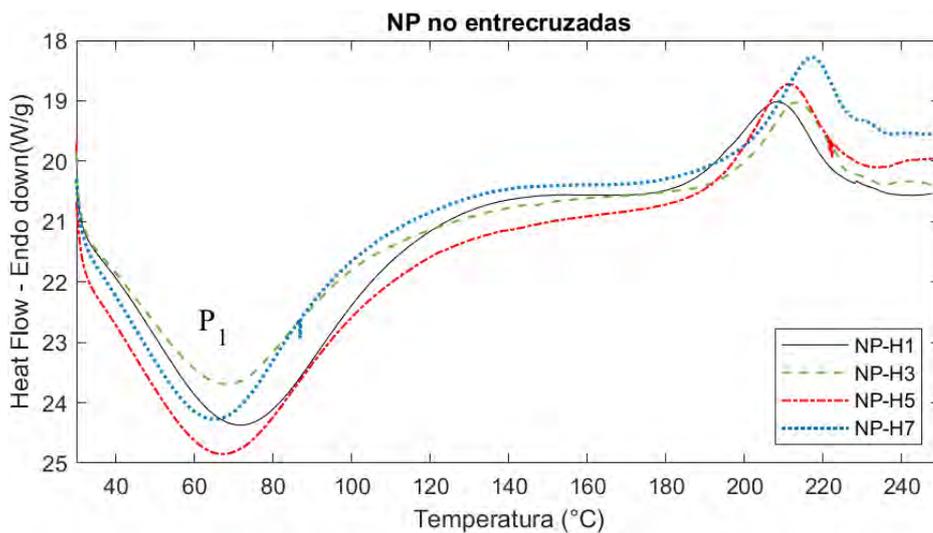


Figura 46 Termogramas representativos de las nanopartículas de almidón no entrecruzadas

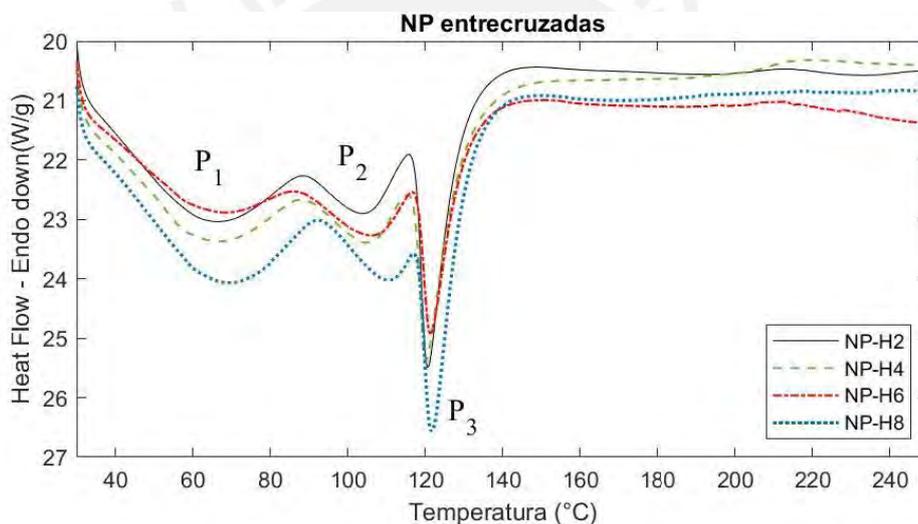


Figura 47 Termogramas representativos de las nanopartículas de almidón entrecruzadas

Se visualiza en la Figura 48 que tanto la temperatura pico P_1 y la entalpía ΔH_1 de las nanopartículas no entrecruzadas cargadas con curcumina aumentan a medida que la concentración de urea incrementa.

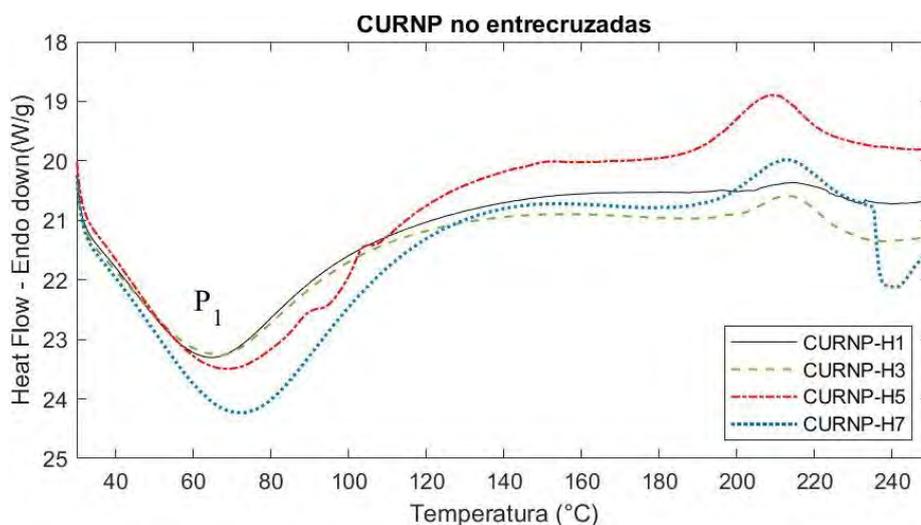


Figura 48 Termogramas representativos de las nanopartículas de almidón no entrecruzadas cargadas con curcumina

La adición de la curcumina en cada fórmula de preparación de nanopartículas entrecruzadas provoca el incremento de la temperatura pico P_3 y la disminución de la entalpía ΔH_3 (Figura 49). La temperatura P_2 y la entalpía ΔH_2 aumentan al agregar curcumina en cada fórmula de fabricación de nanopartículas entrecruzadas, a excepción de la fórmula que consiste de 0.3 g de urea y STPP (NP-H4), cuya temperatura P_2 y entalpía ΔH_2 de 106 °C y 17.47 J/g disminuyeron hasta 105.5°C y 16.06 J/g.

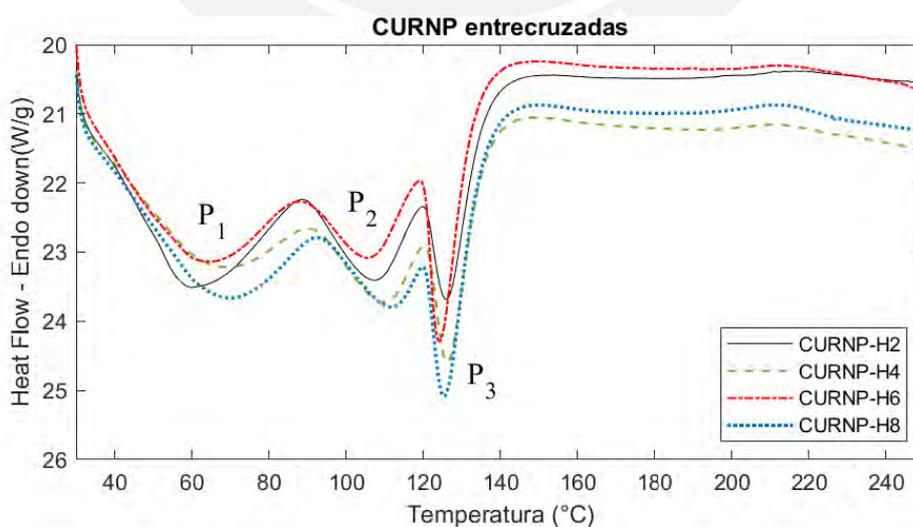


Figura 49 Termogramas representativos de las nanopartículas de almidón entrecruzadas cargadas con curcumina

No se visualizó el pico endotérmico de fusión de la curcumina en las Figuras 48 y 49, lo que sugiere que la curcumina cargada se encuentra dentro de las nanopartículas y en un estado amorfo, lo cual ha sido reportado por estudios previos (Li et. al, 2016; El Feky et. al, 2015; Sintov y Yariv, 2022).

Los valores de temperatura inicial, temperatura pico y temperatura final (T_i , T_p , T_f), y las entalpías de cada región endotérmica ΔH de las nanopartículas de almidón fabricadas con y sin entrecruzante se muestran en la Tabla 9 y Tabla 10, respectivamente.



Tabla 9: Temperaturas de fusión y entalpías endotérmicas de las nanopartículas no entrecruzadas con y sin carga de curcumina

	STPP (g)		0			
	Urea (g)		T_i (°C)	T_{P_1} (°C)	T_c (°C)	ΔH_1 (J/g)
Almidón nativo(*)	---		60.5	63.5	69.2	15.3
NP-H	0		33.77	72.07	114.74	227.6179
	0.15		35.87	68.08	106.72	124.6999
	0.3		33.55	66.97	110.14	178.4946
	0.6		33.20	64.89	103.55	160.2895
CURNP-H	0		33.88	64.92	108.5	119.4069
	0.15		33.74	66.76	109.07	131.3239
	0.3		36.56	68.65	105.49	133.7966
	0.6		35.31	72.39	112.09	157.4375

Tabla 10: Temperaturas de fusión y entalpías endotérmicas de las nanopartículas entrecruzadas con y sin carga de curcumina

	STPP (g)		0.4											
	Urea (g)		T_i (°C)	T_{P_1} (°C)	T_f (°C)	$H_1 \Delta$ (J/g)	T_i (°C)	T_{P_2} (°C)	T_f (°C)	ΔH_2 (J/g)	T_i (°C)	T_{P_3} (°C)	T_f (°C)	ΔH_3 (J/g)
NP-H	0		34	66.08	85.79	52.2243	92.25	103.59	113.91	13.9083	117.78	120.63	126.97	22.2452
	0.15		33.88	67.01	84.54	50.3140	92.34	104.51	112.54	10.9238	117.16	120.22	126.69	18.8894
	0.3		34.12	68.68	84.55	41.7323	89.88	106.01	115.42	17.4681	117.87	121.4	127.53	19.4083
	0.6		34.13	69.41	89.9	73.8604	96.55	110.42	116.49	10.1276	118.07	121.78	127.25	21.4590
CUR NP-H	0		35.89	59.83	85.69	68.5844	91.75	107.43	118.45	24.0163	120.91	125.92	130.86	11.3360
	0.15		33.16	68.84	86.70	49.5692	94.64	109.83	118.6	16.6280	121.77	126.24	131.15	12.2216
	0.3		34.01	64.66	82.94	55.7695	93.48	105.5	116.28	16.0656	120.9	124.23	129.27	14.3189
	0.6		33.88	70	88.58	62.0174	96.23	111.67	119.03	12.9505	121.34	125.56	130.14	12.4670

3.3.5 Caracterización de las nanopartículas de almidón por AFM

Se visualiza la morfología esférica de las nanopartículas de almidón NP-H6, fabricadas con 0.3 g de urea y 0.4 g de STPP, en las áreas de exploración representativas de $50 \times 50 \mu\text{m}$, $30 \times 30 \mu\text{m}$ y $10 \times 10 \mu\text{m}$ (Figura 50). El tamaño de las nanopartículas fue medido con Image J y se determinó que el tamaño promedio de las nanopartículas mostradas en el área de exploración de $10 \times 10 \mu\text{m}$ es 271.6 nm.

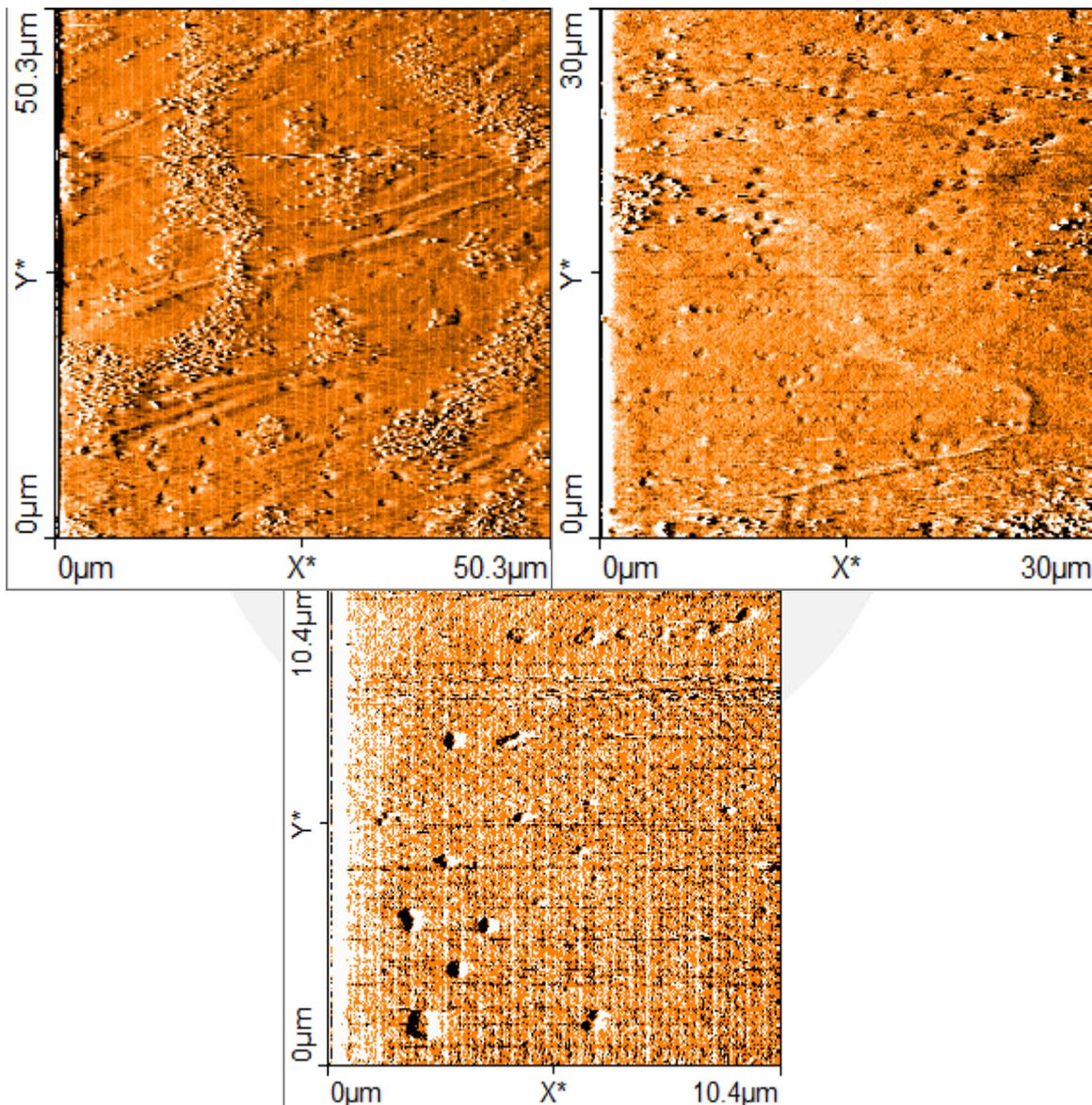


Figura 50 Áreas de exploración representativas de la muestra preparada con nanopartículas de almidón NP-

3.3.6 Solubilidad de los sistemas

Se realizó un análisis cualitativo de la solubilidad de la curcumina en medio acuoso al dispersar curcumina y nanopartículas de almidón cargadas con curcumina en agua destilada.

La Figura 51a muestra el polvo de curcumina flotando sobre el medio acuoso y demuestra la poca solubilidad de la curcumina. La Figura 51b muestra la dispersión de las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina y demuestra el incremento de la solubilidad acuosa de la curcumina al ser cargada por las nanopartículas de almidón. El pequeño tamaño de las nanopartículas de almidón y la presencia de grupos hidroxilo en su superficie permiten una mayor interacción de la curcumina con el agua, y, por ende, una mayor solubilidad acuosa de la curcumina (Chin et. al, 2014).

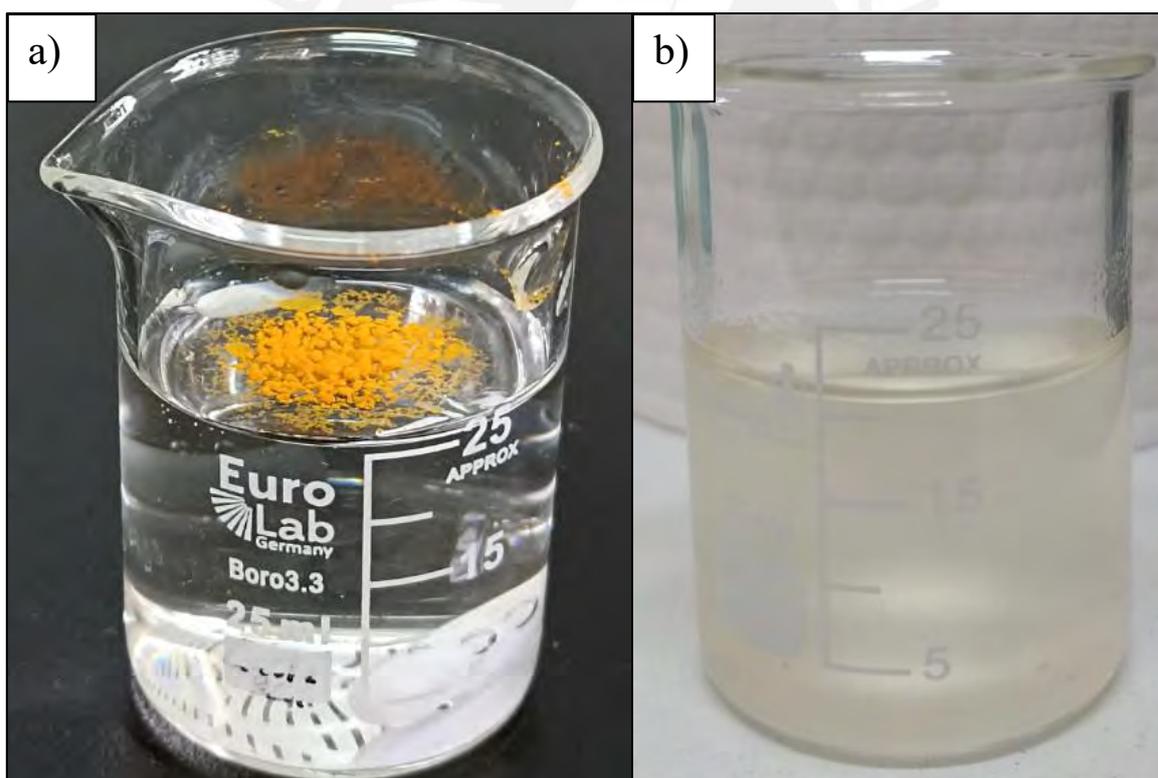


Figura 51 Imagen representativa de la curcumina (a) y las nanopartículas de almidón cargadas con curcumina (b) disueltas en el medio acuoso

CONCLUSIONES

1. Se desarrollaron métodos de fabricación de nanopartículas de almidón cargadas con curcumina que permitieron la carga exitosa de la curcumina dentro de las nanopartículas biopoliméricas fabricadas con diferentes concentraciones de urea y tripolifosfato de sodio. Así mismo, se comprueba mediante un análisis cualitativo la mejora de la solubilidad de la curcumina al ser cargada por las nanopartículas.
2. El análisis de los resultados de FTIR sugiere que la curcumina cargada en las nanopartículas de almidón está encapsulada, ya que se aprecia la desaparición de los picos característicos de la curcumina y la modificación de la intensidad de los picos ubicados entre 940 y 1060 cm^{-1} . Así mismo, se comprobó la interacción entre la curcumina y moléculas de almidón al visualizar el desplazamiento de los picos de 890 y 1016 cm^{-1} , propios de las nanopartículas de almidón entrecruzadas, hacia 900 y 1023 cm^{-1} , respectivamente, en los espectros de las nanopartículas entrecruzadas cargadas con curcumina.
3. El análisis de los resultados las pruebas DSC también sugiere que la curcumina se encuentra encapsulada dentro de las nanopartículas al no apreciarse el pico endotérmico de fusión de la curcumina.
4. La eficiencia de carga de curcumina de las nanopartículas de almidón se incrementa con la adición de tripolifosfato de sodio por la mayor formación de enlaces de hidrógeno entre la curcumina y las nanopartículas, causada por la presencia de los grupos P=O en las nanopartículas entrecruzadas. La eficiencia de carga aumentó de 35 hasta 65 % para las nanopartículas fabricadas sin urea; mientras que las eficiencias de carga aumentaron de 73, 20 y 45 hasta 86, 42 y 53 % para las nanopartículas fabricadas con 0.15, 0.3 y 0.6 g de urea, respectivamente.

5. Se concluye que la mejor formulación para la fabricación de nanopartículas de almidón cargadas con curcumina consistía de 0.15 g de urea y 0.4 g de STPP por presentar el más bajo índice de polidispersidad equivalente a 0.238, la más alta eficiencia de carga igual a 86 %, una capacidad de carga de 6.63 mg/g, y un tamaño pequeño de 65 nm.



BIBLIOGRAFÍA

- Abidin, M. N. Z., Goh, P. S., Ismail, A. F., Said, N., Othman, M. H. D., Hasbullah, H., ... & Kamal, F. (2018). Highly adsorptive oxidized starch nanoparticles for efficient urea removal. *Carbohydrate polymers*, 201, 257-263.
- Allied Market Research. (febrero de 2022). *Nanomedicine Market*.
<https://www.alliedmarketresearch.com/nanomedicine-market>
- Boufi, S., Haaj, S. B., Magnin, A., Pignon, F., Impérator-Clerc, M., & Mortha, G. (2018). Ultrasonic assisted production of starch nanoparticles: Structural characterization and mechanism of disintegration. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 327-336.
- Boyd, R. D., Pichaimuthu, S. K., & Cuenat, A. (2011). New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 387(1-3), 35-42.
- Bruschi, M. L. (2015). Modification of drug release. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*; Bruschi, ML, Ed, 15-28.
- Chin, S. F., Mohd Yazid, S. N. A., & Pang, S. C. (2014). Preparation and characterization of starch nanoparticles for controlled release of curcumin. *International Journal of Polymer Science*, 2014.
- Chin, S. F., Pang, S. C., & Tay, S. H. (2011). Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1817-1819.
- Cione, E., La Torre, C., Cannataro, R., Caroleo, M. C., Plastina, P., & Gallelli, L. (2020). Quercetin, epigallocatechin gallate, curcumin, and resveratrol: from dietary sources to human microRNA modulation. *Molecules*, 25(1), 63

- Deljoo, S., Rabiee, N., & Rabiee, M. (2019). Curcumin-hybrid nanoparticles in drug delivery system. *Asian Journal of Nanosciences and Materials*, 2(1), 66-91.
- Deng, L. J., Qi, M., Li, N., Lei, Y. H., Zhang, D. M., & Chen, J. X. (2020). Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(2), 493-508.
- Dong, H., Zhang, Q., Gao, J., Chen, L., & Vasanthan, T. (2022). Preparation and characterization of nanoparticles from cereal and pulse starches by ultrasonic-assisted dissolution and rapid nanoprecipitation. *Food Hydrocolloids*, 122, 107081.
- Dunne, A., Devane, J., & O'Hara, T. (1999). The relationship between in vitro drug dissolution and in vivo absorption. *Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)*, 48(1), 125-133.
- El-Feky, G. S., El-Rafie, M. H., El-Sheikh, M. A., El-Naggar, M. E., & Hebeish, A. V. (2015). Utilization of crosslinked starch nanoparticles as a carrier for indomethacin and acyclovir drugs. *J. Nanomed. Nanotechnol*, 6(254), 1-8.
- El-Houssiny, A. S., Ward, A. A., Mostafa, D. M., Abd-El-Messieh, S. L., Abdel-Nour, K. N., Darwish, M. M., & Khalil, W. A. (2016). Drug-polymer interaction between glucosamine sulfate and alginate nanoparticles: FTIR, DSC and dielectric spectroscopy studies. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(2), 025014.
- El-Naggar, M. E., El-Rafie, M. H., El-Sheikh, M. A., El-Feky, G. S., & Hebeish, A. (2015). Synthesis, characterization, release kinetics and toxicity profile of drug-loaded starch nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*, 81, 718-729.

- Farrag, Y., Ide, W., Montero, B., Rico, M., Rodríguez-Llamazares, S., Barral, L., & Bouza, R. (2018). Preparation of starch nanoparticles loaded with quercetin using nanoprecipitation technique. *International journal of biological macromolecules*, 114, 426-433.
- Fink, C., Sun, D., Wagner, K., Schneider, M., Bauer, H., Dolgos, H., ... & Peters, S. A. (2020). Evaluating the role of solubility in oral absorption of poorly water-soluble drugs using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 107(3), 650-661.
- Gagliardi, A., Giuliano, E., Eeda, V., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco, D. (2021). Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors. *Frontiers in pharmacology*, 12, 17.
- Goel, A., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochemical pharmacology*, 75(4), 787-809.
- Grand View Research. (marzo de 2022). *Polyphenols Market Size & Share Report, 2022-2030*. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/polyphenols-market-analysis>
- Grzybowska, K., Capaccioli, S., & Paluch, M. (2016). Recent developments in the experimental investigations of relaxations in pharmaceuticals by dielectric techniques at ambient and elevated pressure. *Advanced drug delivery reviews*, 100, 158-182.
- Guo, M. Q., Hu, X., Wang, C., y Ai, L. (2017). Polysaccharides: structure and solubility. *Solubility of polysaccharides*, 2, 8-21.
- Gutiérrez, G., Morán, D., Marefati, A., Purhagen, J., Rayner, M., & Matos, M. (2020). Synthesis of controlled size starch nanoparticles (SNPs). *Carbohydrate Polymers*, 250, 116938.

- Hazra, M. K., Roy, S., y Bagchi, B. (2014). Hydrophobic hydration driven self-assembly of curcumin in water: Similarities to nucleation and growth under large metastability, and an analysis of water dynamics at heterogeneous surfaces. *The Journal of Chemical Physics*, 141(18), 18C501.
- Hebeish, A., El-Rafie, M. H., El-Sheikh, M. A., & El-Naggar, M. E. (2014). Ultra-fine characteristics of starch nanoparticles prepared using native starch with and without surfactant. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 24(3), 515-524.
- Hu, J., Cheng, F., Lin, Y., Zhao, K., & Zhu, P. (2016). Dissolution of starch in urea/NaOH aqueous solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(19).
- Jagannathan, R., Abraham, P. M., y Poddar, P. (2012). Temperature-dependent spectroscopic evidences of curcumin in aqueous medium: a mechanistic study of its solubility and stability. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(50), 14533-14540.
- Joseph, E., & Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. *Nanomaterials for drug delivery and therapy*, 91-116.
- Kim, H. S., Kim, B. Y., & Baik, M. Y. (2012). Application of ultra high pressure (UHP) in starch chemistry. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(2), 123-141.
- Kotha, R. R., & Luthria, D. L. (2019). Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules*, 24(16), 2930.
- Kumar, R. (2019). Lipid-based nanoparticles for drug-delivery systems. In *Nanocarriers for Drug Delivery* (pp. 249-284). Elsevier.
- Kumari, P., Lal, S., & Singhal, A. (2021). Advanced applications of green materials in catalysis applications. In *Applications of Advanced Green Materials* (pp. 545-571). Woodhead Publishing.

- LeCorre, D., Bras, J., & Dufresne, A. (2012). Influence of native starch's properties on starch nanocrystals thermal properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 658-666
- Lee, W. H., Loo, C. Y., Bebawy, M., Luk, F., Mason, R. S., & Rohanizadeh, R. (2013). Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Current neuropharmacology*, 11(4), 338-378.
- Lestari, M. L., & Indrayanto, G. (2014). Curcumin. Profiles of drug substances, excipients and related methodology, 39, 113-204.
- Li, J., Shin, G. H., Lee, I. W., Chen, X., & Park, H. J. (2016). Soluble starch formulated nanocomposite increases water solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocolloids*, 56, 41-49.
- Liu, H., Yu, L., Chen, L., & Li, L. (2007). Retrogradation of corn starch after thermal treatment at different temperatures. *Carbohydrate polymers*, 69(4), 756-762.
- Liu, W., Zhai, Y., Heng, X., Che, F. Y., Chen, W., Sun, D., & Zhai, G. (2016). Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *Journal of drug targeting*, 24(8), 694-702.
- Maghsoudi, A., Yazdian, F., Shahmoradi, S., Ghaderi, L., Hemati, M., & Amoabediny, G. (2017). Curcumin-loaded polysaccharide nanoparticles: Optimization and anticariogenic activity against *Streptococcus mutans*. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 1259-1267.
- Miskeen, S., An, Y. S., & Kim, J. Y. (2021). Application of starch nanoparticles as host materials for encapsulation of curcumin: Effect of citric acid modification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1-11.
- Mohanty, C., Das, M., & Sahoo, S. K. (2012). Emerging role of nanocarriers to increase the solubility and bioavailability of curcumin. *Expert opinion on drug delivery*, 9(11), 1347-1364.

- Morán, D., Gutiérrez, G., Blanco-López, M. C., Marefati, A., Rayner, M., & Matos, M. (2021). Synthesis of starch nanoparticles and their applications for bioactive compound encapsulation. *Applied Sciences*, 11(10), 4547.
- Nazarian-Firouzabadi, F., & Visser, R. G. (2017). Potato starch synthases: functions and relationships. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 7-16.
- Nieto González, N., Obinu, A., Rassa, G., Giunchedi, P., & Gavini, E. (2021). Polymeric and Lipid Nanoparticles: Which Applications in Pediatrics?. *Pharmaceutics*, 13(5), 670.
- Nutan, M. T., & Reddy, I. K. (2010). General principles of suspensions. In *Pharmaceutical suspensions* (pp. 39-65). Springer, New York, NY.
- Othman, R., Abdurasid, M. A., Mahmud, N., & Fadzillah, N. A. (2019). Alkaline-based curcumin extraction from selected zingiberaceae for antimicrobial and antioxidant activities. *Pigment & Resin Technology*.
- Pang, S. C., Chin, S. F., Nadirah, A., Tay, S. H., & Yazid, S. N. A. M. (2015). Fabrication of polysaccharide-based nanoparticles as drug delivery nanocarriers. *ECS Transactions*, 66(37), 15.
- Pang, S. C., Tay, S. H., & Chin, S. F. (2014). Facile synthesis of curcumin-loaded starch-maleate nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2014.
- Pathak, L., Kanwal, A., & Agrawal, Y. (2015). Curcumin loaded self assembled lipid-biopolymer nanoparticles for functional food applications. *Journal of food science and technology*, 52(10), 6143-6156.
- Protserov, V. A., Wasserman, L. A., Tester, R. F., Debon, S. J. J., Ezernitskaja, M. G., & Yuryev, V. P. (2002). Thermodynamic and structural properties of starches extracted from potatoes grown at different environmental temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 49(3), 271-279.

- Pulingam, T., Foroozandeh, P., Chuah, J. A., & Sudesh, K. (2022). Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nanomaterials*, 12(3), 576.
- Putro, J. N., Ismadji, S., Gunarto, C., Soetaredjo, F. E., & Ju, Y. H. (2020). A study of anionic, cationic, and nonionic surfactants modified starch nanoparticles for hydrophobic drug loading and release. *Journal of Molecular Liquids*, 298, 112034.
- Qiu, C., Qin, Y., Zhang, S., Xiong, L., & Sun, Q. (2016). A comparative study of size-controlled worm-like amylopectin nanoparticles and spherical amylose nanoparticles: Their characteristics and the adsorption properties of polyphenols. *Food chemistry*, 213, 579-587.
- Rivas, C. J. M., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., ... & Elaissari, A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 532(1), 66-81.
- Roberts, S. A., & Cameron, R. E. (2002). The effects of concentration and sodium hydroxide on the rheological properties of potato starch gelatinisation. *Carbohydrate Polymers*, 50(2), 133-143.
- Rodrigues, S., da Costa, A. M. R., & Grenha, A. (2012). Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate polymers*, 89(1), 282-289.
- Rutkaite, R., Bendoraitiene, J., Klimaviciute, R., & Zemaitaitis, A. (2012). Cationic starch nanoparticles based on polyelectrolyte complexes. *International journal of biological macromolecules*, 50(3), 687-693.
- Saari, H., Fuentes, C., Sjöo, M., Rayner, M., & Wahlgren, M. (2017). Production of starch nanoparticles by dissolution and non-solvent precipitation for use in food-grade Pickering emulsions. *Carbohydrate polymers*, 157, 558-566.

- Sadeghi, R., Daniella, Z., Uzun, S., & Kokini, J. (2017). Effects of starch composition and type of non-solvent on the formation of starch nanoparticles and improvement of curcumin stability in aqueous media. *Journal of Cereal Science*, 76, 122-130.
- Sana, S., Boodhoo, K., & Zivkovic, V. (2019). Production of starch nanoparticles through solvent-antisolvent precipitation in a spinning disc reactor. *Green Processing and Synthesis*, 8(1), 507-515.
- Savjani, K. T., Gajjar, A. K., & Savjani, J. K. (2012). Drug solubility: importance and enhancement techniques. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
- Singh, R., & Lillard Jr, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215-223.
- Sintov, A. C., & Yariv, D. (2022). A New Nanoparticulate System Based on Divanillin-Crosslinked Starch: Mode of Manufacturing and In-Vitro Evaluation of Skin Penetration. *Starch-Stärke*, 74(1-2), 2100172.
- Sun, X. Z., Williams, G. R., Hou, X. X., & Zhu, L. M. (2013). Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 94(1), 147-153.
- Torres, F. G., Arroyo, J., Tineo, C., & Troncoso, O. (2019). Tailoring the properties of native andean potato starch nanoparticles using acid and alkaline treatments. *Starch-Stärke*, 71(3-4), 1800234.
- Torres, F. G., Commeaux, S., & Troncoso, O. P. (2013). Starch-based biomaterials for wound-dressing applications. *Starch-Stärke*, 65(7-8), 543-551.
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Díaz, D. A., & Amaya, E. (2011). Morphological and thermal characterization of native starches from Andean crops. *Starch-Stärke*, 63(6), 381-389.

- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Grande, C. G., & Díaz, D. A. (2011). Biocompatibility of starch-based films from starch of Andean crops for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 31(8), 1737-1740.
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Vega, J., & Wong, M. (2015). Influence of botanic origin on the morphology and size of starch nanoparticles from andean native starch sources. *Polymers from Renewable Resources*, 6(3), 91-103.
- Troncoso, O. P., & Torres, F. G. (2020). Non-conventional starch nanoparticles for drug delivery applications. *Medical Devices & Sensors*, 3(6), e10111.
- Tsuda, A., & Konduru, N. V. (2016). The role of natural processes and surface energy of inhaled engineered nanoparticles on aggregation and corona formation. *NanoImpact*, 2, 38-44.
- Wang, Z., Gu, Z., Li, Z., Hong, Y., & Cheng, L. (2013). Effects of urea on freeze–thaw stability of starch-based wood adhesive. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 397-403.
- Willfahrt, A., Steiner, E., Hötzel, J., & Crispin, X. (2019). Printable acid-modified corn starch as non-toxic, disposable hydrogel-polymer electrolyte in supercapacitors. *Applied Physics A*, 125(7), 1-10.
- Wu, L., Zhang, J., & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 63(6), 456-469.
- Xiao, H., Yang, F., Lin, Q., Zhang, Q., Zhang, L., Sun, S., ... & Liu, G. Q. (2020). Preparation and characterization of broken-rice starch nanoparticles with different sizes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 437-445.
- Xu, X., Huang, X. F., Visser, R. G., & Trindade, L. M. (2017). Engineering potato starch with a higher phosphate content. *PLoS One*, 12(1), e0169610.

- Zahin, N., Anwar, R., Tewari, D., Kabir, M., Sajid, A., Mathew, B., ... & Abdel-Daim, M. M. (2020). Nanoparticles and its biomedical applications in health and diseases: special focus on drug delivery. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19151-19168.
- Zhang, H., Oh, M., Allen, C., & Kumacheva, E. (2004). Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacromolecules*, 5(6), 2461-2468.
- Zhang, Z., Shan, H., Sun, J., Weng, Y., Wang, X., Xiong, J., ... & Chen, X. (2013). Facile preparation of corn starch nanoparticles by alkali-freezing treatment. *RSC advances*, 3(32), 13406-13411.
- Zhi, K., Wang, R., Wei, J., Shan, Z., Shi, C., & Xia, X. (2021). Self-assembled micelles of dual-modified starch via hydroxypropylation and subsequent debranching with improved solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocolloids*, 118, 106809.

