



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA
SEDE CONCEPCIÓN**

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NANOEMULSIÓN
DOBLE WATER-IN-OIL-IN-WATER (W/O/W) PARA LA
ENCAPSULACIÓN DE CURCUMINA Y UN EXTRACTO DE**

Pyropia columbina

Tesis para Optar al Grado de Magíster en Innovación en Biociencias y Bioingeniería

Profesor tutor: Ph.D. Patricio A. Oyarzún Cayo.
Estudiante: **Felipe Andrés Silva Jerez.**

© (Felipe Andrés Silva Jerez). Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra en cualquier forma, medio o procedimiento sin permiso por escrito del o los autores.

Concepción, Chile.

2022

CALIFICACIÓN

En _____, el ____ de _____ de____, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante _____, de la carrera de _____ ha aprobado la tesis para optar al título de _____ con una nota de _____.

Dr. Patricio A. Oyarzún Cayo.

Dr. Victor M. Díaz García.

Mg. Eileen V. Castillo Quiroga.

Itaca

Konstantino Kavafis.

Cuando emprendas tu viaje a Itaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.
No temas a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al colérico Poseidón,
seres tales jamás hallarás en tu camino,
si tu pensar es elevado, si selecta
es la emoción que toca tu espíritu y tu cuerpo.
Ni a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al salvaje Poseidón encontrarás,
si no los llevas dentro de tu alma,
si no los yergue tu alma ante ti.

Pide que el camino sea largo.
Que muchas sean las mañanas de verano
en que llegues -¡con qué placer y alegría!-
a puertos nunca vistos antes.
Detente en los emporios de Fenicia
y hazte con hermosas mercancías,
nácar y coral, ámbar y ébano
y toda suerte de perfumes sensuales,
cuantos más abundantes perfumes sensuales puedas.
Ve a muchas ciudades egipcias
a aprender, a aprender de sus sabios.

Ten siempre a Itaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Mas no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino
sin aguardar a que Itaca te enriquezca.

Itaca te brindó tan hermoso viaje.
Sin ella no habrías emprendido el camino.
Pero no tiene ya nada que darte.

Aunque la halles pobre, Itaca no te ha engañado.
Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,
entenderás ya qué significan las Itacas.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que me han apoyado en este gran proceso de aprendizaje. A mis profesores por entregarme tanto conocimiento. A mis compañeros por hacer agradables las jornadas extenuantes. A mi polola Camila por entregarme el cariño necesario para continuar. A mi madre, hermano, abuela y tía por llevarme a esos recuerdos que tanto aprecio.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	3
1.2.1 Hipótesis.....	3
1.2.2 Objetivo General	3
1.2.3 Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 2	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Exposición a la radiación solar y efectos asociados.....	4
2.1.1. Radiación UV, cáncer de piel y efectos celulares.....	5
2.2. Fotoprotectores.....	10
2.2.1. Fotoprotectores sintéticos y controversias	11
2.2.2. Moléculas naturales como fotoprotectores	12
2.2.3. Moléculas fotoprotectoras de origen marino.....	13
2.2.4. Aminoácidos tipo micosporina.....	14
2.3. Curcumina: Uso tópico	18
2.4. Sistemas emulsionados, micro y nano-emulsionados	21
2.4.1. Surfactantes	23
2.4.2. Balance hidrofílico-lipofílico (HLB).....	25
2.5. Encapsulación de compuestos activos de interés comercial mediante nanoemulsiones	27
2.5.1. Nanoemulsiones de uso tópico para uso cosmético y el cuidado de la piel.....	27
2.5.2. Emulsiones y nanoemulsiones dobles del tipo water-in-oil-in-water (W/O/W)	30
CAPÍTULO 3	32
MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	32
3.1 Desarrollo nanoemulsión doble	32
3.1.1 Material Biológico	32
3.1.2 Equipos, reactivos y software	33
3.1.3 METODOLOGÍA.....	34
3.2 Caracterización fisicoquímica y estabilidad de nanoemulsión doble	44
3.2.1 Equipos, reactivos y software	44

3.2.2. METODOLOGÍA.....	44
CAPÍTULO 4.....	47
RESULTADOS	47
4.1 Desarrollo nanoemulsión doble	47
4.1.1 Procesamiento del alga <i>P. columbina</i> y extracción MAAs.....	47
4.1.2. Cuantificación P-334 en alga <i>P. columbina</i>	48
4.1.3. Solubilidad curcumina en aceite mineral	50
4.1.4 Formulación y optimización de nanoemulsión W/O.....	52
4.1.5. Formulación nanoemulsión doble.....	57
4.2. Caracterización fisicoquímica y estabilidad para nanoemulsión W/O y W/O/W	66
4.2.1. Estudio estabilidad nanoemulsión W/O	66
4.2.2. FT-IR en nanoemulsión W/O.....	73
4.2.3. Calorimetría diferencial de barrido para nanoemulsión W/O	76
4.2.4. Capacidad de encapsulación nanoemulsión W/O/W.....	77
CAPÍTULO 5.....	81
DISCUSIÓN.....	81
5.1. Procesamiento y cuantificación de MAAs.....	81
5.2. Formulación de la nanoemulsión primaria W/O.....	81
5.3. Formulación de la nanoemulsión doble W/O/W.....	82
5.4. Proceso de nanoemulsificación y encapsulación de los compuestos curcumina y MAAs.....	85
5.5 Estabilidad y caracterización de nanoemulsión y compuestos activos curcumina y MAAs.....	87
CONCLUSIONES.....	92
CAPÍTULO 7	94
BIBLIOGRAFÍA.....	94
CAPÍTULO 8.....	107
ANEXOS.....	107
Anexo. 8.1. Estudios previos: Diseño experimental para la extracción de MAAs desde <i>P. columbina</i>	107
Anexo 8.2. Curva de calibrado P-334 mediante HPLC.....	109
Anexo 8.3. Diseño central compuesto para la formulación de nanoemulsión W/O	110
Anexo 8.4. Puntos experimentales para el diseño factorial fraccionado para la formulación de una nanoemulsión doble	111

Anexo 8.5. Listado de coeficientes para tamaño de glóbulo y polidispersidad.	112
Anexo 8.6. Tablas ANOVA para modelo tamaño de glóbulo y polidispersidad	113
Anexo 8.7. Listado de coeficientes para tamaño de glóbulo y polidispersidad.	114
Anexo 8.8. Tablas ANOVA para modelo cuadrático de tamaño de glóbulo y polidispersidad.....	115
Anexo 8.9. Tabla de comparaciones múltiples para nanoemulsiones expuestas a diferentes temperaturas durante cuatro semanas: 0.1 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.	116
Anexo 8.10. Tabla de comparaciones múltiples para nanoemulsiones expuestas a diferentes temperaturas durante cuatro semanas: 0.3 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.	118
Anexo 8.11. Mediciones de FT-IR para nanoemulsión W/O y respectivos controles.....	120
Anexo 8.12. Revisión “Una visión actualizada sobre la síntesis, escalado y aplicaciones de las nanoemulsiones dobles”.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Foto-productos derivados de la exposición a la radiación UV-B. Li <i>et al.</i> (2006).....	6
Figura 2. Especies reactivas del oxígeno y su interacción con moléculas antioxidantes. Petersen <i>et al.</i> (2000).....	7
Figura 3. Formación de los foto-productos 8-oxoG y FapyGua a partir del producto intermediario producido por la interacción de la guanina y el radical hidroxilo. Modificado horizontalmente de Delaney <i>et al.</i> (2012).....	8
Figura 4. Disminución en la viabilidad celular ante radiación UV-A. Yang <i>et al.</i> (2012).	9
Figura 5. Rutas propuestas para la formación de MAAs. Las dos rutas señaladas llevan a la formación de Shinorina. Spence <i>et al.</i> (2017).	15
Figura 6. Estructura básica de los MAAs, (a) Ciclohexanona. (b) Ciclohexanamina. Chrapusta <i>et al.</i> (2017).	15
Figura 7. Bajo condiciones normales, Nrf2 es constantemente ubiquitinizada mediante Keap1. La inactivación de Keap1 libera a Nrf2 para ser translocado hacia el núcleo. Mitsuishi <i>et al.</i> (2012).	16
Figura 8. Curcuminoides. Benedikstsdoottir <i>et al.</i> (2015).	19
Figura 9. Algunas rutas de señalización con las que interactúa la curcumina. Shehzad & Lee. (2013).	20
Figura 10. Representación gráfica de emulsiones tipo O/W y W/O estabilizadas por surfactante. Mohamed <i>et al.</i> (2018).	21
Figura 11. Ejemplo de diagrama de fases ternario para la formulación de emulsiones mediante método de emulsificación espontanea. Wang <i>et al.</i> (2018).	22
Figura 12. Representación de diferentes tipos de surfactantes, en la sección celeste se encuentra la parte hidrofílica. En la sección gris se encuentra la parte hidrofóbica. Dave & Joshi (2017).	23
Figura 13. Rutas de penetración en la piel de diversos sistemas de nanovehiculización. Nastiti <i>et al.</i> (2017).	29
Figura 14. Método secuencial para la formulación de emulsiones y nanoemulsiones dobles. Sheth <i>et al.</i> (2020).	30
Figura 15. Método de dos pasos para la formación de emulsiones dobles. Wang <i>et al.</i> (2017).	41
Figura 16. (a) Alga Luche húmeda. (b) Alga Luche secada en horno. (c) Extracción de alga Luche.	47
Figura 17. Espectrograma extracción de Luche. Diluida 1:10.	48

Figura 18. (a) Extracto Luche liofilizado. (b) Extracto Luche resuspendido en 10 mL.	48
Figura 19. Cromatograma de extracto de <i>P. columbina</i> diluido 1:100.	49
Figura 20. Curcumina en aceite mineral. Concentración ascendente de izquierda a derecha.	50
Figura 21. Espectrograma de curcumina en aceite mineral para diferentes concentraciones.	51
Figura 22. Espectrograma de curcumina en aceite mineral para concentraciones de 0.2 y 0.1 mg/g.	51
Figura 23. (a) Nanoemulsión W/O blanca obtenida bajo condiciones 11% surfactante, 3% extracto acuoso, 86% aceite mineral y homogenización de alta velocidad. (b) Histograma distribución tamaño de glóbulo nanoemulsión W/O.	53
Figura 24. (a) Nanoemulsión W/O después de centrifugación. No se observa sedimentación. (b) Espectrograma para nanoemulsión W/O y compuestos activos (MAAs y curcumina).	53
Figura 25. (a) Solubilización de curcumina en aceite mineral agitado 24 horas. (b) Nanoemulsión W/O con incremento de curcumina y extracción acuosa.	54
Figura 26. (a) Nanoemulsión con incremento en la concentración de curcumina y extracción acuosa. (b) Resultado de DLS para nanoemulsión con incremento en la concentración de curcumina y extracción acuosa. Tamaño aproximado 56 nm.	54
Figura 27. Espectrograma para nanoemulsión con un incremento en la concentración de curcumina.	55
Figura 28. Disolución de curcumina en aceite mineral. (a) 0.9 mg curcumina/g formulación. (b) 1 mg curcumina/g formulación.	55
Figura 29. Nanoemulsión con incremento en curcumina. (a) 0.9 mg curcumina/g formulación y (b) 1 mg curcumina/g formulación.	56
Figura 30. (a) Disolución de curcumina 1 mg/ g formulación en aceite mineral y surfactantes Span80/Tween80. (b) Disolución de curcumina 3 mg/g formulación en aceite mineral y surfactantes Span80/Tween80.	56
Figura 31. Nanoemulsión W/O 1 mg curcumina/g formulación a la que se le ha incorporado extracto de alga liofilizado y reconstituido en 2 mL de H ₂ O. (b) Nanoemulsión anterior sometida a 30 segundos de homogenización por ultrasonido. (c) Nanoemulsión W/O 3 mg curcumina/g formulación suplementada con extracto de alga liofilizado y reconstituido en 2 mL de H ₂ O, sometida a homogenización por ultrasonido durante 30 segundo.	57
Figura 32. Gráfico de residuales estandarizado vs factor tiempo (homogenización ultrasonido) (a) Tamaño de glóbulo. (b) PDI.	59

Figura 33. Histograma de nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina y extracción de alga luche.	60
Figura 34. Apariencia de nanoemulsión doble cargada con curcumina y extracción de <i>P. columbina</i>	60
Figura 35. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina y extracción de Luche liofilizada y reconstituida en 10 mL de agua desionizada.	61
Figura 36. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina (0.1 mg/g formulación) y extracción de Luche liofilizada.	62
Figura 37. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina (0.3 mg/g formulación) y extracción de luche y reconstituida en 10 mL de agua desionizada.	62
Figura 38. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina (0.3 mg/g formulación) y extracción de Luche liofilizada y reconstituida en 2 mL de agua desionizada.	63
Figura 39. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina (0.1 mg/g formulación) y extracción de Luche liofilizada y reconstituida en 2 mL de agua desionizada.	63
Figura 40. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina (0.3 mg/g formulación) y extracción de Luche liofilizada y reconstituida en 2 mL de agua desionizada. Aumento de fase oleosa.	64
Figura 41. Histograma nanoemulsión W/O/W cuyas condiciones son similares a las del punto central junto con adición de goma xántica.	65
Figura 42. Nanoemulsión W/O/W a la cual se le ha añadido 1% de goma xántica.	65
Figura 43. Espectrograma de nanoemulsiones W/O recién sintetizadas cargada con MAAs y curcumina.	66
Figura 44. Espectrograma para nanoemulsiones W/O expuesta a diferentes temperaturas. Medición luego de cuatro semanas.	67
Figura 45. Nanoemulsiones expuesta a diferentes temperaturas, imágenes obtenidas después de cuatro semanas de exposición.	67
Figura 46. Espectrograma para nanoemulsión W/O 0.2 mg curcumina/g formulación extracto de Luche liofilizado y resuspendido en 10 mL de agua desionizada, expuesto a diferentes temperaturas. Factor de dilución 100.....	68
Figura 47. Nanoemulsión W/O 0.2 mg curcumina/g formulación más extracto de Luche liofilizado y resuspendido en 10 mL de agua desionizada. En rojo se indica el precipitado de curcumina.....	68

Figura 48. Espectrograma nanoemulsión W/O 1 mg curcumina/g formulación más extracto de Luche liofilizado y resuspendido en 2 mL, expuesto a diferentes temperaturas. Factor de dilución 100.	69
Figura 49. Nanoemulsión W/O 1 mg curcumina/g formulación más extracto de Luche liofilizado y resuspendido en 2 mL de agua desionizada. En rojo se indica precipitado de curcumina.	69
Figura 50. Espectrograma para nanoemulsión doble que contiene 0.1 mg curcumina/g formulación. Mientras que el extracto de Luche liofilizado y resuspendido en 2 mL de agua desionizada se encuentra doblemente encapsulado. Factor dilución 10.	70
Figura 51. Nanoemulsión W/O/W expuesta a diferentes temperaturas durante cuatro semanas.	71
Figura 52. Espectrograma para nanoemulsión doble que contiene 0.3 mg curcumina/g formulación. Mientras que el extracto de Luche liofilizado y resuspendido en 2 mL de agua desionizada se encuentra doblemente encapsulado. Factor dilución 10.	71
Figura 53. Nanoemulsión W/O/W con aumento en la concentración de curcumina expuesta a diferentes temperaturas durante cuatro semanas.	71
Figura 54. Tamaño e índice de polidispersidad (PDI) para nanoemulsión doble formulada con 0.1 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada. Medición luego de cuatro semanas.	72
Figura 55. Tamaño e índice de polidispersidad (PDI) para nanoemulsión doble formulada con 0.3 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada. Medición luego de cuatro semanas.	73
Figura 56. Espectrograma de FT-IR para nanoemulsión W/O y otros componentes.....	74
Figura 57. Espectrograma de FT-IR para nanoemulsión W/O/W y otros componentes.....	75
Figura 58. Termograma de DSC para extracto de <i>P. columbina</i>	76
Figura 59. Termograma de nanoemulsión W/O cargada con curcumina (línea roja) y nanoemulsión W/O cargada con extracto de alga (línea azul).	77
Figura 60. Tubo concentrador cargado con nanoemulsión post-centrifugación. En rojo se marca líquido permeado.	78
Figura 61. Cromatograma realizado a permeado con condiciones para la detección de curcumina. No se observa señal medible.	79
Figura 62. Cromatograma realizado a permeado con condiciones para la detección de curcumina. Se observa señal medible para P-334.	79

Anexo Figura 8.1. Superficie respuesta obtenida mediante BBD. Se observan las variables independientes pH y temperatura de extracción. La variable respuesta es concentración de MAAs (mg/mL).	107
Anexo Figura 8.2 Curva calibrado P-334.....	109
Anexo Figura 8.3. Espectro FTIR- para extracción de alga Luche Peaks 1637.57 y 3310.05 cm^{-1}	120
Anexo Figura 8.4. Espectro de FTIR para Aceite mineral Pesado. Peaks en 722.87, 1376.78, 1458.41, 2852.05 y 2918.65 cm^{-1}	120
Anexo Figura 8.5. Espectro FTIR para aceite mineral y surfactantes Tween80/Span80. Se identifican los Peaks 722.88, 951.05, 1120.30, 1376.47, 1458.64, 2852.23 y 2919.18 cm^{-1}	121
Anexo Figura 8.6. Espectro FTIR para aceite mineral, surfactantes Tween80/Span80 y curcumina. Se identifican los Peaks 722.69, 1112.60, 1376.38, 1458.51, 1740.70, 2852. 19 y 2919.08 cm^{-1}	121
Anexo Figura 8.7. Espectro FTIR para Nanoemulsión W/O que contiene los compuestos activos. Se identifican los Peaks 722.83, 1097.56, 1376.38, 1458.62, 1739.68, 2852.25, 2919.17 y 3522.05 cm^{-1}	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones de los surfactantes según HLB. Croda (2013).	25
Tabla 2. Intervalos de HLB requerido para formar emulsiones y nanoemulsiones estables mediante aceite mineral.....	26
Tabla 3. Equipos, reactivos y software utilizados en el desarrollo de nanoemulsiones dobles.	33
Tabla 4. Puntos experimentales obtenidos para la formulación de la nanoemulsión W/O mediante el diseño central compuesto.	40
Tabla 5. Puntos del diseño factorial fraccionado para la formulación de la nanoemulsión doble.	43
Tabla 6. Equipos, reactivos y software utilizados para la caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión W/O y W/O/W.	44
Tabla 7. Datos tomados para la cuantificación de P-334 en extracción liofilizada. Alga del año 2020.	49
Tabla 8. Datos tomados para la cuantificación de P-334 en extracción liofilizada. Alga del año 2021.	50
Tabla 9. Parámetros estadísticos para modelo de tamaño de glóbulo y PDI.....	58
Tabla 10. Parámetros estadísticos para modelo de tamaño de glóbulo y PDI (Interacción cuadrática).	59
Tabla Anexo 8.1. Puntos experimentales de BBD para la optimización en la extracción de MAAs desde <i>P. columbina</i>	108
Tabla Anexo 8.2. Concentración de estándar P-334 y área cromatográfica.....	109
Tabla Anexo 8.3. Puntos experimentales del diseño central compuesto con respectivos factores y variables respuesta.	110
Tabla Anexo 8.4. Puntos experimentales para el diseño factorial fraccionado con respectivos factores y variables respuesta.	111
Tabla Anexo 8.5. Listado de coeficientes para tamaño de glóbulos.	112
Tabla Anexo 8.6. Listado de coeficientes para polidispersidad.	112
Tabla Anexo 8.7. ANOVA para tamaño de glóbulo obtenido para modelo lineal.....	113
Tabla 8.8. ANOVA para polidispersidad obtenido para modelo lineal.	113
Tabla 8.9. Lista de coeficientes para tamaño de glóbulo con interacción cuadrática de tiempo.	114
Tabla Anexo 8.10. Lista de coeficientes para polidispersidad con interacción cuadrática de tiempo.	114
Tabla Anexo 8.11. ANOVA para tamaño de glóbulo obtenido para modelo cuadrático.	115

Tabla Anexo 8.12. ANOVA para polidispersidad obtenida para modelo cuadrático.	115
Tabla Anexo 8.13. Test de comparaciones múltiples de Dunnett's para tamaño de glóbulo. Nanoemulsión 0.1 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.....	116
Tabla Anexo 8.14. Test de comparaciones múltiples de Dunnet's para polidispersidad. Nanoemulsión 0.1 mg curcumina/g formulación y fase acuosa proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.....	117
Tabla Anexo 8.15. Test de comparaciones múltiples de Dunnett's para tamaño de glóbulo. Nanoemulsión 0.3 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.....	118
Tabla Anexo 8.16. Test de comparaciones múltiples de Dunnett's para polidispersidad. Nanoemulsión 0.3 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.....	119

RESUMEN

La larga exposición a la radiación solar tiene diversas consecuencias en la piel humana tales como el oscurecimiento, envejecimiento, inmunosupresión, estados oxidativos y cáncer de piel. Este último se ha convertido en un tema de interés público a resolver y las campañas para la prevención de cáncer se centran, principalmente, en evitar la radiación UV y el uso de protectores solares. Sin embargo, existen autores que ponen en duda el uso de estos últimos, debido al uso de moléculas orgánicas e inorgánicas que al entrar en contacto con la radiación UV son capaces de inducir la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Este proceso a la larga genera daño genético acumulativo. El uso de moléculas naturales ha ido creciendo día a día debido a su inocuidad, capacidad antioxidante y protección contra el daño provocado por la radiación UV. La presente tesis describe una estrategia para la nanoemulsificación conjunta de un extracto de alga rico en aminoácidos tipo micosporina (MAAs) y curcumina. Inicialmente se procedió a determinar la capacidad de disolución de la curcumina en el aceite utilizado (aceite mineral), para lo cual fue posible disolver 1 mg curcumina/g de aceite mineral. La generación de glóbulos nanométricos que incorporaron MAAs se logró mediante el uso de los surfactantes Tween80/Span80 y homogenización de alta velocidad. Esta nanoemulsión W/O resultó ser estable a diferentes condiciones de almacenamiento al no evidenciar separación de fases o sedimentación. Posteriormente, se procedió a formular la nanoemulsión doble para la encapsulación conjunta de los compuestos activos antes mencionados mediante los métodos de homogenización por alta velocidad y ultrasonido. Se procedió a realizar un diseño factorial fraccionado con el fin de estudiar factores como tiempo de homogenización de ultrasonido, amplitud, porcentaje de tensioactivos y HLB. Se determinó que el tiempo de homogenización de ultrasonido en el modelo generado fue significativo. El diseño se generó con una concentración determinada de curcumina y extracto de *P. columbina*, los cuales fueron variados para conocer el efecto sobre el tamaño de glóbulo y polidispersidad. Lo anterior

permitió obtener tamaños de glóbulo desde 86.35 nm a 416.43 nm, mientras que la polidispersidad se mantuvo bajo 0.350. En cuanto a la estabilidad de las nanoemulsiones generadas, se observó que las nanoemulsiones W/O fueron estables ante las condiciones de almacenamiento generadas sin mostrar separación de fases, aunque bajo ciertas condiciones se observó precipitado asociado a curcumina. En el caso de las nanoemulsiones dobles, el ensayo de estabilidad realizado evidenció que la temperatura de almacenamiento de 4^oC provoca un leve incremento, aunque no significativo, en el tamaño de glóbulo. Sin embargo, las temperaturas de almacenamiento de 45^oC y ambiente provocaron un cambio significativo en el tamaño de glóbulo.

ABSTRACT

Long-term exposure to solar radiation has different consequences on human skin such as darkening, aging, immunosuppression, oxidative states and skin cancer. The latter has become a public issue to be considered. Cancer prevention campaigns are mainly focused on avoiding UV radiation and use of sunscreen. However, sunscreen use are questioned due to the use of synthetic molecules, these molecules are capable of inducing the production of reactive oxygen species (ROS) in presence of UV radiation, ultimately this process can lead cumulative genetic damage. The use of natural molecules has been growing day by day due to their safety, antioxidant capacity and protection against damage caused by UV. The present thesis describes an experimental strategy for simultaneous nanoemulsification of a rich mycosporine-like amino acids (MAAs) seaweed extract and curcumin. Initially, the dissolution capacity of curcumin in oil (mineral oil) was determined, for which it was possible to dissolve 1 mg curcumin/g of mineral oil. The generation of nanometric globules incorporating MAAs was achieved through the use of Tween80/Span80 surfactants and high speed homogenization. This W/O nanoemulsion resulted stable for different storage conditions showing no phase separation or sedimentation. Subsequently, a double nanoemulsion was formulated for encapsulation of the aforementioned active compounds, using high speed and ultrasonication methods. A fractional factorial design was carried out in order to study factors such as ultrasound homogenization time, amplitude, percentage of surfactants and HLB. The ultrasound homogenization time in the generated model was determined to be significant. The design was generated with a determined concentration of curcumin and *P. columbina* extract, which subsequently was varied to determine the effect on globule size and polydispersity. This resulted in globule size ranging from 86.35 nm to 416.43 nm, while polydispersity was kept below 0.350. Regarding the stability of the generated nanoemulsions, it was observed that W/O nanoemulsions were stable under generated conditions without showing phase separation, although under certain conditions a precipitate associated with

curcumin was observed. In the case of double nanoemulsions, the stability test carried out showed that storage temperature of 4°C causes a slight, although not significant, increase in globule size. However, 45°C and ambient storage temperature caused a significant change in globule size.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La exposición excesiva a la radiación UV está asociada a diversas enfermedades de la piel. Las cuales se relacionan con la aparición de especies reactivas del oxígeno (ROS), moléculas inflamatorias, daño genético y celular. Si bien las manifestaciones en la piel van desde procesos eritematosos hasta envejecimiento de la piel, la aparición de neoplasias en la piel son las más reconocidas (Narayanan *et al.* 2010). El mecanismo por el cual la radiación UV-A y UV-B generan daño celular y genético depende de la longitud de onda. La radiación UV-A provoca daño genético indirecto asociado a la aparición de ROS y fotoproductos derivados de la guanina. En el caso de la radiación UV-B el daño genético directo es observable a través de la aparición de dímeros de pirimidina (Cadet *et al.* 2009). Finalmente, si los mecanismos de reparación no logran reemplazar las bases dañadas. Diversas de rutas señalización celular se pueden ver alteradas.

Las estrategias para evitar el daño por radiación UV son las relacionadas con la no exposición a esta y la fotoprotección mediante cremas o protectores solares. Esta última utiliza compuestos orgánicos e inorgánicos que han sido puesto en duda debido a que pueden ser bioacumulados y provocar disrupción en el sistema endocrino (Ruszkiewicz *et al.* 2017).

Las nuevas aproximaciones en términos de fotoprotección plantean el uso de compuestos activos naturales para aminorar el daño oxidativo. Dentro de estos, los compuestos provenientes de especies marinas han recibido atención por su alta capacidad de absorción de radiación UV-A. Los aminoácidos tipo micosporina (MAAs) son moléculas altamente hidrofílicas presentes en algas rojas y otros organismos. El alga utilizada en esta investigación corresponde a *P. columbina*, popularmente conocida como Luche, la cual contiene una alta concentración de MAAs. El luce se distribuye a lo largo de la costa chilena siendo un importante recurso costero, el cual es aprovechado por las poblaciones

locales principalmente en el ámbito alimenticio. Se ha caracterizado a las MAAs como moléculas capaces de aminorar el daño oxidativo y el desarrollo de células cancerígenas asociadas al cáncer tipo melanoma y no melanoma (Bathia *et al.* 2011). Por otra parte, los curcuminoides son metabolitos que se extraen del rizoma de la especie *Curcuma longa*. Esta molécula se ha descrito como altamente inhibidora de células cancerígenas, aunque su uso está limitado por la naturaleza hidrofóbica de esta. Lo anterior dificulta la co-formulación de ambas moléculas descritas anteriormente. Por lo que han surgido diversas estrategias para encapsular metabolitos de naturaleza hidrofílica y lipofílica (Benediktsdottir *et al.* 2015).

La nanoemulsiones son emulsiones con un tamaño de partículas entre 10-200 nm. Existe literatura donde se ha especificado el uso de nanoemulsiones para encapsular curcuminoides, principalmente del tipo O/W (Aceite/agua), las cuales están destinadas a aumentar su biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, esto no posibilita la unión entre moléculas de naturaleza química diferente. Este es un problema que se logra solucionar a través del desarrollo de nanoemulsiones dobles (W/O/W) (Aditya *et al.* 2015). Si bien se han logrado sistemas nanoemulsionados de curcumina mediante dos fases (W/O), no se han descrito sistemas nanoemulsionados dobles que contenga curcumina y MAAs, y menos de uso tópico.

A continuación, se presenta una estrategia experimental para obtener nanoemulsiones dobles destinada a la nanovehiculización de curcumina y un extracto de alga *P. columbina* rico en MAAs, con aplicaciones de tópico y foto-protección.

1.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1 Hipótesis

La formulación de una nanoemulsión doble *water-in-oil-in-water* realizada mediante métodos de alta energía permite la encapsulación conjunta de los compuestos bioactivos curcumina y aminoácidos tipo micosporina.

1.2.2 Objetivo General

Investigar la capacidad de encapsulación de curcumina y un extracto rico en aminoácidos tipo micosporina mediante una nanoemulsión doble.

1.2.3 Objetivos específicos

- Determinar condiciones experimentales que permitan formular una nanoemulsión doble W/O/W mediante método de dos pasos y alta energía.
- Caracterizar fisicoquímicamente la nanoemulsión doble y su estabilidad en diversas condiciones de almacenamiento.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Exposición a la radiación solar y efectos asociados.

La radiación UV es un tipo de onda electromagnética que se divide en UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) y UV-C (280-100 nm) (WHO, 2018). Esta ha sido esencial para la vida en la tierra al actuar como potente mutágeno y agente de selección natural en las primeras formas de vida, es así como los diferentes organismos han evolucionado y desarrollado nuevas estrategias contra la radiación UV (Jablonski & Chaplin, 2010). Por otra parte, la radiación UV, en especial la UV-B, juega un rol importante en la pigmentación de la piel y producción de vitamina D, asociada a la absorción de calcio y fósforo en nuestro organismo, incluso es un recurso utilizado para el tratamiento de enfermedades como la psoriasis, vitíligo y el lupus vulgar (WHO, 2018). Gran parte de la radiación UV que entra a la atmosfera terrestre es del tipo UV-A y representa 95% de esta, mientras que el otro 5% corresponde a UV-B, la radiación UV-C no es capaz de atravesar la capa de ozono (D'Orazio *et al.* 2013).

Tanto la radiación UV-A como UV-B pueden causar daño sistémico y celular. Los efectos asociados a la radiación UV-A son principalmente la foto-oxidación, daño genético indirecto, inmunosupresión, oscurecimiento (Oxidación de los precursores de melanina) y envejecimiento de la piel, y cáncer del tipo melanoma. Mientras que la radiación UV-B provoca eritema en la piel (Quemado), daño genético directo, cáncer del tipo melanoma y no-melanoma (Bias *et al.* 2018).

El cáncer de piel es un problema público que afecta principalmente a las personas con fenotipo I-IV que presentan color de piel blanca (Norte de Europa/británicos) a café ligero (Mediterraneo/Ásia/Latino) (Según índice Fitzpatrick) (D'Orazio *et al.* 2013). Sin embargo, existen otros factores que inciden en la aparición

enfermedades asociadas a la radiación UV como la elevación del sol, altitud, nubosidad, niveles de ozono y reflexión del suelo (WHO, 2002).

2.1.1. Radiación UV, cáncer de piel y efectos celulares.

La organización mundial de la salud estima que cada año aparecen entre 3 a 2 millones de casos de cáncer no-melanoma y cerca de 130 mil casos de cáncer de melanoma, este último es el tipo de cáncer que tiene menor sobrevida (WHO, 2018). Los países que presentan las mayores tasas de cáncer de melanoma y no melanoma son Australia y Nueva Zelanda con una incidencia aproximada de 73 casos/100 mil habitantes, seguido de los países de Europa central y Estados Unidos. Sin embargo, la tasa de sobrevida y recuperación en estos países es alta, debido al gasto público en salud. Por otra parte, los países menos desarrollados tienen tasas de mortalidad cinco veces más alto que los países desarrollados. Las personas con cáncer de piel son detectadas en promedio a los 63 años, aunque, cada vez más se detecta en personas menores a 30 años, especialmente en mujeres (American Cancer Society, 2018; World Cancer Research Fund, 2017).

El cáncer de piel no melanoma incluye a los carcinomas de células basales, de células escamosas y la enfermedad de Bowen (incipiente cáncer de células escamosas). Otras alteraciones que generalmente son incluidas en esta denominación son el cáncer de células de Merkel, carcinoma sebáceo, adenocarcinoma apocrino y otros tumores raros. Los factores de riesgo que influyen en su aparición son la exposición a la radiación ultravioleta, sistemas inmunes suprimidos, bronceado artificial, pieles claras, género/edad, presencia de virus, historia de quemaduras solares y exposición a metales pesados (Apalla *et al.* 2017; Cancer, 2019). Se estima que aproximadamente el 99% del cáncer no-melanoma son del tipo basal y de células escamosas, detectado principalmente en población cuya edad supera los 50 años (Ciążyńska *et al.* 2021).

El cáncer de melanoma, al igual que los cánceres no-melanoma, tiene origen en diversos factores de riesgo como un sistema inmune debilitado, lesiones preexistentes, piel clara, genética e historia de cáncer familiar (Skincancer, 2020). Sin embargo, la radiación UV es el factor principal en la aparición de melanoma. Tanto la radiación UV-A como la UV-B pueden liderar el proceso de melanogénesis. Dependiendo del tipo de radiación es posible identificar dos mecanismos que favorecen la conversión en celular cancerosas. Se ha descrito que la radiación UV-B propicia la melanogénesis a través del daño genético directo donde predomina la aparición de lesiones de ciclobutano pirimidina (CPDs) y el foto-producto pirimidina-pirimidona 6-4 (6-4PP) (Figura 1), los cuales en estados celulares normales son reparados mediante el mecanismo de escisión de nucleótidos (NER, *nucleotide excision repair*). La desregulación de este mecanismo está asociado a la acumulación de lesiones del tipo **C→T** y **CC→TT** propiciando la carcinogénesis de la piel (Noonan *et al.* 2012; Sample & He, 2018).

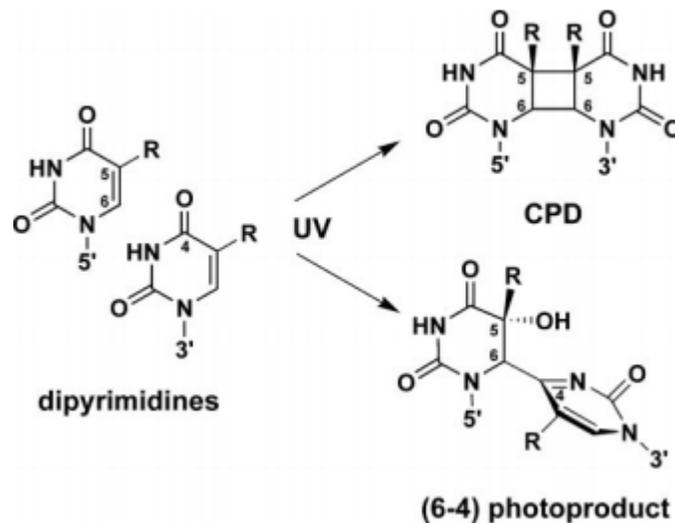


Figura 1. Foto-productos derivados de la exposición a la radiación UV-B. Li *et al.* (2006).

En el caso de la radiación UV-A se ha descrito que el daño genético se produce por la aparición de foto-productos generados indirectamente por la acción especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas incluyen al oxígeno singlete, radical superóxido, radical perhidroxilo, ión peróxido, peróxido de hidrógeno y ión hidroxilo. Mediante la producción de enzimas y moléculas antioxidantes la célula

logra aminorar el daño producido por ROS (desestabilización membrana celular y daño genético). Dependiendo del tipo de ROS es posible encontrar enzimas y moléculas antioxidantes que generan productos menos dañinos para la célula.

Un ejemplo de esto es el ciclo de oxidación y reducción del glutatión, o la acción de enzimas como el superóxido dismutasa, tioredoxina reductasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, dependiendo del producto ROS (Petersen *et al.* 2000) (Figura 2).

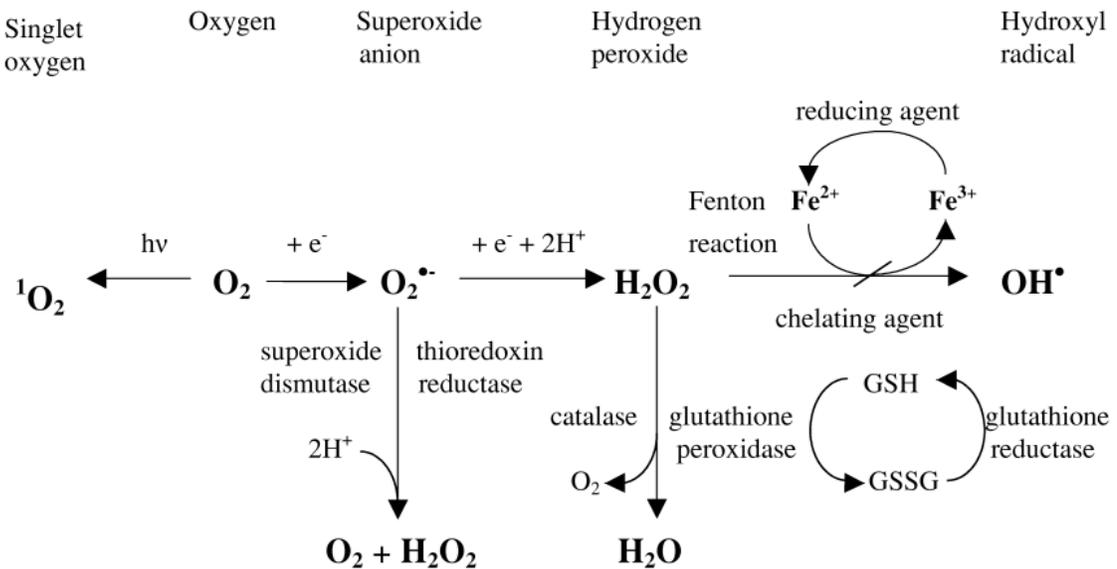


Figura 2. Especies reactivas del oxígeno y su interacción con moléculas antioxidantes. Petersen. *et al.* (2000).

A pesar de que existan mecanismos de protección, de igual manera la aparición del oxígeno singlete (${}^1\text{O}_2$) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) interaccionan con el nucleótido guanina produciendo el foto-producto 8-oxo-7-hidro-deoxi-guanosina (8-oxodG) y 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamido-pirimidina (FapyGua) (Figura 3). Si estos no son reparados mediante el mecanismo NER por la 8-oxoguanina DNA glicosilasa 1 (OGG1), se produce la acumulación de mutaciones de transversión **GC**→**TA** (Hirano *et al.* 2015).

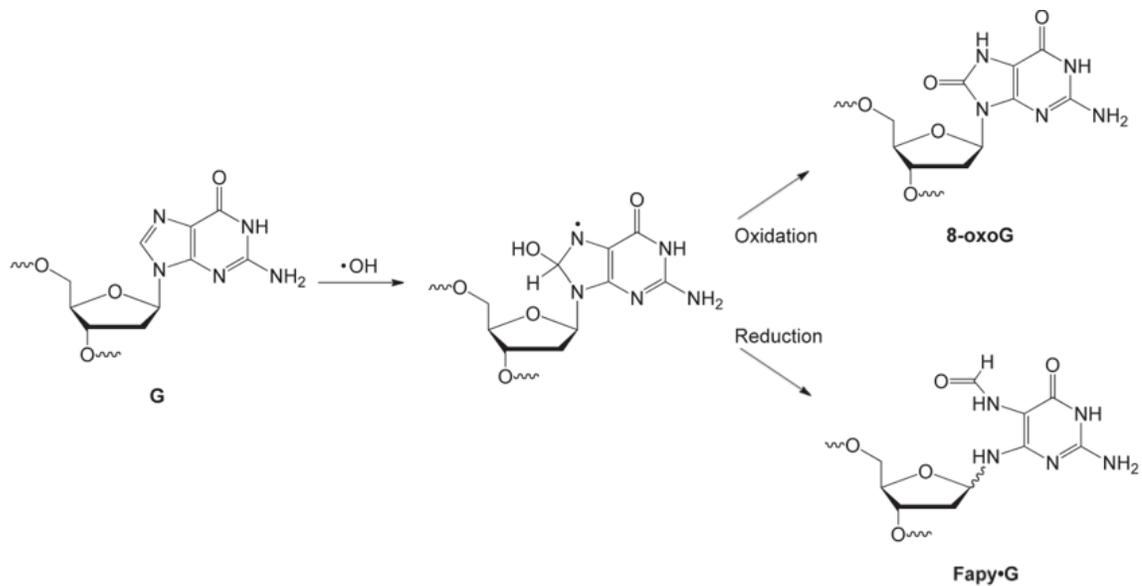


Figura 3. Formación de los foto-productos 8-oxoG y FapyGua a partir del producto intermedio producido por la interacción de la guanina y el radical hidroxilo. Modificado horizontalmente de Delaney *et al.* (2012).

Se estima que entre 3-15% de los casos de melanoma tienen un origen genético. Específicamente, se ve alterada la función del inhibidor 2A de la quinasa dependiente de ciclina (CDKN2A, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* o p16) y en la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4). Otra mutación no germinal y UV-independiente es la mutación BRAF^{V600E} que se da en zonas menos expuestas a la radiación solar. También se ha observado que esta mutación por sí sola no es suficiente para provocar la transformación de los melanocitos, requiriendo un efecto sinérgico con mutaciones en p53 (inducida por radiación UV) o la delección de p14ARF (*alternative Reading frame* o producto proteico resultante del marco de lectura alternativo del locus de CDKN2A). Otras mutaciones asociadas a la radiación UV son las que se dan en NF1 (Neurofibromina 1, promueve la forma inactiva RAS-GDP), RAC1 (movilidad celular y resistencia a drogas) y PTEN (regulador de la vía de señalización AKT) (Sample & He, 2018)

El efecto de la radiación UV-A ha sido estudiado en diversas líneas celulares, tales como melanocitos, fibroblastos y queratinocitos. Ryu *et al.* (2014) en estudios de foto-protección sobre la línea de fibroblasto CCD-986sk determinaron que este tipo de radiación favorece la aparición de ROS, MMP-1 (metaloproteinasa-1, relacionada a la degradación de la matriz extracelular), elastasa (degradación de la elastina y pérdida de elasticidad en tejidos), estos efectos se relacionan al envejecimiento de la piel y a la activación de la vía de señalización NF- κ B y AP-1 conducente a la respuesta pro-inflamatoria. De igual manera la irradiación con la dosis 10 J/cm² provoca una disminución en la viabilidad celular del 30%, medida mediante la reducción de la sal de tetrazolio debido a la actividad metabólica. De la misma manera, Yang *et al.* (2012) en la línea celular HaCaT determinaron la disminución lineal de la viabilidad celular para las dosis de radiación desde 0-20 J/cm² (Figura 4).

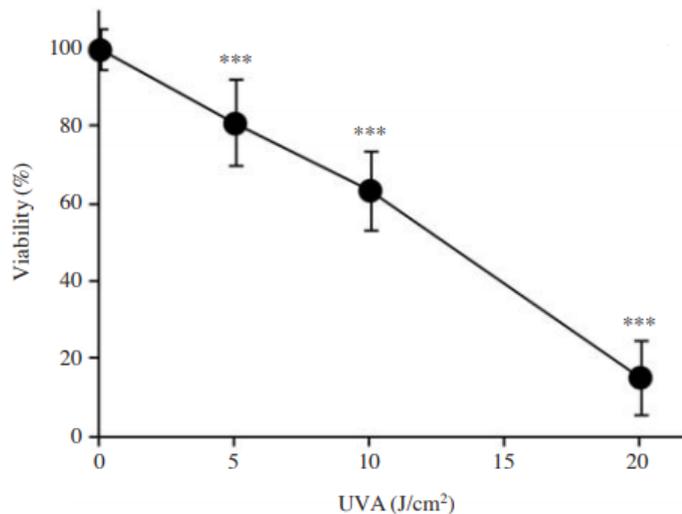


Figura 4. Disminución en la viabilidad celular ante radiación UV-A. Yang *et al.* (2012).

Larsson *et al.* (2005) describieron alteraciones significativas en la membrana plasmática, depleción de glutatión y viabilidad celular en líneas celulares primarias de melanocitos y queratinocitos expuestas a UV-A. Un incremento de células apoptóticas fue detectado 24 y 48 horas después de la irradiación. Estos efectos fueron visibles desde 2 J/cm², pero se acentúan a medida que la dosis de radiación se incrementa.

De igual manera, la radiación UV-B tiene diversos efectos sobre las células animales. Kuanpradit *et al.* (2017) estudiaron el efecto de aplicar extractos de abalón sobre células HaCaT antes y durante la exposición de radiación. Si bien describieron que estos son capaces de proteger al cultivo celular contra la radiación UV-B. También señalan que este tipo de radiación es capaz de reducir la viabilidad celular a un 50% cuando se aplica una dosis de 60 mJ/cm². De igual manera, la exposición de estas células propicia el aumento de moléculas de señalización pro-inflamatorias como COX-2, SAPK/JNK y p38. En otras líneas celulares como HLECs (Human lens epithelial cells), procedente del epitelio cristalino utilizada como modelo para estudiar los mecanismos bioquímicos, la radiación UV-B es capaz de aumentar la concentración intracelular de calcio²⁺ e inducir la expresión y liberación de proteínas pro-apoptóticas (Liu *et al.* 2020).

2.2. Fotoprotectores

Los fotoprotectores surgen originalmente como una estrategia para detener el eritema o “quemadura solar”, el cual es el primer efecto visible asociado a la radiación UV-B. Sin embargo, a lo largo de los años los investigadores determinaron que tanto la radiación UV-B como UV-A son causantes de los diversos fenómenos observados en la piel (Young *et al.* 2016).

Los fotoprotectores se pueden diferenciar en dos grandes grupos: los agentes protectores sistémicos y los protectores de origen tópico. Los primeros consisten en moléculas que pueden ser ingeridas y potencialmente disminuir los efectos mediados por ROS. La molécula β-caroteno ha demostrado ser efectiva controlando los síntomas provocados por fotosensibilidad aguda, previniendo la eritema y sensación de picazón. Otras moléculas estudiadas por dichas propiedades son los retinoides, diferentes polifenoles, vitaminas C, D y E, entre otros (Taylor & Rosen, 2020). A su vez, los fotoprotectores tópicos son los aplicables sobre la piel en forma de cremas o aerosoles, generalmente estos son formulados con moléculas orgánicas y/o inorgánicas capaces de absorber radiación UV. Los compuestos orgánicos utilizados en los fotoprotectores solares se pueden dividir entre filtros UV-A (derivados de benzofenona, avobenzona,

meradimato, antranilato de metilo, entre otros); y filtros UV-B (Para-amino benzoatos o PABA, cinamatos, salicilatos, octocrileno, entre otros). Por su parte, los compuestos inorgánicos incluyen a los denominados filtros físicos como el óxido de zinc, dióxido de titanio, óxido de hierro, caolinita, calamina y talco (Latha *et al.* 2013).

2.2.1. Fotoprotectores sintéticos y controversias

La regulación de los compuestos utilizados en los protectores solares y cosméticos hoy en día es cada vez más estricta. Tanto en la Unión Europea como en Estados Unidos, Australia y Japón, los filtros fotoprotectores deben pasar pruebas toxicológicas, dermatológicas, SPF (Sun protection Factor), UV-A PF (Factor de protección UV-A), resistencia al agua, fotoestabilidad y cuantificación de los productos después de su aplicación (Klimová *et al.* 2015).

La inocuidad y estabilidad de los fotoprotectores ha sido puesto en duda en los últimos años. Estudios recientes en líneas celulares, modelos murinos y peces señalan que muchos de los compuestos orgánicos utilizados en fotoprotectores tienen la capacidad de provocar daño neurológico, desbalance hormonal, daño oxidativo y apoptosis. Además, el ingreso de este tipo de compuesto en las plantas de tratamiento de aguas podría propiciar su acumulación en el medio ambiente, afectando directamente a organismos marinos como corales y peces. Desde el año 2018 el estado de Hawaii en los Estados Unidos, ha promovido el retiro de fotoprotectores que puedan causar un daño al ecosistema marino, en corales se ha observado que el estrés provocado por la polución y cambios en la temperatura propician el proceso de blanqueo que puede llevar a su muerte. En este país, el uso y venta de fotoprotectores que contengan oxibenzona, octinoxato, avobenzona y octocrileno, está prohibido. A pesar de esta iniciativa, se estima que cada año se liberan más de 14.000 toneladas de protectores solares a los océanos del mundo los cuales contienen este tipo de compuestos orgánicos (Brunning. 2019; Pandika. 2019; Hawaii State Legislature, 2021). En humanos, estos compuestos se han detectado en el plasma sanguíneo, placenta y orina. Sin embargo, la concentración detectada es baja para ser considerada

como peligrosa o para provocar algún tipo de trastorno asociado. Aunque más estudios son necesarios para determinar el efecto real de dichos compuestos (Ruszkiewicz *et al.* 2017; Narla & Lim. 2019).

En el año 2019, la agencia para la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) definió un nuevo marco regulatorio que actualizará los requerimientos para productos fotoprotectores, donde se reconoce a los filtros inorgánicos óxido de zinc y óxido de titanio como seguros y efectivos (GRASE por sus siglas en inglés), mientras al menos 12 filtros orgánicos (cinoxato, dioxibenzona, ensulizol, homosalato, meradimato, octinoxato, octisalato, octocrileno, padimato O, sulisobenzona, oxibenzona y avobenzona) son considerados como categoría III para los cuales falta evidencia para ser considerados como GRASE. Para las formulaciones que contienen estos compuestos se ha propuesto que, tras su aplicación, la concentración en el plasma sanguíneo no debe exceder 0.5 ng/mL estado estacionario, entendiendo esto como uso diario. Por debajo de dicho umbral el compuesto no requeriría demostrar inocuidad en estudios de carcinogénesis y toxicidad reproductiva (Souzzi *et al.* 2020). En este sentido Matta *et al.* (2019), realizaron ensayos para determinar la concentración en plasma de avobenzona, oxibenzona, octocrileno y un derivado de alcanfor de bencilideno, en 24 voluntarios durante 7 días y una dosis de aplicación 2 mg/cm² aplicada 4 veces al día. Los autores lograron determinar que la concentración de dichos compuestos superó el umbral propuesto, concluyendo que la relevancia de estos niveles permanece sin ser conocida.

2.2.2. Moléculas naturales como fotoprotectores

El aumento en la conciencia por el cuidado de la piel ha llevado a no solo producir productos basados en productos fotoprotectores sintéticos (Moléculas que absorben radiación UV-A y UV-B) que a la vez han sido criticados por generar fotosensibilizadores que interaccionan con moléculas cutáneas provocando efectos adversos, sino que también ha llevado a la diversificación de estos y a la

inclusión de moléculas naturales como fotoprotectores (Saewan & Jimtaisong, 2015).

En este sentido, el uso de moléculas naturales ha resultado interesante debido a su capacidad antioxidante y absorción de radiación UV-A y UV-B. Se pueden reconocer tocoferoles, flavonoides, ácidos fenólicos, compuestos nitrogenados (índoles, alcaloides, aminas y aminoácidos) y monoterpenos, las cuales son obtenidas principalmente de extractos vegetales (y/o su posterior purificación). Calò & Marabini (2014) obtuvieron un extracto de arándano azul (*Vaccinium myrtillus*) que contenía una mezcla de polifenoles y antocianinas, el cual fue puesto en contacto con la línea celular HaCaT en presencia y ausencia de radiación UV-A y UV-B, se observó baja citotoxicidad y capacidad de protección contra la radiación. Yoo *et al.* (2014) estudiaron el efecto del extracto de *Lithispermum erythrorhizon* sobre la línea celular HaCaT en función de su capacidad antioxidante, demostraron que el extracto de esta planta protege contra el efecto oxidativo de H₂O₂. Auh & Madhavan (2021) evaluaron el efecto combinado de extractos de tagetes y romero sobre líneas celulares y ratones, se demostró que biomarcadores relacionados a foto envejecimiento como metaloproteinasas, interleucinas, TNF- α , entre otros, son inhibidos tras la aplicación tras esta mezcla de extractos vegetales.

2.2.3. Moléculas fotoprotectoras de origen marino

Las algas son un biocurso con un alto potencial comercial debido a la cantidad de moléculas beneficiosas para la salud humana, incluyendo capacidad antioxidante y de protección contra el daño provocado por la radiación UV. Al respecto, se han descrito moléculas como plastoquinonas (Participan en la transferencia de electrones en la fotosíntesis), sargacromenol, fucoxantina, astaxantina, aminoácidos tipo micosporina, florotaninos, entre otras (Saewan & Jimtaisong, 2015). Luna *et al.* (2018) estudiaron el efecto de la fucoxantina, carotenoide presente en el alga parda *Sargassum siliquastrum*, sobre el eritema inducido en ratones, se comprobó la reducción de moléculas inmunológicas (TNF- α e IL-6), especies reactivas del oxígeno (ROS) y lactato deshidrogenasa

(LDH). Heo *et al.* (2009) Realizaron la purificación de los florotaninos floroglucinol, eckol y dieckol desde el alga *Ecklonia cava*, luego expusieron dichas moléculas a una línea celular de fibroblasto en presencia de radiación UV-B, se observó una disminución en la melanogénesis, estados oxidativos y un aumento en la proliferación celular.

2.2.4. Aminoácidos tipo micosporina

Los aminoácidos tipo micosporina o MAAs (Por su sigla del inglés *mycosporine-like aminoacids*) son metabolitos secundarios que se encuentran en algas rojas y una variedad de organismos expuestos a altas dosis de radiación solar. Son moléculas de bajo peso molecular (<400 Da), sin color, solubles en agua y con una alta capacidad de absorción UV (principalmente UV-A). El precursor de las MAAs es el compuesto llamado 4-deoxygudasol, el cual se sintetiza a partir de la ruta del ácido shikímico. Esta ruta comienza con el fosfoenol piruvato de la glicólisis y eritrosa-4 fosfato de la ruta pentosa fosfato. Posteriormente la enzima DAHP sintasa y DHQ sintasa llevaran el producto 3-deshidroquinato que posteriormente formará el precursor 4-deoxygudasol (Bathia *et al.* 2011). Cabe mencionar que se ha descrito otra ruta de síntesis para MAAs, en donde el intermediario sedoheptulosa 7-fosfato lleva a la formación de 4 deoxygudasol y posteriormente a shinorina ($\lambda_{\text{Máx}}$ 334 nm) (Figura 5). Sin embargo, es micosporina-glicina quien sufre las modificaciones que llevan a las diferentes familias de MAAs como. Estas reacciones están mediadas por 4 enzimas (dehidroquinato sintasa o DHQS, O-metiltransferasa o O-MT, adenosina trifosfato grasp y sintetisas péptido no-ribosomal), que derivan de un *gene cluster* descrito para cianobacterias, dinoflagelados, corales y algas. Aunque dependiendo de la especie existen diferencias en dicho *gene cluster* (Miyamoto. 2014; Rosic. 2019).

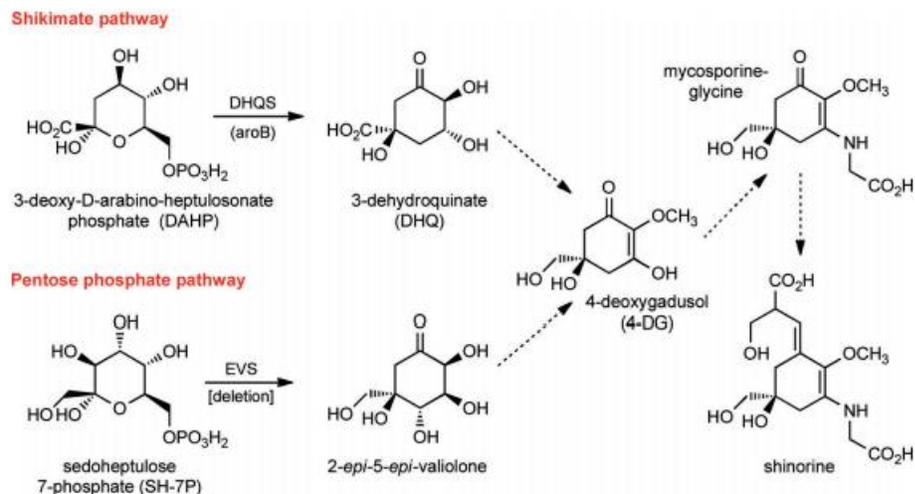


Figura 5. Rutas propuestas para la formación de MAAs. Las dos rutas señaladas llevan a la formación de Shinorina. Spence *et al.* (2017).

La estructura básica de las MAAs puede ser de dos tipos: ciclohexenona y ciclohexenamina. Las aminociclohexenona son ciclohexenonas conjugadas con un aminoácido en su tercer carbono, y tienen máximo de absorción entre 309-320 nm. Algunas MAAs de este tipo son micospolina-glicina, micospolina-aurina, micospolina-serina, micospolina-serinol, entre otras. Por otra parte, las MAAs del tipo ciclohexenamina contienen glicina en su tercer carbono y un radical tipo aminoácido, aminoalcohol o enaminona (Figura 6). Tienen una alta capacidad de absorción entre 330-360 nm (Chrapusta *et al.* 2017).

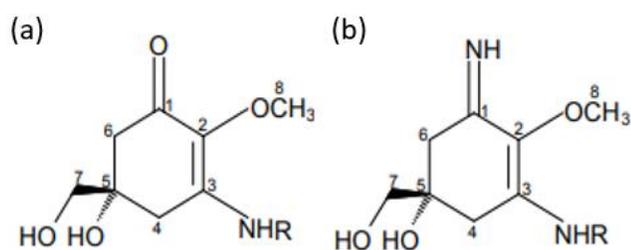


Figura 6. Estructura básica de los MAAs, (a) Ciclohexanona. (b) Ciclohexenamina. Chrapusta *et al.* (2017).

2.2.4.1. Efectos celulares de los MAAs

Por su alta capacidad de absorción en el espectro del UV, se ha propuesto el uso de los MAAs en el ámbito de la fotoprotección y cuidado de la piel, pero también tienen múltiples aplicaciones potenciales como agente anti-cancerígeno, cicatrizantes y funcionalización de materiales UV-protectores (Chrapusta *et al.*

2017). Además, estas moléculas interactúan con diversos factores de transcripción y elementos moleculares, lo cual desemboca en la síntesis de moléculas antioxidantes y detoxificación de xenobióticos. Choi *et al.* (2015) estudiaron el efecto de las MAAs sobre el proceso de cicatrización de heridas. En este estudio se demostró que las MAAs activan fuertemente a las cinasas de adhesión focal (FAK), cinasas de regulación de señales extracelulares (ERK) y cinasas c-Jun N-terminal (JNKs), esta interacción está directamente relacionada al proceso de proliferación celular, migración asociada a re-epitelización y granulación de tejido (cicatrización). Estudios de exposición de lipopolisacáridos (LPS) sobre la línea celular THP-1 (línea mielomonocítica) y la posterior aplicación de MAAs sobre estas, demostró disminuir la actividad NF- κ B (inductor de procesos inflamatorios) (Becker *et al.* 2016). Gacesa *et al.* (2017) estudiaron la interacción entre Porphyrina-334 (P-334) y Nrf2-Keap1, concluyendo que P-334 es capaz de disociar Nrf2 de Keap1. Lo anterior se asocia a un aumento en la producción de moléculas y proteínas contra el estrés oxidativo, antes y después de irradiar UV-A sobre líneas primarias de fibroblastos. Particularmente, Shinorina y porphyrina-334, presentan una alta afinidad por el complejo Keap-Nrf2 en condiciones de estrés oxidativo. La liberación del factor de transcripción Nrf2 se ve favorecida en presencia de las MAAs antes mencionadas. Llevando a la célula a un proceso de detoxificación mediante la síntesis de moléculas antioxidantes (Figura 7).

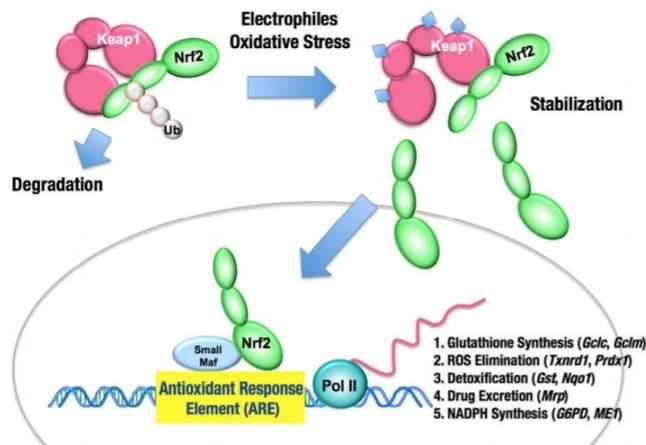


Figura 7. Esquema de liberación de Nrf2, la cual constantemente ubiquitinizada mediante Keap1. La inactivación de Keap1 libera a Nrf2 para ser translocado hacia el núcleo. *Mitsubishi et al.* (2012).

Yang *et al.* (2012) comprobaron que el uso de extractos ricos en MAAs sobre líneas celulares sometidas a radiación UV-A es capaz de aminorar el daño celular fotooxidativo. En otro estudio reportado por Ryu *et al.* (2014) fue posible establecer la capacidad de P-334 semipurificada como un potente inhibidor de la elastasa y supresión de ROS.

2.2.4.2. Luche o *Pyropia columbina* como fuente de MAAs

Pyropia columbina es un alga roja conocida como popularmente como luce, distribuido a lo largo de la costa chilena. Anteriormente conocida como *Porphyra columbina*, puede ser distinguida de otras especies por su color rosado-violáceo y rojo verdoso. Morfológicamente alcanza los 15 cm de largo, 5 cm de ancho y 150 μm de grosor. El tejido del alga se compone de aproximadamente 80% de H_2O ; mientras que el otro 20% son minerales, proteínas y lípidos (Hernández. 2013). En el alga luce, la concentración de MAAs puede variar según diferentes factores como la radiación recibida, concentración de sales en el medio y factores intrínsecos (Korbee *et al.* 2006).

Se ha descrito que en el alga *P. columbina* están presentes las micosporinas Porphyra-334, shinorina, micosporina-glicina, palitinol, asterina-330. La cantidad de micosporinas presentes en *P. columbina* se ha estimado entre 7-10 mg/g alga seca, utilizando extracción orgánica mediante metanol 20% (Huovinen *et al.* 2004). En este estudio, la identificación de MAAs se realizó a través de HPLC permitiendo confirmar que Porphyra-334 es el componente principal del pool de MAAs.

En estudios conducidos por Korbee *et al.* (2004) para caracterizar las MAAs presentes en *P. columbina* ante diferentes condiciones de radiación y sales. Los autores de este estudio determinaron que la concentración inicial de estas es aproximadamente 6 mg/g (MAAs/alga seca), mientras que variando la concentración amonio en el medio se puede alcanzar cerca de 9 mg/g (MAAs/alga seca). La extracción de MAAs se realizó mediante solvente metanol-agua (20%) a una temperatura de 45°C durante 2 horas, mientras que el análisis

de las muestras fue realizado por HPLC, utilizando como referencia los espectros de absorción y tiempo de retención de diferentes estándares extraídos de las algas *Mastocarpus stellatus*, *Bostrychia scorpioides* y *P. yezoensis* (Korbee et al. 2004).

Carpentier *et al.* (2016) reportaron la cuantificación de MAAs presentes en diferentes especies de macroalgas presentes en las regiones de Valparaíso y Magallanes, entre ellas *P. columbina*. Mediante extracción con metanol (0.15 g de masa húmeda/ 15 mL metanol), se determinó aproximadamente una cantidad de MAAs de 2.5 mg/ g de alga húmeda en la región de Valparaíso y 1.5 mg/g alga húmeda en la región de Magallanes.

En un estudio realizado en la Universidad San Sebastián. Se realizó la optimización en la extracción de MAAs desde el alga luce. Se determinaron las condiciones óptimas de extracción, las cuáles fueron 28°C durante 3 horas en medio acuoso. La cuantificación de MAAs totales se calculó en base al estándar micosporina-serinol, obteniendo 21.5 mg MAAs/g alga seca (Silva. 2019).

2.3. Curcumina: Uso tópico

La curcumina es un compuesto polifenólico de bajo peso molecular (368,37 g/mol) y naturaleza lipofílica, que se puede encontrar en la raíz de la planta *Curcumuma longa*. La curcumina junto a dimetoxicurcumina y bismetoxicurcumina reciben el nombre de curcumonoides (Figura 8) (Benediktsdottir *et al.* 2015). Los compuestos curcuminoideos han sido estudiados por su potencial antiinflamatorio, anticancerígeno y antioxidante (Araiza *et al.* 2018).

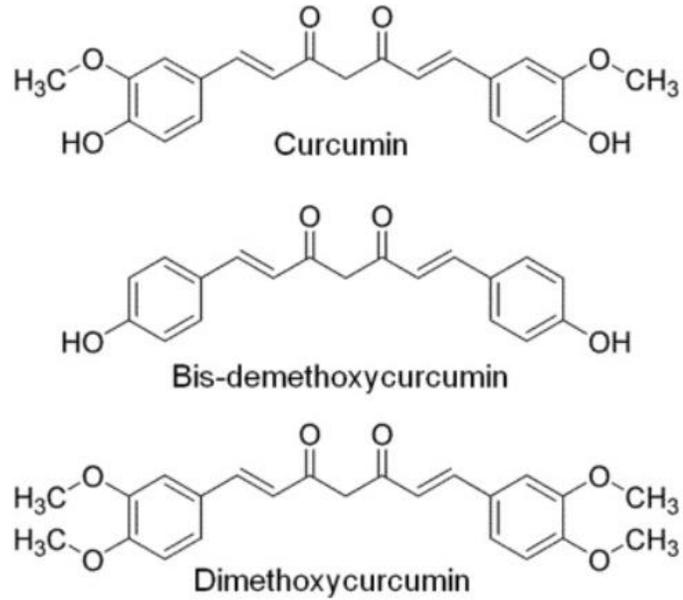


Figura 8. Curcuminoides. Benediktsdottir *et al.* (2015).

Son diversos los mecanismos moleculares por los cuales actúa la curcumina. Experimentos *in vitro* e *in vivo* han revelado que la curcumina regula diversas rutas de señalización celular sobre-reguladas en células cancerígenas. Algunas de estas rutas son NF- κ β , (relacionada a proceso inflamatorio), Akt/PI3K (Sobrevivencia y proliferación celular), Notch-1 (Diferenciación y mantenimiento celular), Wnt/ β -catenina JAK/STAT, AMPK, mTOR, entre otras (Figura 9) (Shehzad & Lee. 2013).

tumores, al igual que el número de estos. De la misma manera, Li *et al.* Observaron que la aplicación tópica de curcumina sobre ratones BalB/c irradiados con 300 mJ/cm², disminuye los procesos inflamatorios y la desestabilización de la membrana celular e induce la acumulación nuclear del factor de transcripción Nrf2. Cho *et al.* (2018) estudiaron el efecto combinado de extractos de las especies *Curcuma longa* y *Diospyros lotus*. Estos fueron aplicados de manera tópica durante 30 minutos antes de irradiar (UVB) ratones SHK-1 durante 37 días. El estudio permitió demostrar la sinergia de ambos extractos al demostrar que regularon positivamente la producción de antioxidantes endógenos a través del factor Nrf2, previnieron la hiperplasia epidérmica y la degradación de colágeno.

2.4. Sistemas emulsionados, micro y nano-emulsionados

Los sistemas emulsionados se producen por la unión de una fase dispersa con una fase continua, las cuales son inmiscibles entre ellas y estabilizadas mediante otro componente llamado surfactante. Las emulsiones tienen aplicaciones en diversas industrias como alimentos, cosmética, automotriz, entre otras. La alta tensión superficial que se da entre la interacción de las dos fases antes mencionadas impide que una esté inmersa en la otra. El surfactante disminuye la tensión superficial y permite la unión de dichas fases en forma de emulsión tipo agua aceite (W/O) o aceite-agua (O/W) (Figura 10).

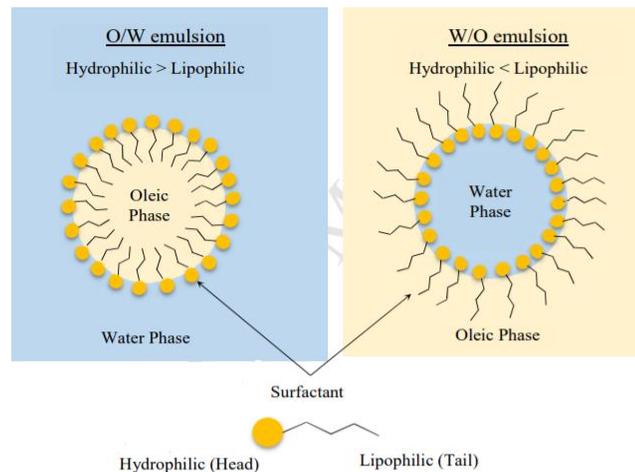


Figura 10. Representación gráfica de emulsiones tipo O/W y W/O estabilizadas por surfactante. Mohamed *et al.* (2018).

La interacción entre los tres componentes básicos de las emulsiones puede ser observados en un diagrama de fases ternario en donde se aprecian regiones de formación de emulsiones tipo W/O, O/W u otras regiones dependiendo del método de producción (Anton & Vandamme. 2011) (Figura 11).

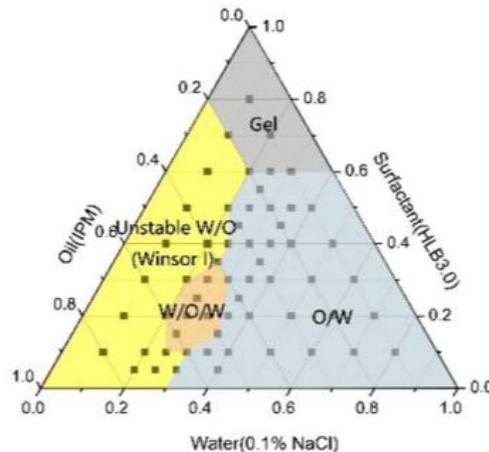


Figura 11. Ejemplo de diagrama de fases ternario para la formulación de emulsiones mediante método de emulsificación espontánea. Wang *et al.* (2018).

Un término importante ligado al desarrollo y formulación de las emulsiones es el balance lipofílico-hidrofílico (HLB), este describe la capacidad de un surfactante para formar un tipo de emulsión específica o la afinidad de un tensioactivo por la fase acuosa u oleosa. Un HLB entre 3-6 forma emulsiones W/O mientras que un HLB entre 8-16 forma emulsiones tipo O/W (Schmidts *et al.* 2010). Las nuevas estrategias de producción de emulsiones incorporan la disminución en el tamaño de glóbulo, generando los términos microemulsiones y nanoemulsiones. La principal diferencia entre las microemulsiones y nanoemulsiones no está dada por el tamaño de partícula (que va de 200-500 nm, e incluso hasta 1000 nm), si no, en el método de producción. Las microemulsiones se formulan mediante métodos de baja energía, mientras que las nanoemulsiones se forman por métodos de alta energía como agitación de alta velocidad, ultra-sonicación u homogenización por alta presión (Anton & Vandamme. 2011; Yukuyama *et al.* 2016). Un análisis más detallado entre las diferencias entre microemulsiones y nanoemulsiones se dan en la revisión añadida en este trabajo (Anexo 8.10).

2.4.1. Surfactantes

La palabra surfactante es una abreviación de la palabra *surface active agent* o agente tensioactivo, y hace referencia a la capacidad que estos tienen para disminuir la tensión superficial en la interfase de dos fases inmiscibles. Los surfactantes tienen la característica de poseer un extremo lipofílico, el cual tiene una fuerte afinidad por solventes apolares, y un extremo hidrofílico con afinidad por solventes polares (Dave & Joshi. 2017). A partir de lo anterior los surfactantes pueden clasificarse según la carga presente en su cabeza hidrofílica, reconociendo los surfactantes iónicos (Aniónicos, catiónicos y anfóteros) y no iónicos (Figura 12).

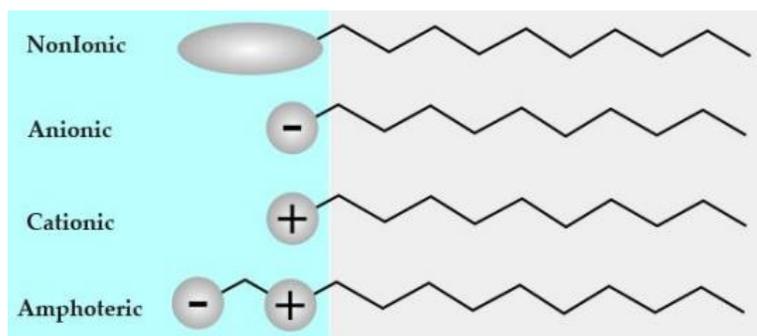


Figura 12. Representación de diferentes tipos de surfactantes, en la sección celeste se encuentra la parte hidrofílica, mientras que en la sección gris la parte hidrofóbica. Dave & Joshi (2017).

Los surfactantes aniónicos están cargados negativamente en su cabeza polar. Estos compuestos son utilizados en shampoos por sus excelentes capacidades de limpieza y remoción de aceite. Existen cinco subgrupos de surfactantes aniónicos los que incluyen los del tipo álcali metal y amonio, surfactantes de metales divalentes y trivalentes, jabones basados en aminas, alquil sulfatos y alquil fosfatos. Estos surfactantes son utilizados como bactericidas y antisépticos (Mishra *et al.* 2009).

Los surfactantes anfotéricos se definen como surfactantes que poseen aniones y cationes en su cabeza hidrofílica. La parte catiónica está formada por una sal de amina o amonio cuaternario, mientras que la sección aniónica contiene carboxilato, sulfonato o fosfato. Este tipo de surfactantes se comporta de forma

aniónica, catiónica o zwitterion dependiendo del pH en el que está inmerso, generalmente, aniónico bajo condiciones alcalinas y catiónico cuando el pH es ácido. Estos poseen propiedades como bactericida, presentan baja toxicidad, resistencia a aguas duras y son compatibles con diferentes surfactantes (Babajanzadeh *et al.* 2019).

Los agentes tensioactivos o surfactantes no-iónicos no producen iones en soluciones acuosas y como consecuencia son compatibles con otros surfactantes (Tensioactivos catiónico-aniónico tienden a precipitar). Los tensioactivos no iónicos presentan características como alta capacidad humectante, dispersante y espumante (Bajpai & Tyagi, 2010), su capacidad bactericida es baja, mientras que su toxicidad depende del tamaño de la cadena hidrófoba (alquil) y de su cadena polietoxilada, aunque exhiben una muy baja ecotoxicidad (Babajanzadeh *et al.* 2019). A continuación, se mencionan los nueve tipos de tensioactivos no iónicos más importantes: (1) surfactantes derivados de alcoholes grasos o alcoholes etoxilados y alquil fenol etoxilados, los cuáles exhiben una gran tolerancia a condiciones extremas de pH y concentración de iones, dado principalmente por la presencia de un enlace éter que reduce sus probabilidades de ser hidrolizados; (2) Alquil glucósidos, se sintetizan mediante una reacción de condensación en medio ácido de un alcohol graso y un glucósido. Son biodegradables, buenos espumantes y utilizados principalmente en detergentes para vajillas; (3) Ésteres de sorbitano, son una amplia familia de surfactantes que son sintetizados por la adición de varias unidades de etilenglicol (hidratación a alta temperatura de óxido de etileno) a una molécula de sorbitano y su esterificación con un ácido graso de cadena media y larga. El grado de etoxilación de la unidad de sorbitano genera surfactantes con un balance hidrofílico-lipofílico alto lo que permite estabilizar emulsiones del tipo O/W. Por el contrario, si la unidad de sorbitano no se encuentra etoxilada y solo se sustituye una o varias cadenas de ácido graso, facilita la formación de emulsiones tipo W/O (Croda .2010; Croda. 2013); (4) Alquil-fenoles polietoxilados o etoxilatos de alquilfenol; (5) Alcoholes polietoxilados; (6) Co-polímeros de bloques de polioxietilen-polioxipropilen y óxido de etileno-óxido de propileno; (7) polioxietilen mercaptano;

(8) ésteres de ácido carboxílico de cadena larga; (9) ésteres de propilen glicol, sorbitol y polioxietilen sorbitol (Bajpai & Tyagi. 2010; Croda. 2010; Salager, 2002).

2.4.2. Balance hidrofílico-lipofílico (HLB)

El término HLB fue desarrollado por William Griffin en 1949 y se definió como el balance entre tamaño y fuerza de la cabeza hidrofílica y lipofílica, a la cual se le puede asignar un valor numérico. Dicho número está asociado a la formación de emulsiones, humectantes, detergentes o solubilizantes (Tabla 1) (Croda. 2013).

Tabla 1. Aplicaciones de los surfactantes según HLB. Croda (2013).

Intervalo HLB	Característica
4-6	Emulsión W/O
7-9	Agente humectante
8-18	Emulsión O/W
13-15	Detergente
10-18	Solubilizante

El cálculo del número HLB se puede realizar mediante ecuaciones características para cada tipo de surfactante. Por ejemplo, el HLB para surfactantes alquil éteres o alcoholes grasos etoxilados se puede obtener mediante la siguiente Ec (1).

$$HLB = \frac{E}{5} \text{ Ec. (1)}$$

Donde E representa el porcentaje de masa de la porción hidrofílica compuesta por óxido de etileno. El cálculo del HLB para alquil ésteres de sorbitano fue descrito por la Ec (2).

$$HLB = 20 * \left(1 - \frac{S}{A}\right) \text{ Ec. (2)}$$

Donde S representa el índice de saponificación y A es el índice de acidez. Por otra parte, el HLB para una mezcla de surfactantes puede ser descrito por la Ec (3) donde f_i representa la fracción del surfactante i.

$$HLB = \sum HLB_i * f_i \text{ Ec. (3)}$$

Pasquali *et al.* (2008) realizaron una revisión de las ecuaciones teóricas para el cálculo de HLB en surfactantes no iónicos, los autores indican que estas ecuaciones al igual que el valor reportado por el productor del tensioactivo debe ser tomado como una orientación, mientras que un cálculo más riguroso del HLB puede ser calculado desde su composición química o tomando un tensioactivo de referencia con HLB caracterizado.

El HLB requerido es un término asociado a la fase dispersa, al aceite o mezcla de aceites, ácidos grasos, alcoholes o resinas utilizadas, y es el HLB que se requiere para formar una emulsión estable (Croda. 2013). En el caso de la tabla 2, se observan valores o intervalos de HLB para los cuales se ha reportado la formulación de una emulsión o nanoemulsión estable para la fase oleosa compuesta por aceite mineral. Sin embargo, este valor puede variar dependiendo del aceite, tensioactivos, % de la fase acuosa y oleosa, temperatura de operación, entre otros.

Tabla 2. Intervalos de HLB requerido para formar emulsiones y nanoemulsiones estables mediante aceite mineral.

Intervalo HLB	Emulsionantes	Tipo Emulsión	Método	Referencia
4.3-4.7	Span 80 y Span 60	Emulsión W/O	Alta Energía	Schmidts <i>et al.</i> (2010).
6	No reportado.	Emulsión W/O	No reportado	Croda (2013).
7.5	Span 80 y Tween 80	Nanoemulsión W/O	Alta Energía.	Gómez (2014).
9-11	No reportado	Emulsión O/W	No reportado	Croda (2013)
10.5-11	Span 80 y Tween 80	Nanoemulsión O/W	Baja Energía	Yu <i>et al.</i> (2012).
10	Span 80 y Tween 80	Nanoemulsión O/W	Baja Energía	Khan <i>et al.</i> (2018).
10.3	Span 80 y Tween 80	Nanoemulsión W/O	Baja Energía	Liu <i>et al.</i> (2006).

2.5. Encapsulación de compuestos activos de interés comercial mediante nanoemulsiones

Los sistemas nano-emulsionados permiten encapsular compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica. Sari *et al.* (2015) generaron una nanoemulsión del tipo O/W compuesta por aceite “triglicéridos de cadena media” (MCT), una mezcla de surfactantes Tween 80, proteína de suero concentrada (WPC) y curcumina. Mediante al método de homogenización ultrasónica los autores de este trabajo lograron obtener una formulación estable a diversas condiciones de temperatura, un tamaño de partícula de 141.6 nm y alta eficiencia de encapsulación. Otra aproximación de este tipo fue la realizada por Mehmood *et al.* (2018), utilizando un diseño experimental central compuesto optimizaron la nanoencapsulación de β -caroteno mediante aceite de oliva y Tween 80/Lecitina de soya. Los factores utilizados en dicho estudio fueron el porcentaje de aceite, porcentaje de surfactante y tiempo de homogenización ultrasónica. Por otra parte, Rodrigues *et al.* (2018), obtuvieron una nanoemulsión que incorporó un extracto de *Copaifera paupera* que contenía Span 80/Tween 80 contra el parásito de la leishmaniasis, el tamaño de partícula fue de 24.5 a 200 nm el cual fue logrado mediante homogenización ultrasónica.

2.5.1. Nanoemulsiones de uso tópico para uso cosmético y el cuidado de la piel

Las nanoemulsiones en el ámbito cosmético permiten una liberación controlada de los compuestos activos e incrementa su interacción con las células de la piel, aportan estabilidad física, alta eficiencia de encapsulación y direccionamiento de la nanoformulación (Kaul *et al.* 2018). La nanovehiculización permite que los compuestos activos puedan penetrar más allá del estrato corneo (primera capa de la piel) como se puede observar en la Figura 13. Existen diversas formas de interacción y penetración en la piel, dependiendo del tamaño, forma carga superficial, potencial zeta, y flexibilidad de la estructura.

Arantes *et al.* (2017) desarrollaron y caracterizaron una nanoemulsión del tipo O/W que contenía nifedipina. Este fármaco fue inicialmente sugerido para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, esta molécula ha sido propuesta como tratamiento periocular y de arrugas. La nanoemulsión se produjo utilizando 5 minutos de homogenización ultrasónica, y una mezcla de surfactantes como Pluronic F127 (Poloxamer) y Tween 20 en la fase acuosa, mientras que en la fase oleosa se añadió Nifedipina y Transcutol. El tamaño de partícula obtenido fue de aproximadamente 20 nm con estabilidad reportada por 210 días. Azevedo *et al.* (2015) generaron una nanoemulsión junto con extractos de *Opuntia ficus-indica* como agente humectante. Los autores utilizaron homogenización de alta velocidad mediante el equipo Ultraturrax a 11.000 rpm durante 5 minutos, obteniendo tamaños de partículas aproximados de 14 nm.

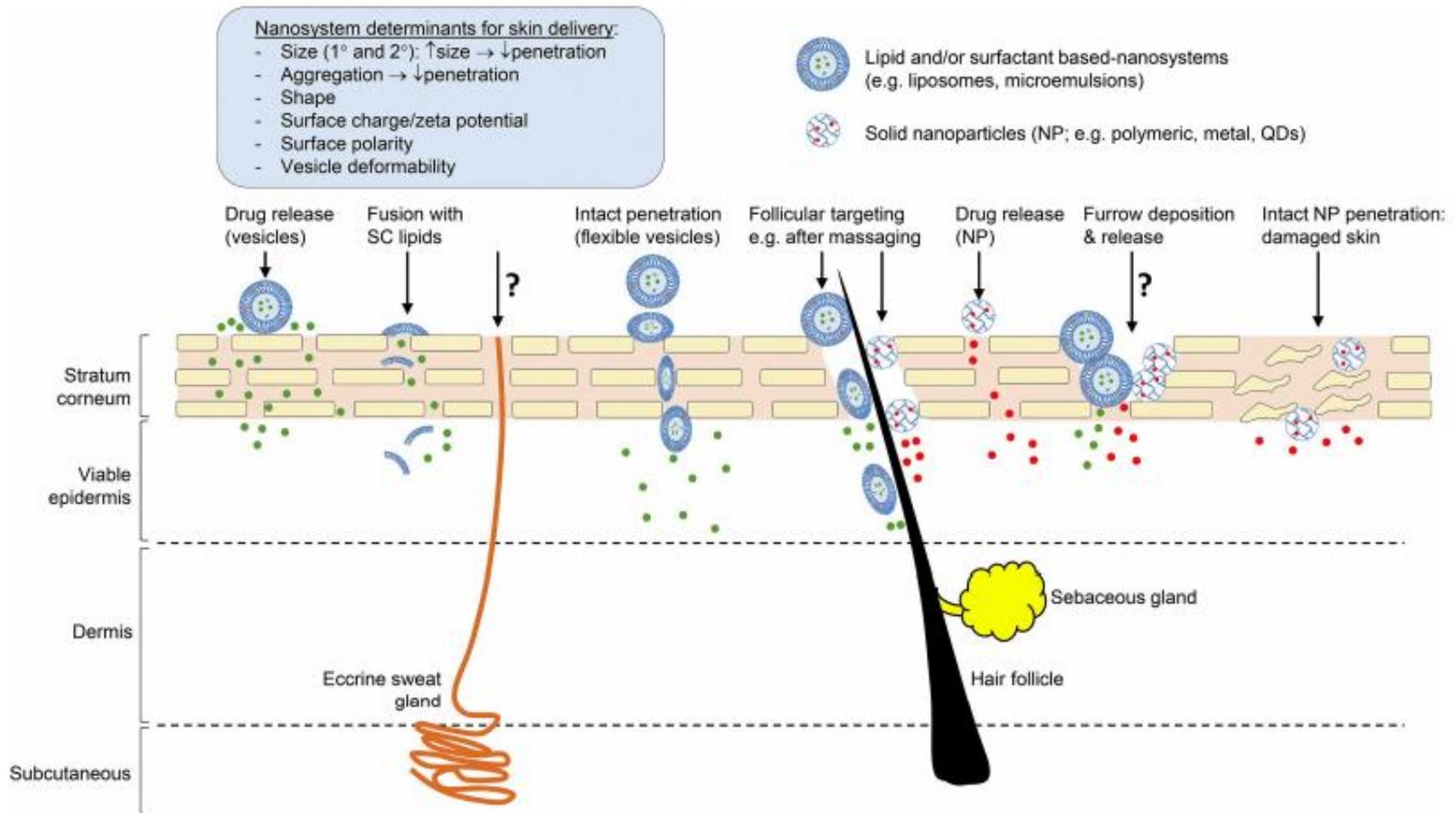


Figura 13. Rutas de penetración en la piel de diversos sistemas de nanovehiculización. Nastiti *et al.* (2017).

2.5.2. Emulsiones y nanoemulsiones dobles del tipo water-in-oil-in-water (W/O/W)

Una de las limitaciones de las nanoemulsiones del tipo W/O y O/W es que no permiten la unión entre compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos en un solo glóbulo. Este problema puede ser resuelto mediante la formulación de emulsiones o nanoemulsiones dobles. Existen diversos métodos para lograr este tipo de emulsiones. Sin embargo, el más reconocido es el de emulsificación secuencial o de dos pasos. Este consiste en generar una emulsión primaria del tipo W/O o O/W, la que posteriormente es añadida sobre la fase final (Figura 14). Un análisis más detallado puede ser consultado en el Anexo 8.10 y Sheth *et al.* (2020).

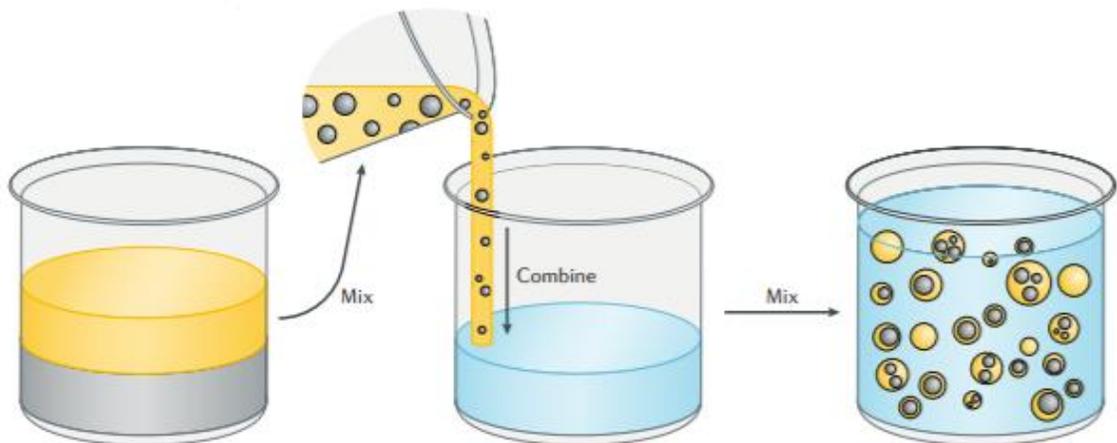


Figura 14. Método secuencial para la formulación de emulsiones y nanoemulsiones dobles. Sheth *et al.* (2020).

Aditya *et al.* (2014) generaron un sistema de nanoemulsión doble para integrar las moléculas curcumina (lipofílico) y catequina (hidrofílica), esto a través del uso de los surfactantes poliglicerol poliricinoleato/gelatina y Tween 80. El método utilizado fue homogenización mediante agitación magnética para crear la emulsión gruesa y luego homogenización ultrasónica (pulso de 3 segundos homogenización) para la emulsión de tamaño micrométrico (tamaño partícula aprox. 6 μm).

Tang & Sivakumar (2012) formularon una nanoemulsión doble de aproximadamente 400 nm para la encapsulación de aspirina a través de

homogenización ultrasónica. Los tiempos de homogenización fueron 90, 120 y 150 segundos para la primera emulsión, y 15, 30, 60, 90 y 120 segundos para la segunda emulsión, mientras que los surfactantes utilizados fueron span80/Pluronic F68/glucosa/gelatina y Cremophor. Esta estrategia permitió obtener una nanoemulsión doble estable por al menos 30 días.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y METODOLOGÍA

A continuación, se detallan los materiales y metodología para el desarrollo de la nanoemulsión doble.

3.1 Desarrollo nanoemulsión doble

3.1.1 Material Biológico

- *Pyropia columbina* proporcionada por la empresa Comercializadora y Exportadora de Frutos Acuícolas. La extracción del alga se realizó en el mes de abril de 2021 desde sector desembocadura Río Bíobio.
- *Pyropia columbina* proporcionada por el ex Instituto de Ciencia y Tecnología de la Universidad Arturo Prat en Talcahuano. Esta fue extraída desde la Bahía de Coliumo en enero de 2020.

3.1.2 Equipos, reactivos y software

Tabla. 3. Equipos, reactivos y software utilizados en el desarrollo de nanoemulsión dobles.

Equipos	Reactivos	Software
-Agitador Orbital N Biotek NB101-M. -Analizador de partículas Brookhaven ZetaPlus -Analizador de partículas Malvern Zetasizer. -Analizador de partículas Microtrac Nanotracs Wave II. -Balanza analítica (Shimadzu Aux 120). -Columna C-18 Luna Phenomenex. -Estufa de secado Shel Lab 1330 GM. -Espectrofotómetro de placas Epoch Biotek. -Homogenizador ultrasonido Qsonica Q55. -HPLC Agilent serie 1100. -Liofilizador Operon FDB-5502. -Purificador de agua por UV Merck Simplicity-UV®. -Refrigerador Electrolux ERDG195YSKW. -Ultraturrax T18 Basic. -Tubo concentrador Vivaspin 20 100kDa GE Healthcare.	-Aceite mineral Pesado Sigma-Aldrich 330760. -Alga Luche, nombre científico <i>P. columbina</i> . -Curcumina para síntesis Sigma-Aldrich 820354. -Estándar Micosporina Porphyra-334. -Monooleato de sorbitán o Span 80 Sigma Aldrich S6760. -Monooleato polioxietilen(20)sorbitano o Tween 80 Sigma-Aldrich P1754. -Polioxietilen (4) lauril éter o Brij L4.	-Gene5® -Modde 7 Sartorius®. -Office 365. -GraphPad Prism 8 Trial version.

3.1.3 METODOLOGÍA

3.1.3.1 Extracción de porphyra-334 (P-334) desde el alga *P. columbina*.

La obtención del extracto de *P. columbina* se realizó según trabajos previos llevados a cabo en el laboratorio de Nanotecnología y Optoelectrónica. Estos estudios incluyeron la cuantificación y optimización en la extracción de MAAs siguiendo un diseño de Box Behnken (BBD), y cuya cuantificación se realizó mediante el estándar micosporina-serinol ($\lambda_{\text{máx}}$ 310 nm) (Para más detalles revisar Anexo 8.1). A continuación, se presenta el protocolo de extracción de P-334 obtenido y modificado de Silva (2019).

Protocolo de extracción micosporina P-334

- El alga húmeda es secada en estufa a 28°C hasta alcanzar peso constante. Luego es cortada en trozos pequeños y tamizados para eliminar impurezas, facilitar su masado y potenciar el área de contacto con el solvente de extracción. Esta puede ser almacenada en frasco Schott y refrigerada para evitar la aparición de microorganismos.
- La extracción de MAAs se realiza con agua desionizada como solvente (pH 5-5.5). Para cada extracción se masa 0.5 gramos de alga seca y se lleva a 50 mL de agua desionizada.
- Esta extracción fue utilizada para análisis espectrofotométrico.
- Alternativamente se realiza otra extracción para la cual se masa 2 gramos de alga seca y se lleva a 50 mL de solvente. Esta extracción es utilizada en el proceso de liofilización y posterior formulación de nanoemulsión W/O y W/O/W.
- La extracción acuosa es filtrada mediante gasa. Una vez filtrada se obtendrá aproximadamente 35 mL de extracción.
- El extracto acuoso es centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. Los sólidos en el fondo del tubo son descartados.
- El extracto acuoso centrifugado es llevado a congelación -20°C en refrigerador.

3.1.3.2 Liofilización extracto acuoso de *P. columbina*

La liofilización, también conocida como secado en frío o criodesecación, es un proceso que permite preservar las propiedades originales de productos farmacéuticos o de origen biológico. Los compuestos activos termosensibles pueden ser concentrados mediante este procedimiento. El cual consiste en congelar el material, reducir la presión circundante, y añadir suficiente calor para que el agua dentro del material sea sublimada directamente desde la fase sólida hacia fase gas. Presenta la desventaja de ser un proceso lento, al requerir tiempos mayores a 20 horas (Verri *et al.* 2012).

Protocolo Liofilización extracto de *P. columbina*

- Preparar el equipo de liofilización y asegurarse que la manguera que conecta la bomba de vacío y el liofilizador esté ajustada. Colocar grasa de vacío en los componentes del liofilizador y aceite de vacío a la respectiva bomba.
- Encender el liofilizador, el cual comenzará a disminuir la temperatura del serpentín.
- Añadir el extracto congelado en el punto **3.1.3.1** dentro del liofilizador. Una vez alcanzada la temperatura de 55°C la bomba de vacío comenzará a funcionar. La presión corresponde a 500-200 mTorr.
- El proceso terminará transcurrido 72 horas. Retirar muestra y conservar entre 4-8°C.

3.1.3.3. Cuantificación del compuesto P-334 mediante HPLC

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, *High performance liquid chromatography*) es una técnica instrumental utilizada para separar los componentes de una mezcla de estado líquido. Se reconoce una fase estacionaria (Columna empacada con partículas de sílica modificadas con hidrocarburos saturados) y una fase móvil. Los componentes de la solución migran de acuerdo con las interacciones no-covalentes de los compuestos con

la columna, y determinan la separación de los compuestos en la muestra (Carrasco. 2013). El estándar de P-334 fue amablemente facilitado por Hakuto Kageyama (Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad de Meijo, Japón) en colaboración con el laboratorio de Nanotecnología y Optoelectrónica. La cuantificación de P-334 en los extractos de *P. columbina* se realiza utilizando el estándar de P-334, el cual fue diluido en serie desde la concentración de 100 µg/mL. Los análisis se realizan en el equipo HPLC Agilent Serie 1100 con columna C-18 Luna Phenomenex. La fase móvil utilizada es acetonitrilo 4%, ácido fórmico % y H₂O desionizada 95.9%, la cual fue sonicada y filtrada al vacío.

Protocolo cuantificación P-334

- Encender equipo y realizar purga con la fase móvil a un flujo de 1 mL/min durante 20 minutos.
- Cerrar llave de purga y ajustar parámetros de flujo de fase móvil a 1 mL/min, y detector UV en 334 nm.
- La fase móvil comenzará a circular por la columna C-18 Luna Phenomenex. Antes de inyectar la muestra, la línea base se debe estabilizar durante 10 a 20 minutos.
- Inyectar en el equipo 20 µL de extracción acuosa previamente filtrada con filtro de jeringa (MCE) de 0.2 µm.

La curva de calibrado se presenta en el Anexo 8.2.

3.1.3.4. Disolución de curcumina en aceite mineral

El proceso para disolver curcumina en aceite mineral o parafina líquida se realizó mediante una metodología modificada a partir de Joung *et al.* (2015) y Setthacheewakul *et al.* (2010).

Protocolo disolución de curcumina en aceite mineral

- Masar 100 mg de curcumina y llevar a 50 g de aceite mineral (*Stock* 2 mg/mL). Alternativamente masar 200 mg de curcumina y llevar a 40 g de aceite mineral (*Stock* 5 mg/mL).
- Llevar a agitación magnética durante 10 minutos a 60°C. Esta dispersión de curcumina puede ser diluida hasta la concentración deseada.
- Adicionalmente, a dichas diluciones se les añade los surfactantes Span80/Tween80, respetando proporciones necesarias para realizar nanoemulsión W/O.
- Esta mezcla se agita durante 10 minutos a 60°C. Luego sonicar durante 20 minutos en baño de ultrasonido. Posteriormente llevar a *shaker* orbital 120 rpm durante 24 o 48 horas, dependiendo de la concentración de curcumina.
- Realizar inspección visual y espectrofotometría.
- Las concentraciones de curcumina se expresan en mg curcumina/g de aceite mineral, esta forma facilita el manejo del aceite mineral.

3.1.3.5. Formulación nanoemulsión *water-in-oil* (W/O)

La nanoemulsión doble se llevó a cabo según procedimiento descrito por Gómez (2014), Mehmood *et al.* (2018) y modificaciones. El porcentaje de encapsulación se calcula según lo descrito por Sari *et al.* (2014).

Protocolo formulación de nanoemulsión W/O y determinación de capacidad de encapsulación del extracto de *P. columbina*

- La mezcla oleosa que contiene los surfactantes Span80/Tween80 y curcumina son calentados entre 60-70°C y es llevado a agitación magnética 500 rpm.
- La fase acuosa o extracción de *P. columbina* reconstituida es añadida a la fase oleosa y agitada a alta velocidad mediante Ultra-Turrax T18 Basic, 7000 rpm durante 7 minutos.

- Enfriar a temperatura ambiente y llevar a homogenización por ultrasonido de 20 KHz durante el tiempo descrito en la sección 4.1.3.7.
- Las nanoemulsiones generadas son analizadas a través de dispersión dinámica de la luz como se describe en la sección 4.1.3.6.
- El porcentaje de encapsulación se determina mediante el uso de tubos concentradores Vivaspin 20 (100 kDa). Se añade 10 gramos de nanoemulsión al tubo concentrador, el cual es centrifugado a 3500 rpm durante 30 minutos a 5°C. El permeado analizados para determinar la presencia de curcumina o P-334.

3.1.3.6. Medición de tamaño de glóbulo mediante dispersión dinámica de la luz (DLS)

La dispersión dinámica de la luz (DLS) es una técnica analítica que permite determinar la distribución del tamaño de partículas presentes en la suspensión. Se basa en la medición del movimiento Browniano de las partículas y su posición relativa en el medio a través del tiempo. El equipo para realizar DLS mide el movimiento de las partículas para estimar el tamaño de estas. Se sabe que las pequeñas partículas en solución son capaces de vibrar o moverse rápidamente, mientras que las partículas más grandes lo hacen de manera lenta (Zetasizer. 2013).

Protocolo medición por DLS

- El tamaño de glóbulo de nanoemulsión se mide mediante el equipo Zetasizer NanoZS90 Malvern y ZetaPlus Brookhaven.
- Cada muestra es depositada en una cubeta transparente de 1mL, la cual es depositada en el equipo.
- Los parámetros del dispersante deben ser modificados según las propiedades del aceite mineral, las cuales son: Índice de refracción 1.467, viscosidad 57 cP y constante dieléctrica 2.1.
- El equipo entrega el informe de tamaño de glóbulo, el cual puede ser analizado según intensidad, volumen o número de partículas.

3.1.3.7. Diseño experimental para formación de nanoemulsión W/O

Los factores más importantes en la formulación de emulsiones y nanoemulsiones son los porcentajes de la fase continua, fase dispersa y estabilizantes. La formación de nanoemulsiones puede ser optimizada mediante diseño de experimentos (DoE) (Sood *et al.* 2014). El diseño central compuesto (CCD) es un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales a los cuales se les ha añadido puntos estrella o puntos que permiten detectar la curvatura del espacio experimental. Los puntos estrella o α como denomina toma valores $|\alpha| > 1$, esto significa que la distancia desde el punto central debe ser mayor a uno en los puntos experimentales codificados (NIST/SEMATECH. 2012). En base a estudios previos se decidió realizar un diseño CCD para optimizar la formulación nanoemulsiones W/O.

Protocolo diseño experimental CCD

- Los factores utilizados para el diseño central compuesto son HLB (7-8), % Surfactante (7-15%), % fase dispersa (3-8%) y tiempo de homogenización ultrasónica (3-10 minutos).
- Los factores anteriormente descritos fueron ingresados al software Modde 7. Se genera un diseño experimental con tres bloques ortogonales y rotatable (Tabla 4).
- Las variables respuesta son el tamaño de glóbulo y polidispersidad (PDI) que son medida a través de DLS.

Tabla 4. Puntos experimentales obtenidos para la formulación de la nanoemulsión W/O mediante el diseño central compuesto.

Exp. No	%Surf.	HLB	%Extracto	Tiempo	Bloque
1	15	7	3	3	1
2	7	8	3	3	1
3	7	7	8	3	1
4	15	8	8	3	1
5	7	7	3	10	1
6	15	8	3	10	1
7	15	7	8	10	1
8	7	8	8	10	1
9	11	7.5	5.5	6.5	1
10	11	7.5	5.5	6.5	1
11	11	7.5	5.5	6.5	1
12	7	7	3	3	2
13	15	8	3	3	2
14	15	7	8	3	2
15	7	8	8	3	2
16	15	7	3	10	2
17	7	8	3	10	2
18	7	7	8	10	2
19	15	8	8	10	2
20	11	7.5	5.5	6.5	2
21	11	7.5	5.5	6.5	2
22	11	7.5	5.5	6.5	2
23	3	7.5	5.5	6.5	3
24	19	7.5	5.5	6.5	3
25	11	6.5	5.5	6.5	3
26	11	8.5	5.5	6.5	3
27	11	7.5	0.5	6.5	3
28	11	7.5	10.5	6.5	3
29	11	7.5	5.5	0	3
30	11	7.5	5.5	13.5	3
31	11	7.5	5.5	6.5	3
32	11	7.5	5.5	6.5	3
33	11	7.5	5.5	6.5	3

3.1.3.8. Formación de la nanoemulsión doble *water-in-oil-in-water (W/O/W)*

La formación de la nanoemulsión doble se llevó a cabo a mediante el método de dos etapas descrito por Wang *et al.* (2017) y Tang & Sivakumar (2012). (Figura 15). Complementariamente se realizó un diseño experimental factorial fraccionado. Los diseños factoriales permiten estudiar un área experimental cubriendo todas las combinaciones posibles de los factores en sus distintos niveles. Sin embargo, a medida que aumentan los k factores los puntos experimentales aumentan en la razón 2^k haciendo poco eficiente el uso de los recursos disponibles. Como alternativa, es posible tomar una fracción del área experimental expresada como 2^{k-p} donde p es la fracción que reduce los puntos experimentales. Esto puede ser estudiado mediante la llamada estructura de alias (Jiju. 2014).

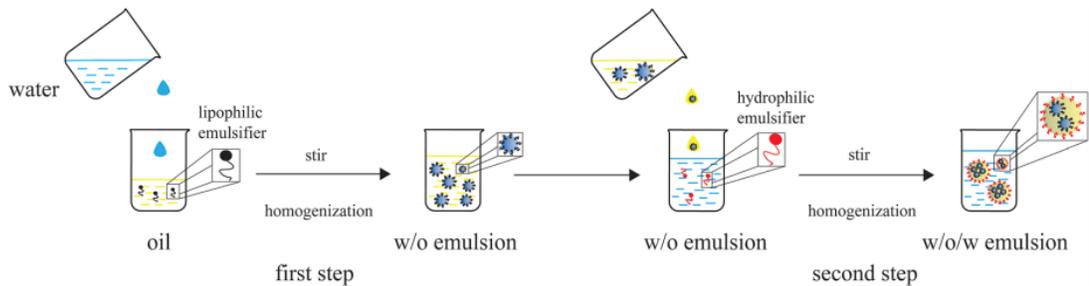


Figura 15. Método de dos pasos para la formación de emulsiones dobles. Wang *et al.* (2017).

La homogenización por ultrasonido que se utilizó para la formación de la nanoemulsión doble es un método de alta energía que presenta ciertas ventajas como (i) es de rápida implementación y fácil manejo, (ii) bajo consumo energético, (iii) permite obtener poblaciones de partículas uniformes, (iv) proceso de escalamiento simple. Sin embargo, la principal desventaja es la alta temperatura que se alcanza tras el rompimiento de los glóbulos (cavitación). Este método requiere controlar diversos factores como el tiempo de homogenización, amplitud y la frecuencia de ultrasonido (fija dependiendo del modelo o equipo) (Gheisari *et al.* 2018).

Protocolo formación nanoemulsión doble

- Los surfactantes hidrofílicos Tween 80 y Brij L4 se añaden a la fase acuosa o continua. Esta mezcla se lleva a agitación magnética 1000 rpm entre 60°-70°C, hasta obtener homogeneidad.
- La fase dispersa o nanoemulsión W/O es añadida sobre la fase continua. Esta es agitada durante 5 minutos a 7000 rpm (Agitación rotor-estator Ultraturrax T18 Basic).
- Enfriar a temperatura ambiente y realizar diseño experimental de la sección 3.1.3.9.
- Las nanoemulsiones generadas son analizadas a través de DLS.

3.1.3.9. Diseño experimental factorial fraccionado para la formación de nanoemulsión W/O/W

- Los factores utilizados en el diseño de factorial fraccionado son % de surfactante Tween80/Brij L4 (8-12%), amplitud de homogenización de ultrasonido (40-90%), tiempo de homogenización ultrasonido (30-120 segundos) y HLB (11.5-12.5).
- El porcentaje de la fase oleosa o nanoemulsión W/O se mantiene constante en 10% para mantener concentración de curcumina y MAAs.
- Mediante Modde 7[®] se construye el diseño de *screening* factorial fraccionado 2_{i-v}^{4-1} con 8 puntos experimentales 3 puntos centrales (Tabla 5)
- Las variables respuesta son el tamaño de glóbulo y PDI, medidas a través de DLS.

Tabla 5. Puntos del diseño factorial fraccionado para formulación de nanoemulsión doble.

No.	% Surf.	Amplitud %	Tiempo (s)	HLB
1	8	40	30	11.5
2	12	40	30	12.5
3	8	90	30	12.5
4	12	90	30	11.5
5	8	40	120	12.5
6	12	40	120	11.5
7	8	90	120	11.5
8	12	90	120	12.5
9	10	65	75	12
10	10	65	75	12
11	10	65	75	12

3.1.3.10. Determinación de la capacidad de encapsulación de P-334 y curcumina mediante nanoemulsión W/O/W

La capacidad de encapsulación se determina según lo descrito por Sari *et al.* (2014) y modificaciones.

Protocolo capacidad de encapsulación de nanoemulsión W/O/W

- El porcentaje de encapsulación se determina mediante el uso de tubos concentradores Vivaspin 20 (100 kDa).
- Se añade 6 gramos de nanoemulsión W/O/W al tubo concentrador, el cual es centrifugado a 3500 rpm durante 30 minutos a 5°C.
- El permeado es analizado mediante cromatografía para determinar la presencia de curcumina o P-334.
- Realizar cálculos respectivos de balance de masa para determinar la capacidad de encapsulación de la nanoemulsión W/O/W.

3.2 Caracterización fisicoquímica y estabilidad de nanoemulsión doble

3.2.1 Equipos, reactivos y software

Tabla. 6. Equipos, reactivos y software utilizados para la caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión W/O y W/O/W

Equipos	Reactivos	Software
-Balanza analítica Shimadzu AUX 120. -Centrifuga (HERMLE 7400k). -DSC 22-200 Mettler Toledo. -Espectrofotómetro de placas Epoch Biotek -Estufa de secado Shel Lab 1330 GM. -Jasco FT/IR-4600 -Refrigerador Electrolux ERDG195YSKW. -Spectrum Two FT-IR	-Nanoemulsión W/O. -Nanoemulsión W/O/W.	-Gene5® -Office 365. -Pyris 11. -GraphPad Prism 8 Trial Version.

3.2.2. METODOLOGÍA

3.2.2.1. Estabilidad Nanoemulsión a Corto Plazo

La medición de la estabilidad de la nanoemulsión se realiza tras la formación de la nanoemulsión W/O y W/O/W, según la metodología descrita por Yildirim *et al.* (2017) y modificaciones.

Protocolo medición estabilidad

- Se masa 7-8 gramos de la nanoemulsión preparada, la cual es llevada a tubo de fondo cónico de 15 mL.
- Centrifugar tubo a 3500 rpm durante 15 minutos.
- Se observa si existe separación de fases, sedimentación o cremado.

3.2.2.2. Estabilidad nanoemulsión y compuestos activos a largo plazo

La estabilidad de la nanoemulsión W/O y W/O/W se realiza según lo descrito por Ngan *et al.* (2014) y modificaciones.

Protocolo estudio estabilidad nanoemulsión

- Las nanoemulsiones W/O y W/O/W obtenidas en las secciones 3.1.2.5 y 3.1.2.8, son expuestas a temperaturas de 4°C, temperatura ambiente y 45°C.
- Al completar cuatro semanas de exposición, tomar 100 µL de nanoemulsión y analizar mediante espectrofotometría.
- Realizar inspección visual de la nanoemulsión en busca de separación de fases, sedimentación o cremado.
- Realizar mediciones de DLS para determinar tamaño de glóbulo y PDI.
- Comparar las mediciones anteriores mediante ANOVA y test de comparaciones múltiples de Dunnett con respecto a la nanoemulsión inicial.

3.2.2.3. Caracterización térmica mediante calorimetría diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que es usada para analizar características físicas de una nanoemulsión en un intervalo de temperatura. La técnica cuantifica la cantidad de calor irradiado o absorbido por la muestra (Bourbon *et al.* 2018). El ensayo se lleva a cabo según la metodología descrita por Ahmad *et al.* (2019).

Protocolo DSC para nanoemulsión

- La muestra de nanoemulsión W/O, W/O/W y sus respectivos controles son masados (3-6 mg), y depositados en el contenedor de aluminio (máximo 20 µL) el cual es sellado mediante la prensa de sellado.
- Montar la muestra en el receptor del equipo DSC. Dejar otra celda de referencia, la cual queda vacía. Equilibrar la muestra a 20°C.

- Disminuir y equilibrar la temperatura a -20°C , luego incrementar hasta 100°C . Fijar tasa de incremento de calor $10\text{K}/\text{min}$.
- Realizar análisis de termogramas obtenidos.

3.2.2.4. Caracterización de nanoemulsión mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier es una técnica que se basa en la espectroscopía infrarroja que abarca la longitud de onda $0.7\text{-}1000\ \mu\text{m}$, región en la cual muchas moléculas son capaces de absorber energía de forma vibracional y rotacional. El interferómetro de Michelson utilizado en FT-IR permite dividir y recombinar el haz de luz infrarroja, gracias a esto se puede variar la longitud de onda rápidamente y obtener espectro de manera eficiente. La señal obtenida es modificada matemáticamente mediante la transformada de Fourier, la cual coincide con el espectro infrarrojo (Poole & Owens. 2007).

Protocolo medición FT-IR

Este ensayo se realizó en colaboración del Centro de Investigación de polímeros Avanzados (CIPA) y el laboratorio de Microplásticos de la Universidad San Sebastián sede Concepción. Los equipos utilizados fueron Spectrum Two FT-IR con sistema ATR PerkinElmer y Jasco FT/IR-4600 con sistema ATR.

- Encender equipo y ajustar los parámetros de lectura. Fijar transmitancia entre $4000\text{-}500\ \text{cm}^{-1}$.
- Obtener el espectro del *background* siguiendo las instrucciones del manual de usuario.
- Realizar lectura de las nanoemulsiones W/O, W/O/W y sus respectivos controles.
- Generar gráficos de comparación mediante *software Origin 9 trial versión*.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Desarrollo nanoemulsión doble

4.1.1 Procesamiento del alga *P. columbina* y extracción MAAs

El alga Luche o *P. columbina* fue recibida húmeda. Posterior a su procesamiento se procedió a realizar la extracción acuosa. La extracción acuosa observada en la figura 16. se realizó añadiendo 2 gramos de alga seca por cada 50 mL de agua desionizada.



Figura 16. (a) Alga Luche húmeda. (b) Alga Luche secada en horno. (c) Extracción de alga Luche.

Un análisis espectrofotométrico corrobora el máximo de absorción asociado a las principales MAAs presentes en el Luche, P-334 y shinorina (Figura 17).

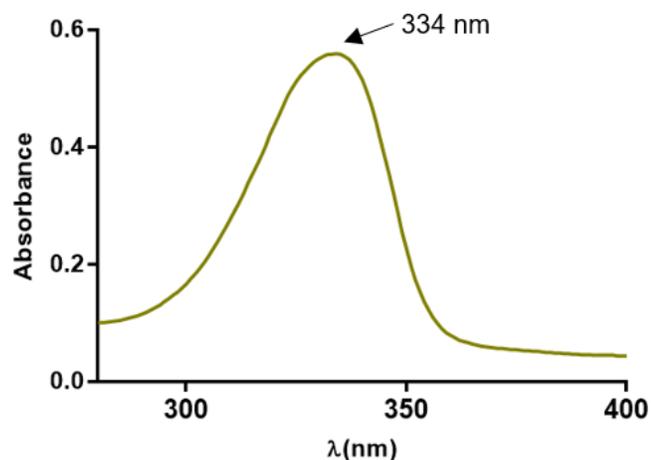


Figura 17. Espectrograma extracción de Luche. Diluida 1:10.

La extracción acuosa fue liofilizada, como una forma de concentrar la muestra utilizada. El material liofilizado fue resuspendido en 10 mL (Figura 18). de agua desionizada, esto fue utilizado para realizar nanoemulsiones y cuantificar la cantidad de P-334.

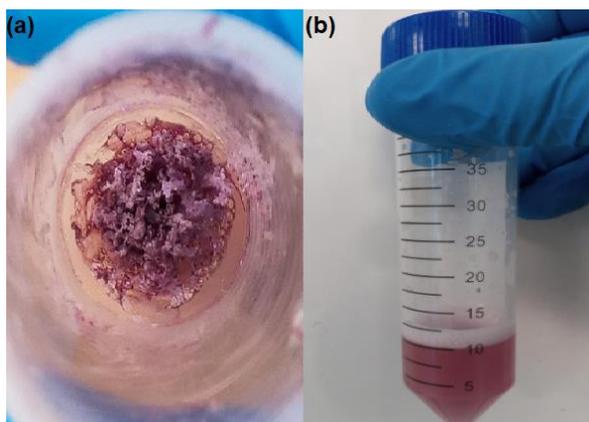


Figura 18. (a) Extracto Luche liofilizado. (b) Extracto Luche resuspendido en 10 mL.

4.1.2. Cuantificación P-334 en alga *P. columbina*.

La cuantificación de P-334 se realizó con el estándar correspondiente. El tiempo de retención observado para el estándar con las condiciones cromatográficas especificadas en la sección 4.1.3.3, fue de 4.002 ± 0.032 min.

Se realizaron tres extracciones para determinar la concentración de P-334 por gramo de alga seca. Las cuales fueron filtradas, liofilizadas y resuspendidas en

10 mL de agua desionizada. Este proceso se realizó para el alga obtenida en 2020.

Tabla 7. Datos tomados para la cuantificación de P-334 en extracción liofilizada. Alga del año 2020.

Extracción	Área (mAU)	Concentración (µg/mL)	Dilución	Concentración (µg/mL)	µg P-334 en 10 mL	mg P-334/g alga seca
1	2941.12231	20.646	1/100	20646.625	10323.127	10.323
2	3922.4917	27.760	1/100	27759.689	13879.844	13.897
3	2834.15283	19.871	1/100	1987.089	9935.444	9.935

Tomando el valor promedio de las cuantificaciones realizadas en la tabla 7, la concentración de P-334 en la muestra de alga procesada (año 2020) es de 11.379 ± 2.174 mg P-334/g alga seca. El cromatograma característico para la extracción acuosa de *P. columbina* se puede observar en la Figura 19, donde se observan 4 peaks asociados a diferentes micosporinas presentes en el extracto.

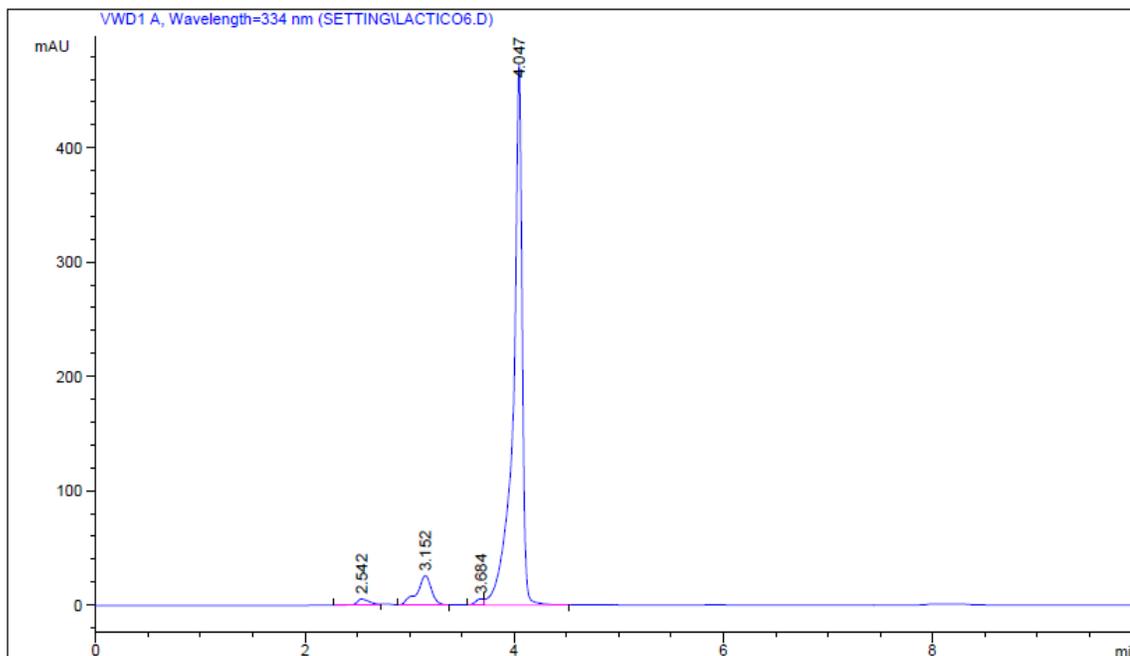


Figura 19. Cromatograma de extracto de *P. columbina* diluido 1:100.

Los resultados de la tabla 8 muestran la cuantificación de P-334 en el alga *P. columbina* obtenida en el mes de abril de 2021. Las extracciones para esta muestra no fueron procesadas mediante liofilización. Se tomó una alícuota desde

los 35 mL obtenidos después de filtrar y centrifugar la muestra. En promedio se obtuvo 4.527 ± 0.419 mg P-334/g alga seca (tabla 8)

Tabla 8. Datos tomados para la cuantificación de P-334 en extracción liofilizada. Alga del año 2021.

Extracción	Área (mAU)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Dilución	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	μg P-334 en 35 mL	mg P-334/g alga seca
1	4033.77051	28.566	1/10	285.66	4999.100	4.999
2	3425.31519	24.156	1/10	241.56	4227.285	4.227
3	3839.30762	27.157	1/10	271.95	4752.427	4.129
4	3349.01343	23.595	1/10	235.95	4129.229	4.527

4.1.3. Solubilidad curcumina en aceite mineral

De acuerdo con literatura, la cantidad de curcumina que puede ser disuelta en aceite mineral es aproximadamente de 0.13 mg/mL, incluso para otros aceites este valor no supera los 0.25 mg/mL. En este estudio, se generó una solución de curcumina en aceite mineral de 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 y 0.01 mg/g, la cual fue sometida a las condiciones de procesamiento y agitación orbital durante 24 horas (Figura 20). El perfil espectrofotométrico de la curcumina puede ser observado en la Figura 21.



Figura 20. Curcumina en aceite mineral. Concentración ascendente de izquierda a derecha.

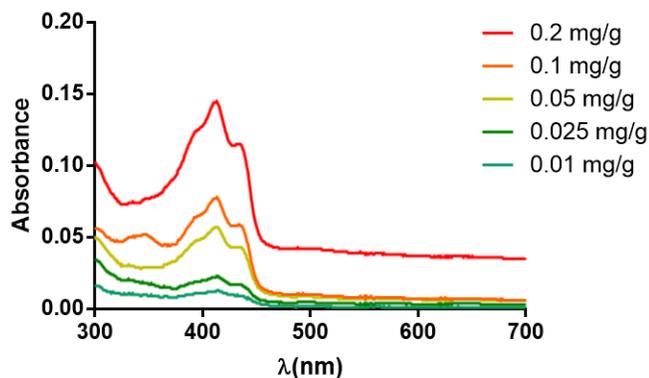


Figura 21. Espectrograma de curcumina en aceite mineral para diferentes concentraciones.

A partir del espectrograma se aprecian dos picos característicos ubicados en 408 y 430 nm. Por otra parte, cada solución fue centrifugada observándose precipitado de curcumina (no mostrado).

El estudio tomo en consideración los surfactantes no-iónicos Span80/Tween80, para la solubilización de curcumina en aceite mineral. Estos agentes tensioactivos son los utilizados para la posterior formulación de la nanoemulsión W/O. Bajo las mismas condiciones de procesamiento, las soluciones de curcumina 0.2 y 0.1 mg/g, se añadió 3% y 7% de los surfactantes antes mencionados (considerando 10 gramos de solución). Mediante esta técnica, se facilita la disolución de la curcumina y la absorbancia de esta aumenta incluso por sobre las 2 unidades (Figura 22).

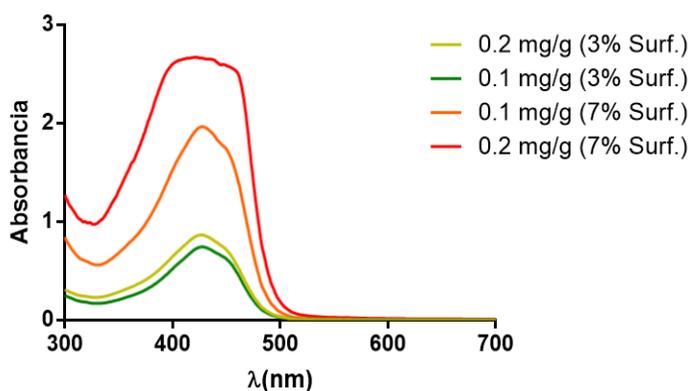


Figura 22. Espectrograma de curcumina en aceite mineral para concentraciones de 0.2 y 0.1 mg/g.

4.1.4 Formulación y optimización de nanoemulsión W/O

La formulación de la nanoemulsión W/O se generó mediante un modelo de optimización utilizando las variables % surfactante, HLB, %fase acuosa/extracto y tiempo de homogenización ultrasonido. Las variables respuesta fueron tamaño de glóbulo y polidispersidad. El extracto acuoso de *P. columbina* que se añadió provino de una extracción de 0.5 g en 50 mL sin liofilizar. Mientras que la concentración de curcumina fue de 0.2g/g de formulación final, cuya masa final fue 10 g.

Los resultados de la minimización del tamaño de glóbulo y polidispersidad pueden ser observados en el Anexo 8.2. La minimización en el tamaño de glóbulo entregó un $R^2=0.831$ y $Q^2=0.220$, mientras que la optimización para la polidispersidad entrega un $R^2=0.585$ y Q^2 no suficiente para ser reportado. Si bien el valor de R^2 para el tamaño de glóbulo indica un buen ajuste de los datos, Q^2 señala que el modelo presenta una baja capacidad de predicción.

Los indicadores anteriormente mencionados son bajos, el diseño CCD permitió identificar tres puntos que cumplían con el tamaño de glóbulo y polidispersidad adecuado. A partir de esto se decidió trabajar con una modificación del punto experimental número 26. Las condiciones modificadas fueron 11% de surfactante, 3% extracto acuoso, 86% aceite mineral y HLB 8.5. Esta no requirió el uso de homogenización por ultrasonido, solo fue agitada mediante homogenización de alta velocidad.

Se diseñó una nanoemulsión W/O blanca, la cual no contiene MAAs o curcumina. Cualitativamente se observa un aspecto translúcido, mientras que la medición por DLS indica que existen dos poblaciones de 28.96 nm y 236.5 nm (Figura 23).

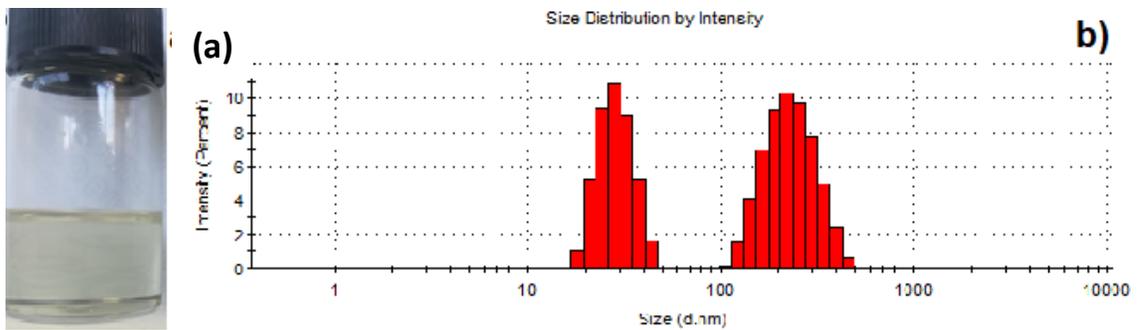


Figura 23. (a) Nanoemulsión W/O blanca obtenida bajo condiciones 11% surfactante, 3% extracto acuoso, 86% aceite mineral y homogenización de alta velocidad. (b) Histograma distribución tamaño de glóbulo nanoemulsión W/O.

La incorporación de los compuestos activos MAAs y curcumina no afectó el aspecto translúcido de la nanoemulsión y no se observó sedimentación o algún tipo de desestabilización asociada después centrifugación. Por otra parte, el análisis espectrofotométrico evidenció la incorporación de los compuestos activos. (Figura 24).

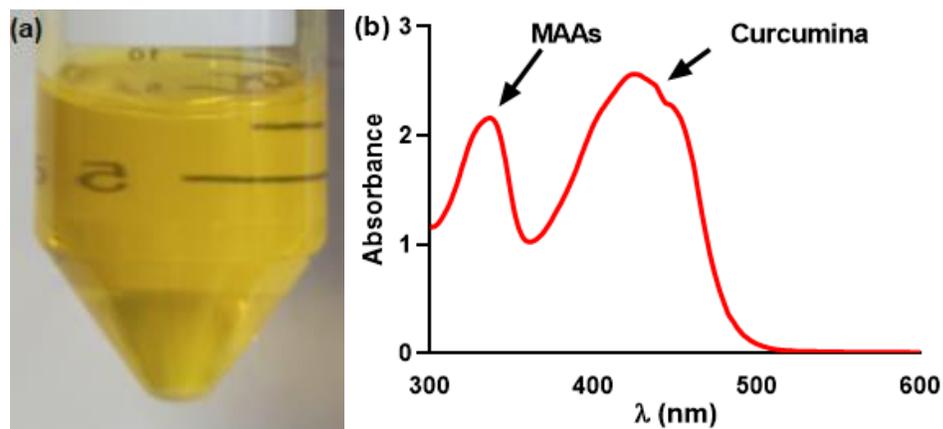


Figura 24. (a) Nanoemulsión W/O después de centrifugación. No se observa sedimentación. (b) Espectrograma para nanoemulsión W/O y compuestos activos (MAAs y curcumina).

4.1.4.1. Incremento en la concentración de curcumina y extracto de *P. columbina*.

Inicialmente la formulación de la nanoemulsión W/O se realizó tomando en consideración una concentración final de curcumina de 0.2 mg/g. Como una forma de incrementar este valor se utilizó una estrategia conjunta con el proceso de formulación de la nanoemulsión primaria. De la misma forma se consideró un incremento en la concentración del extracto acuoso, para esto el extracto

liofilizado fue reconstituido en 10 mL de agua desionizada y añadido en la formulación de la nanoemulsión W/O.

Un incremento en la concentración de curcumina a 0.5 mg/g, en presencia de surfactantes y agitado orbitalmente durante 24 horas permitió la disolución completa de esta en aceite mineral. Sin embargo, un incremento a 0.85 mg/g no permite la disolución de esta, observando precipitado de curcumina. Esta situación que puede ser revertida al aplicar agitación por alta velocidad para la formulación de la nanoemulsión W/O (Figura 25).

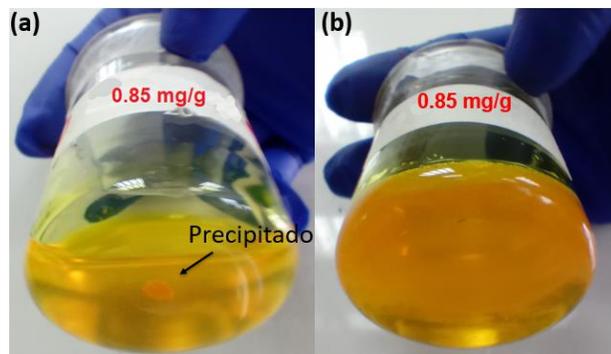


Figura 25. (a) Solubilización de curcumina en aceite mineral agitado 24 horas. (b) Nanoemulsión W/O con incremento de curcumina y extracción acuosa.

El análisis de DLS arrojó un tamaño de 56.34 ± 8.70 nm y polidispersidad 0.421 ± 0.048 para la nanoemulsión que contiene 0.5 mg de curcumina/g formulación y un extracto de *P. columbina* liofilizado y resuspendido en 10 mL de agua desionizada (Figura 26).

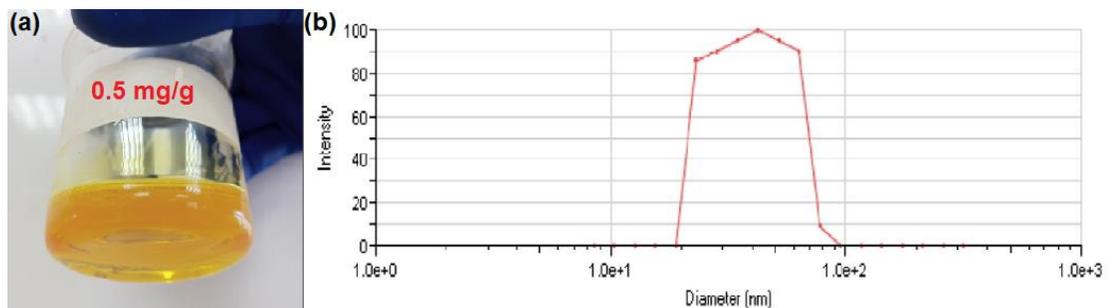


Figura 26. (a) Nanoemulsión con incremento en la concentración de curcumina y extracción acuosa. (b) Resultado de DLS para nanoemulsión con incremento en la concentración de curcumina y extracción acuosa. Tamaño aproximado de 56 nm.

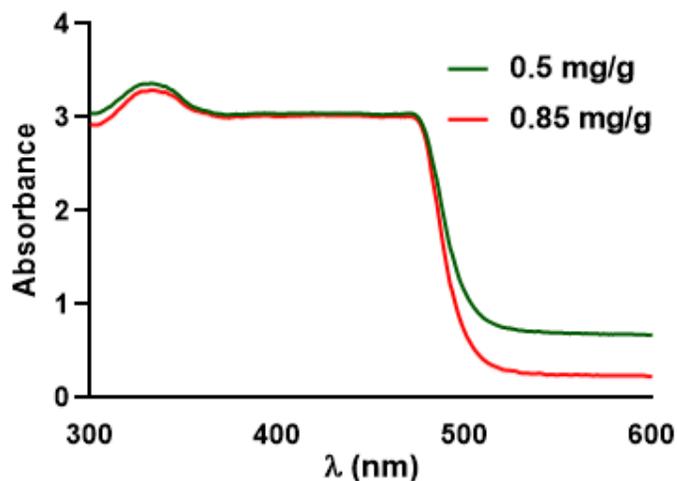


Figura 27. Espectrograma para nanoemulsión con un incremento en la concentración de curcumina.

La observación visual y por estabilidad se asemeja a la nanoemulsión que contiene curcumina en 0.5 mg/g. El espectrograma para estas nanoemulsiones muestra una saturación en la absorbancia (Figura 27)

Así mismo, un aumento en el tiempo de agitación orbital a 72 horas permitió una mayor disolución de curcumina (Figura 28).

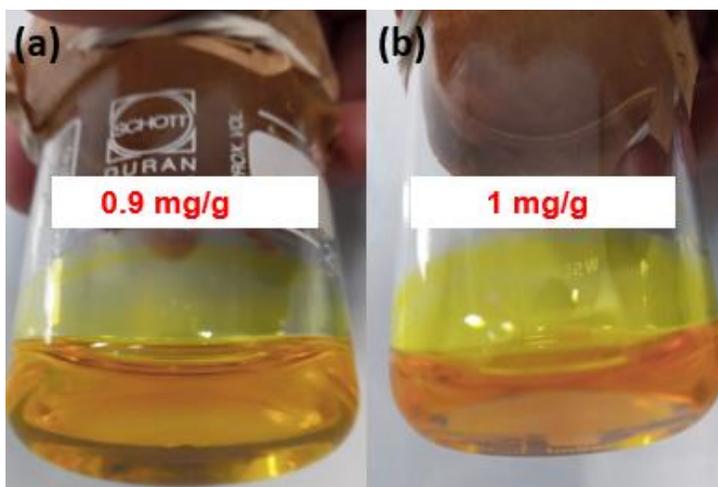


Figura 28. Disolución de curcumina en aceite mineral. (a) 0.9 mg curcumina/g formulación. (b) 1 mg curcumina/g formulación.

Las nanoemulsiones para dichas concentraciones resultan estables y translúcidas, las cuales se pueden observar en la figura 29.

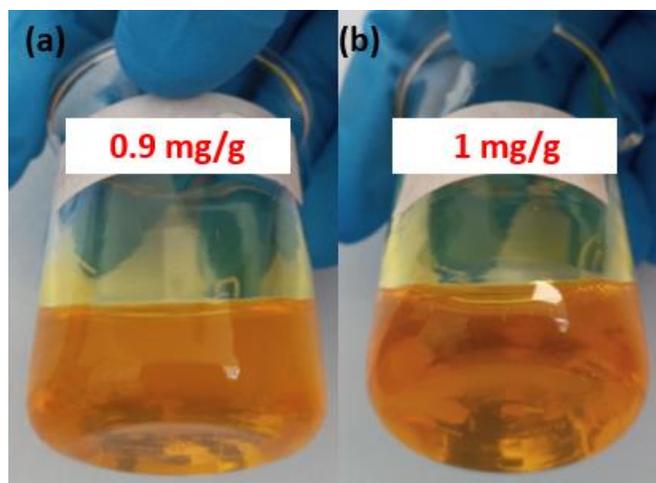


Figura 29. Nanoemulsión con incremento en curcumina (a) 0.9 mg curcumina/g formulación y (b) 1 mg curcumina/g formulación.

Como una manera de incrementar aún más la concentración de curcumina y MAAs en la nanoemulsión W/O, se decidió aumentar la concentración de curcumina a 3 mg curcumina/g formulación, y resuspender el extracto liofilizado de *P. columbina* en 2 mL de agua desionizada para luego ser añadido en la formulación tipo W/O. La figura 30 muestra una comparación entre una disolución de curcumina de 1 mg/g formulación y 3 mg/g formulación. Como se mostró anteriormente, la disolución de curcumina con concentración 1 mg/g formulación presenta aspecto translúcido, mientras que la disolución de curcumina de 3 mg/g formulación toma una apariencia opaca.

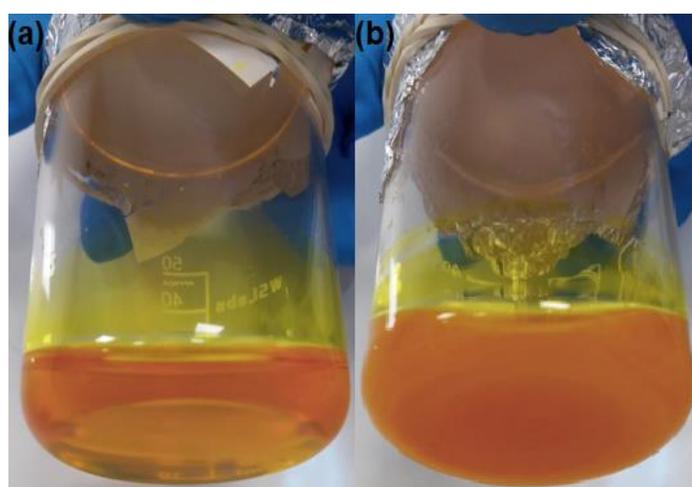


Figura 30. (a) Disolución de curcumina 1 mg/g formulación en aceite mineral y surfactantes Span80/Tween80. (b) Disolución de curcumina 3 mg/g formulación en aceite mineral y surfactantes Span80/Tween80.

Por otra parte, la formulación de una nanoemulsión W/O con aumento en la concentración de MAAs mediante la reconstitución en 2 mL de agua desionizada, modificó el aspecto observado con anterioridad al no ser translúcido, tanto para la concentración de curcumina de 1 mg/g formulación y 3 mg/g formulación. Sin embargo, al aplicar homogenización por ultrasonido durante 30 segundos (40% amplitud) permitió obtener una nanoemulsión W/O translúcida para la concentración de curcumina 1 mg/g formulación, mientras que para 3 mg/g formulación no se observa el mismo efecto (Figura 31).

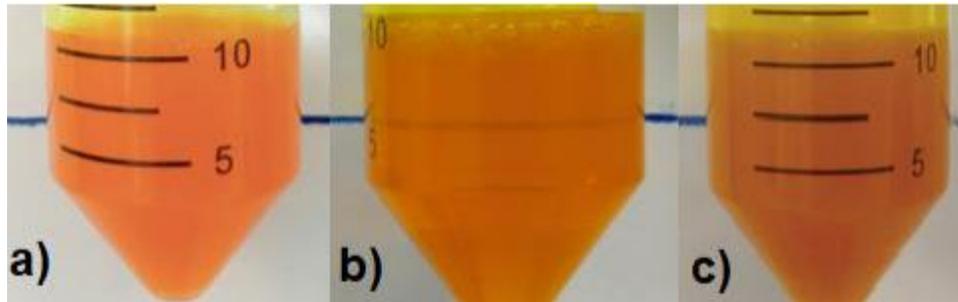


Figura 31. Nanoemulsión W/O 1 mg curcumina/g formulación a la que se le ha incorporado extracto de alga liofilizado y reconstituido en 2 mL de H₂O. (b) Nanoemulsión anterior sometida a 30 segundos de homogenización por ultrasonido. (c) Nanoemulsión W/O 3 mg curcumina/g formulación suplementada con extracto de alga liofilizado y reconstituido en 2 mL de H₂O, sometida a homogenización por ultrasonido durante 30 segundos.

4.1.5. Formulación nanoemulsión doble

Se realizó un diseño experimental factorial fraccionado 2_{IV}^{4-1} para estudiar la influencia de los factores % surfactante, amplitud, tiempo de homogenización ultrasónica y HLB. En el anexo 8.4 es posible observar el resultado de las variables respuesta tamaño de glóbulo y polidispersidad.

El diseño experimental se realizó considerando una concentración final de curcumina de 0.02 mg curcumina/g formulación, mientras que la fase acuosa provino de una extracción acuosa en donde 0.5 g de alga seca fueron puestos en 50 mL de agua desionizada.

En base a los resultados presentados en el anexo 8.4, fue posible ajustar un modelo para predecir y explicar dichos valores. Al realizar el ajuste del modelo, la ecuación lineal para el tamaño de glóbulo fue $y=217.3-92.8*x$, donde x es

tiempo homogenización ultrasónica, siendo este factor el único estadísticamente significativo (para la polidispersión no existe valor significativo). Esto se ve reflejado en los resultados presentados en las tablas presentes en el anexo 8.5 y anexo 8.6 que muestran el análisis de la varianza, las cuales indican un bajo nivel para modelar y predecir los valores observados, así como falta de ajuste. La tabla 9 presenta los valores del porcentaje de variación de la variable respuesta explicada por el modelo o R^2 , porcentaje de variación de la respuesta predicha por el modelo mediante validación cruzada o Q^2 , validez del modelo la cual indica si existe falta de ajuste y reproducibilidad que es el porcentaje de variación de la respuesta en el punto central comparado con la variación total de la respuesta; para tamaño de glóbulo y polidispersidad (PDI).

Tabla 9. Parámetros estadísticos para modelo de tamaño de glóbulo y PDI.

	R^2	R^2 adj.	Q^2	SDY	RDS	N	Model validity	Reproducibility
Tamaño glóbulo	0.564	0.273	0.032	135.73	115.69 1	11	0.133	0.956
PDI	0.271	-0.214	0	0.104	0.114	11	0.193	0.927
N=11								
DF=5	Cond.no.	0.0488						
Comp.=2	Y-miss=	0						

El software Modde 7[®] es capaz de desplegar diferentes gráficos de diagnóstico que permiten detectar y explicar anomalías en el modelo construido. El gráfico de “residuales vs variable” chequea si la varianza no explicada por el modelo es diferente para los todos niveles de un factor. Una curvatura pronunciada evidencia la contribución sistemática de un factor independiente, indicando la falta de un término cuadrático en el modelo. La figura 32 muestra el gráfico de residuales estandarizados vs tiempo de homogenización ultrasónica, se observa curvatura para el gráfico correspondiente a tamaño de glóbulo. En el caso de la polidispersidad no se observa curvatura (Figura 32 (a) y 32 (b), respectivamente).

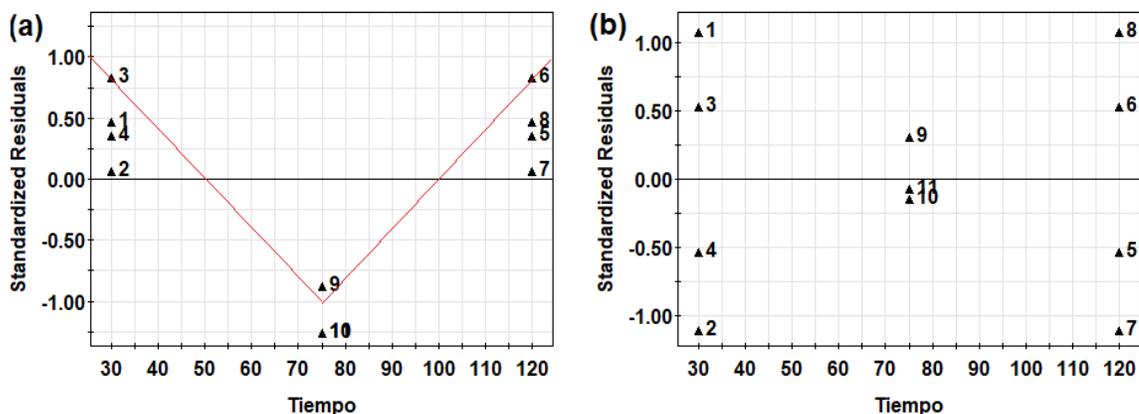


Figura 32. Gráfico de residuales estandarizado vs factor tiempo (homogenización ultrasonido)
(a) Tamaño de glóbulo. (b) PDI.

La adición de la interacción cuadrática para el tiempo de homogenización ultrasónica mejora los parámetros antes señalados para el modelo de tamaño de glóbulo. La ecuación que modela esta variable respuesta es $y=86.133-92.808*x+144.283*x^2$. Sin embargo, estos continuaron siendo bajos para la polidispersidad (Tabla 10). Un análisis más detallado de esto puede ser observado en los anexos 8.7 y 8.8.

Tabla 10. Parámetros estadísticos para modelo de tamaño de glóbulo y PDI (Interacción cuadrática)

	R ²	R ² adj.	Q ²	SDY	RDS	N	Model validity	Reproducibility
Tamaño glóbulo	0.949	0.899	0.691	135.73	43.215	11	0.593	0.966
PDI	0.272	-0.456	0	0.104	0.125	11		0.927
N=11								
DF=5	Cond.no.=	3.5563						
Comp.=2	Y-miss=	0						

En base a los datos obtenidos, se continuó trabajando con el punto central. Mediante el optimizador del programa Modde 7[®], las condiciones predichas para el punto central aproximan el valor de tamaño de glóbulo a 86.13 nm y la polidispersidad a 0.346. Nuevas réplicas del punto central indican un tamaño de glóbulo de 86.35 ± 12.80 nm y PDI 0.327 ± 0.061 ($n=2$, cuadruplicado) (Figura 33). El aspecto de las nanoemulsiones dobles cargadas con curcumina y extracción de luce puede ser visualizado en la Figura 34.

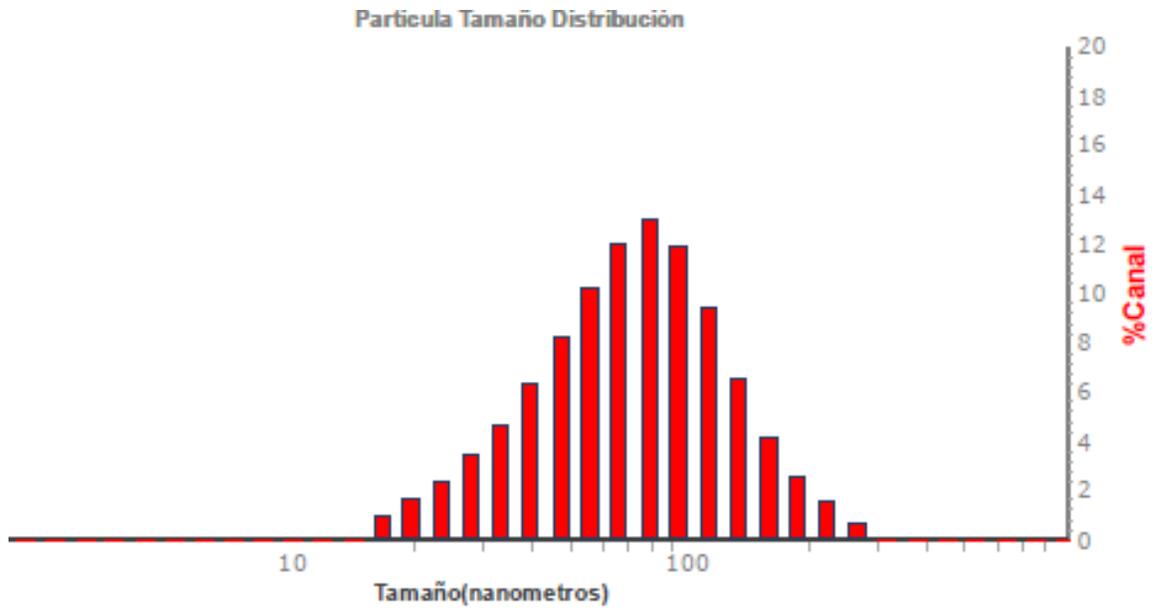


Figura 33. Histograma de nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina y extracción de alga luche.

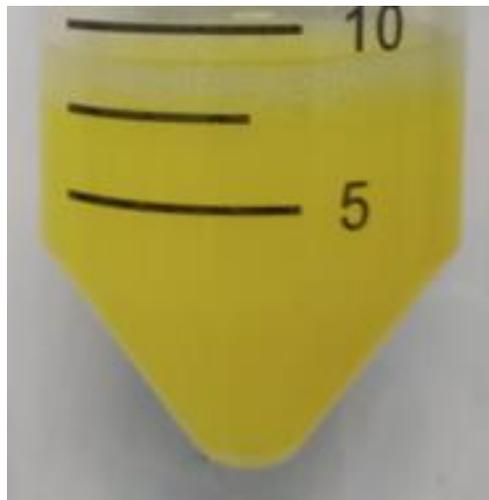


Figura 34. Apariencia de nanoemulsión doble cargada con curcumina y extracción de *P. columbina*.

Al utilizar como fase acuosa la extracción de luche liofilizada y resuspendida en 10 mL de agua desionizada, el tamaño del glóbulo de nanoemulsión W/O/W es de 70.50 ± 2.28 nm y PDI 0.27 ± 0.03 ($n=1$, cuadruplicado) (Figura 35).

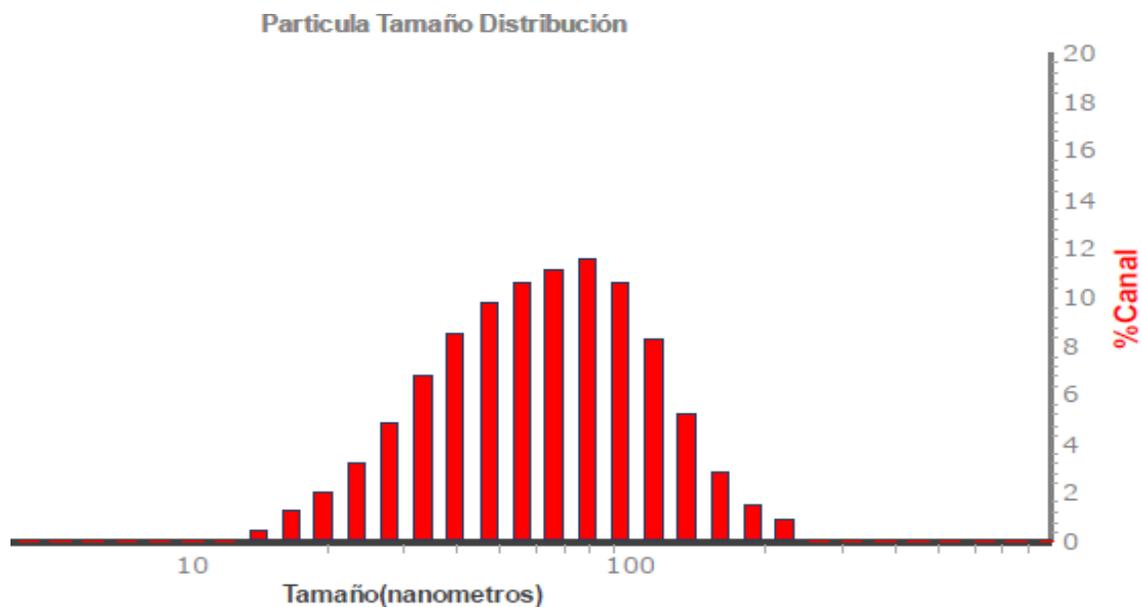


Figura 35. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina y extracción de luche liofilizada y reconstituida en 10 mL de agua desionizada.

Las formulaciones descritas anteriormente contenían una concentración de curcumina en la formulación W/O de 0.2 mg/g formulación que posteriormente al estar inmersa en la nanoemulsión disminuye a 0.02mg/g de formulación. Como una forma de aumentar la concentración de curcumina, esta fue incrementada a 1 y 3 mg/g de formulación en la fase inicial W/O. En consecuencia, una nanoemulsión doble contiene entre 0.1 y 0.3 mg curcumina/g formulación. Los valores de tamaño de glóbulo 75.40 ± 10.49 nm y 84.90 nm (Figura 36 y 37), mientras que la polidispersidad fue 0.314 ± 0.015 y 0.301 ± 0.062 , respectivamente.

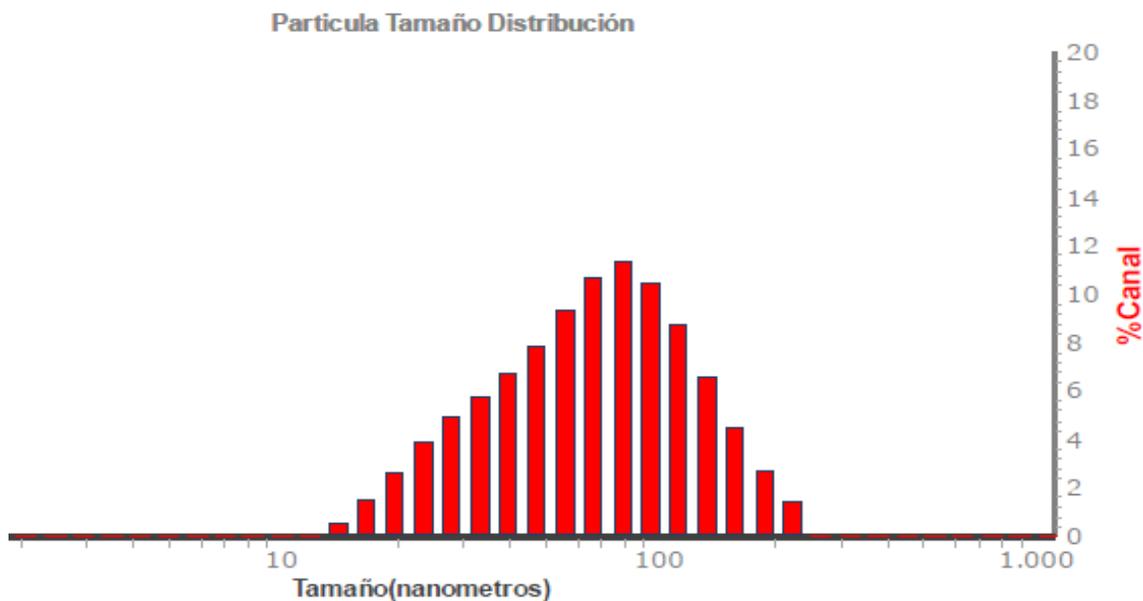


Figura 36. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina (0.1 mg/g formulación) y extracción de luche liofilizada.

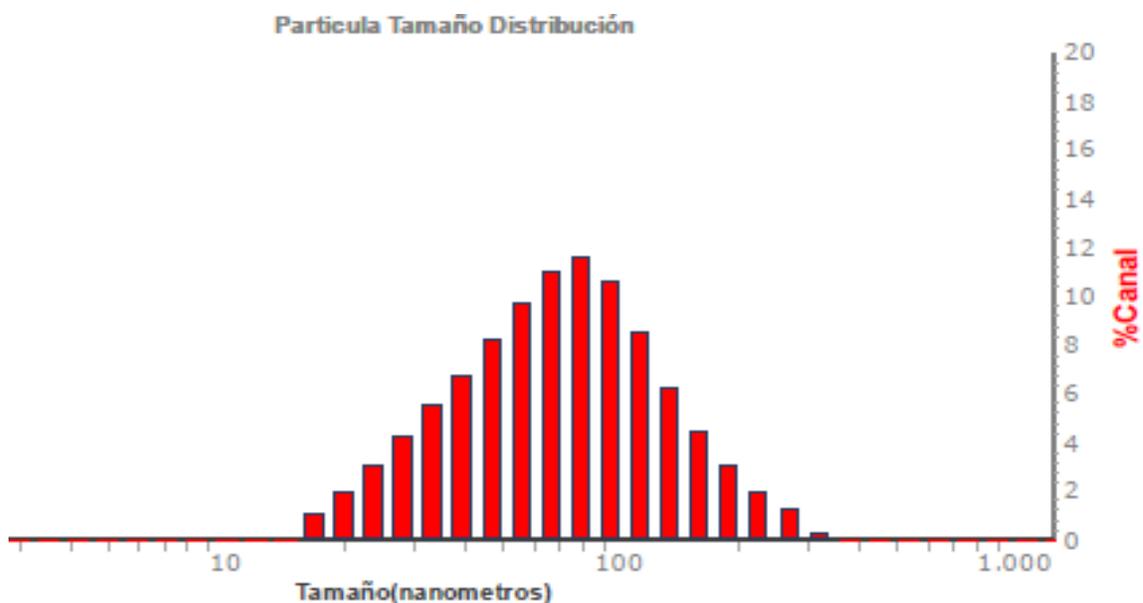


Figura37. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina (0.3 mg/g formulación) y extracción de luche liofilizada y reconstituida en 10 mL de agua desionizada.

En el mismo sentido, se buscó incrementar aún más la concentración de MAAs en la formulación doble. Para esto, la extracción de luche liofilizada se reconstituyó en 2 mL de agua desionizada y se mantuvieron las condiciones experimentales del punto central. La nanoemulsión W/O/W que contenía la concentración de 0.3 mg curcumina/g formulación presentó un tamaño de glóbulo y PDI de 126.40 ± 11.88 nm (Figura 38) y 0.361 ± 0.128 , respectivamente. Para la

nanoemulsión que contenía 0.1 mg curcumina/g formulación el tamaño de glóbulo y PDI fueron $82.33 \text{ nm} \pm 11.24$ (Figura 39) y 0.407 ± 0.051 , respectivamente

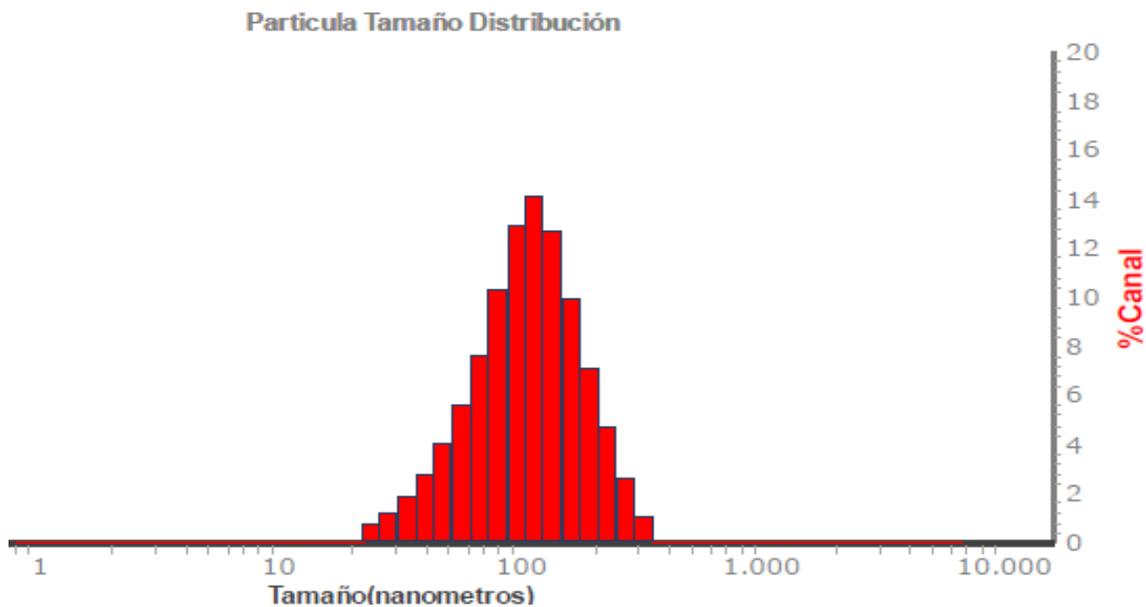


Figura 38. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina (0.3 mg/g formulación) y extracción de Luche liofilizada y reconstituida en 2 mL de agua desionizada.

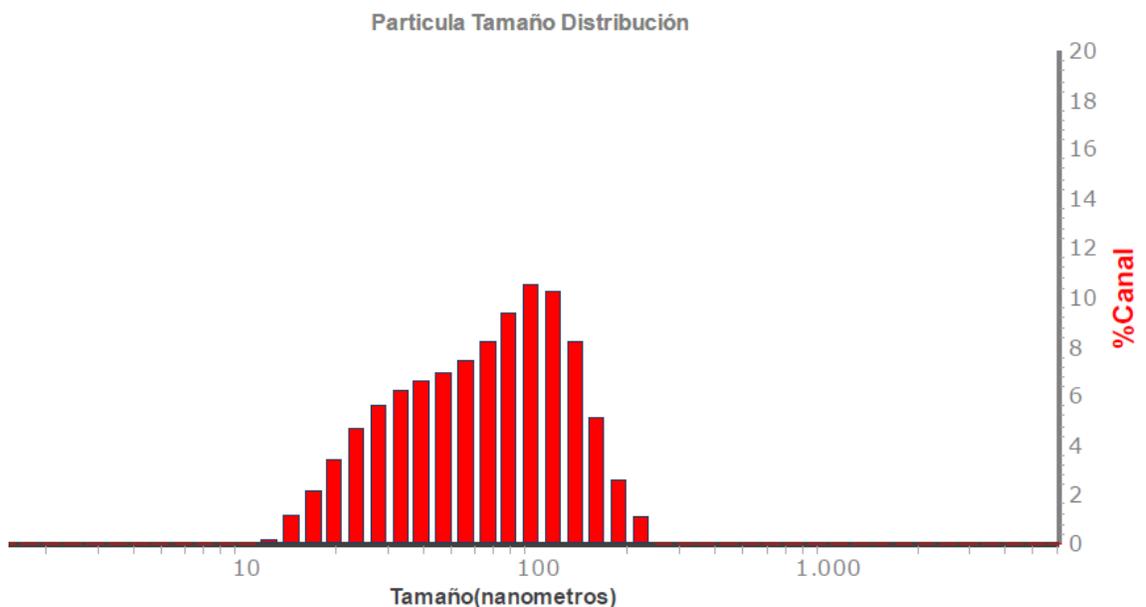


Figura 39. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina (0.1 mg/g formulación) y extracción de Luche liofilizada y reconstituida en 2 mL de agua desionizada.

Finalmente, se determinó el efecto de incrementar la fase oleosa a un 15%. Para lo cual, la formulación fue modificada según lo siguiente: 15% fase oleosa (nanoemulsión W/O), 10% surfactantes (Brij L4/Tween 80) y 75% fase acuosa.

El tamaño de glóbulo para esta formulación fue 161.78 ± 23.32 y 0.194 ± 0.015 (Figura 40).

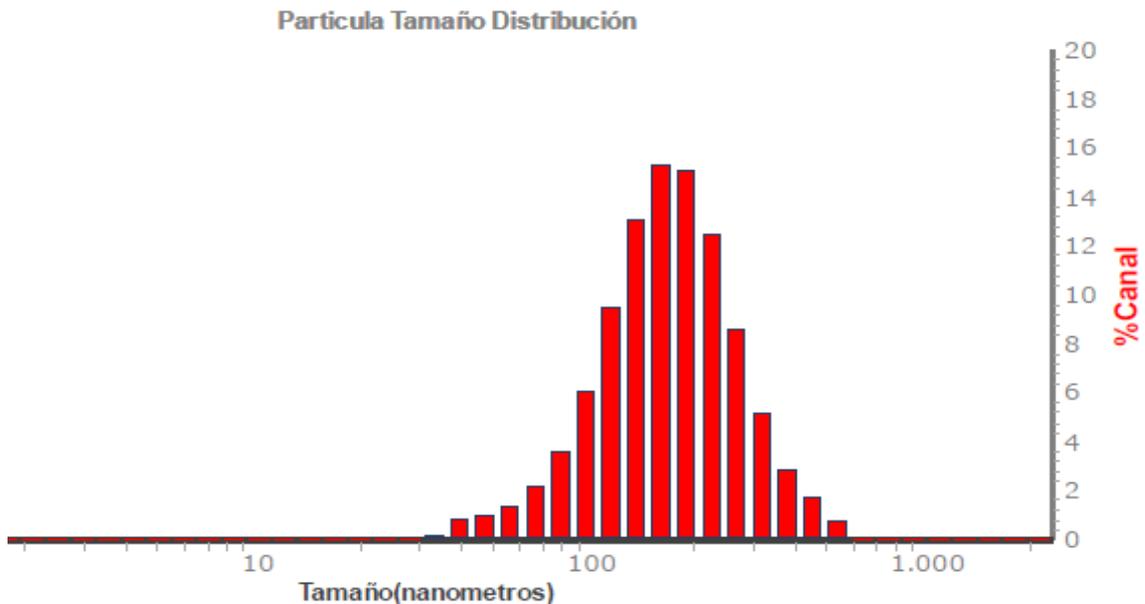


Figura 40. Histograma nanoemulsión W/O/W cargada con curcumina (0.3 mg/g formulación) y extracción de Luche liofilizada y reconstituida en 2 mL de agua desionizada. Aumento de fase oleosa.

Adicionalmente se decidió generar una formulación que incluyese un espesante, en este caso se utilizó goma xántica. Este es un hidrocoloide utilizado para estabilizar dispersiones acuosas, emulsiones y suspensiones. Se ha descrito que la adición del 1% de goma xántica es capaz de estabilizar nanoemulsiones. De la misma forma se añadió 1% de goma xántica en la nanoemulsión doble que contiene curcumina y el extracto de alga luche. La medición del tamaño de glóbulo se realizó mediante DLS para lo cual se utilizó un factor de dilución 25. El tamaño de glóbulo medido fue 416.43 ± 43.38 y PDI 0.343 ± 0.076 (Figura 41).

Particula Tamaño Distribución

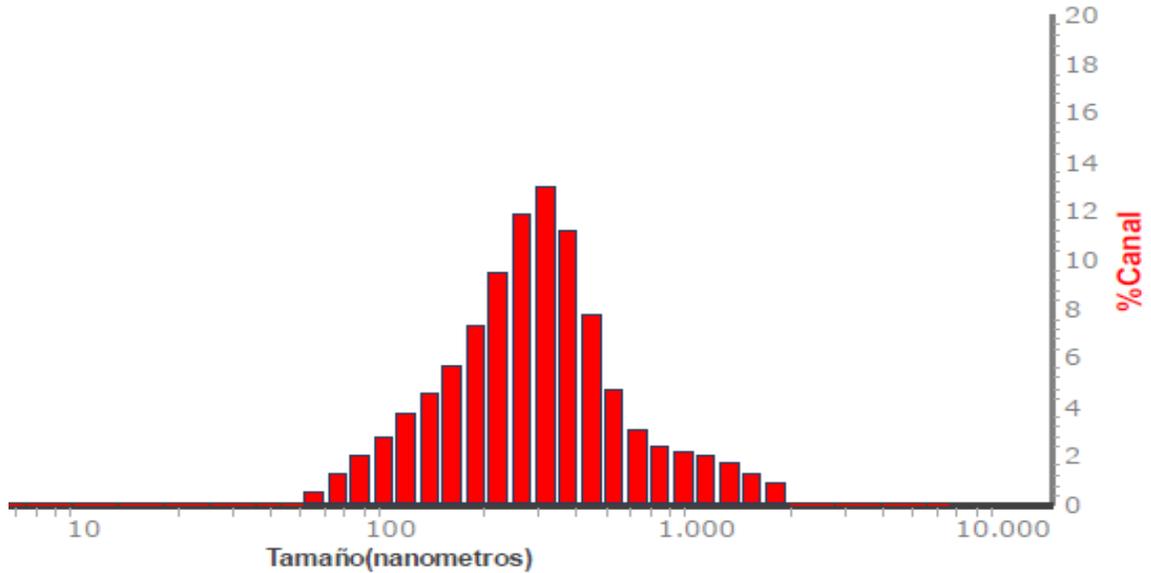


Figura 41. Histograma nanoemulsión W/O/W cuyas condiciones son similares a las del punto central junto con adición de goma xántica.

Si bien el histograma indica tamaños mayores a 1000 nm, entre 70-80% de los glóbulos se encuentran por debajo de los 500 nm. Visualmente una nanoemulsión espesada mediante goma xántica se puede apreciar en la figura 42.



Figura 42. Nanoemulsión W/O/W a la cual se le ha añadido 1% de goma xántica

4.2. Caracterización fisicoquímica y estabilidad para nanoemulsión W/O y W/O/W

4.2.1. Estudio estabilidad nanoemulsión W/O

Se expuso una nanoemulsión W/O a diferentes temperaturas durante 1 mes. Al completar este tiempo se observó el efecto de estas condiciones sobre la estabilidad de la nanoemulsión (presencia de desestabilización) y los compuestos activos. La concentración final de curcumina fue de 0.2 mg/g para poder discriminar diferencias en la absorbancia. En la figura 43, se observa la primera medición correspondiente al momento en que las formulaciones fueron sintetizadas

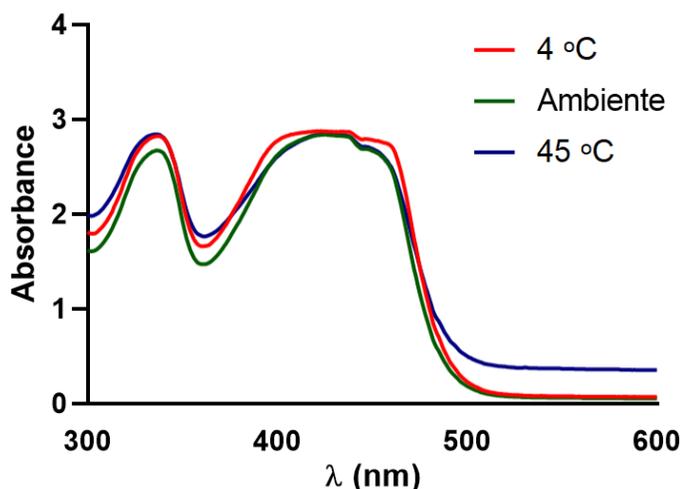


Figura 43. Espectrograma de nanoemulsiones W/O recién sintetizadas cargada con MAAs y curcumina.

En la figura 44, se observa el espectrograma para las nanoemulsiones W/O medido 1 mes después de exponerlas a diferentes temperaturas. Se aprecia una leve disminución en la absorbancia asociada a las MAAs (peak 334 nm). En el caso de la curcumina, su peak disminuye para la nanoemulsión W/O expuesta a 45°C.

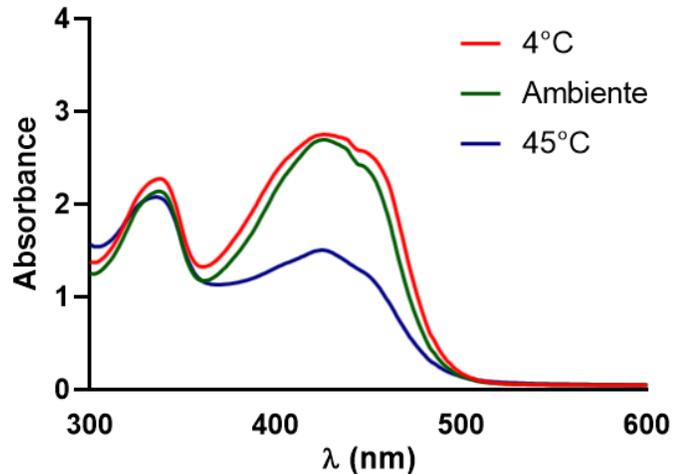


Figura 44. Espectrograma para nanoemulsiones W/O expuestas a diferentes temperaturas. Medición luego de cuatro semanas.

La figura 45, muestra las nanoemulsiones W/O después de cuatro semanas de exposición a las temperaturas 4°C, ambiente y 45°C. Esta última nanoemulsión presenta un cambio en la tonalidad en comparación con las nanoemulsiones a 4°C y temperatura ambiente. Por otra parte, no se observan signos de desestabilización como sedimentación o separación de fases.

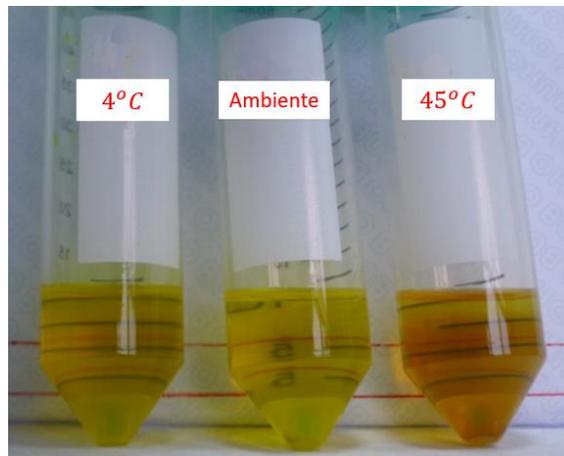


Figura 45. Nanoemulsiones expuestas a diferentes temperaturas, imágenes obtenidas después de cuatro semanas de exposición.

Nuevamente se realizó el experimento de estabilidad para la nanoemulsión cargada con 0.2 mg curcumina/g formulación y fase acuosa proveniente de extracto resuspendido en 10 mL de agua desionizada, y 1 mg curcumina/g formulación junto a fase acuosa proveniente de extracto resuspendido en 2 mL de agua desionizada. La nanoemulsión W/O expuesta a 45°C se apreció una

disminución en el máximo de absorción de curcumina e interesantemente se observó un incremento en el máximo de absorción asociado a P-334 (Figura 46). De igual manera se evidenció el cambio en la tonalidad del color característico. De la misma forma, se advierte precipitado en el fondo del tubo cónico (Figura 47).

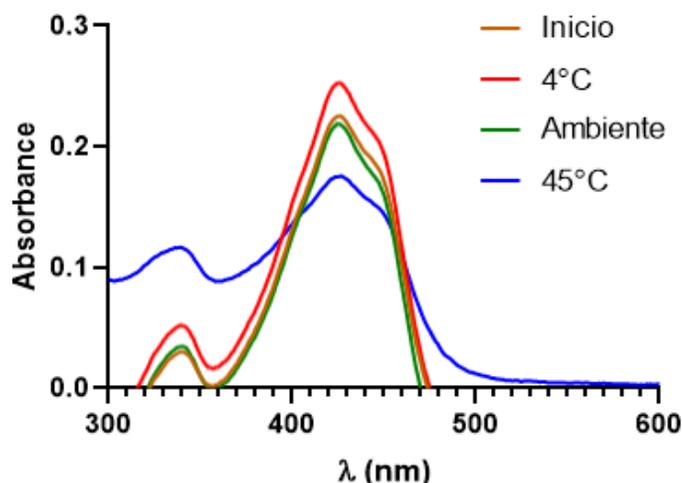


Figura 46. Espectrograma para Nanoemulsión W/O 0.2 mg curcumina/g formulación más extracto de Luche liofilizado y resuspendido en 10 mL de agua desionizada, expuesto a diferentes temperaturas. Factor de dilución 100.

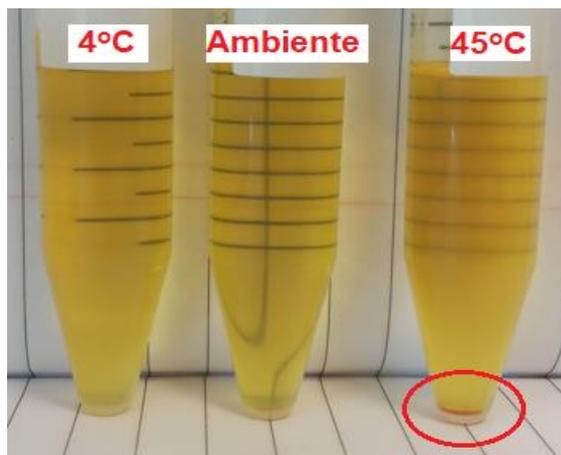


Figura 47. Nanoemulsión W/O 0.2 mg curcumina/g formulación más extracto de luche liofilizado-resuspendido en 10 mL de agua desionizada. En rojo se indica el precipitado de curcumina.

En el caso de la nanoemulsión W/O que contiene 1 mg curcumina/g formulación también se observó una disminución en el máximo de absorción para curcumina, mientras que el máximo de absorción para P-334 también disminuyó en

comparación con la formulación del inicio (Figura 48). Para lo anterior se observó precipitado y cambio en la tonalidad de la nanoemulsión expuesta a 45°C (Figura 49).

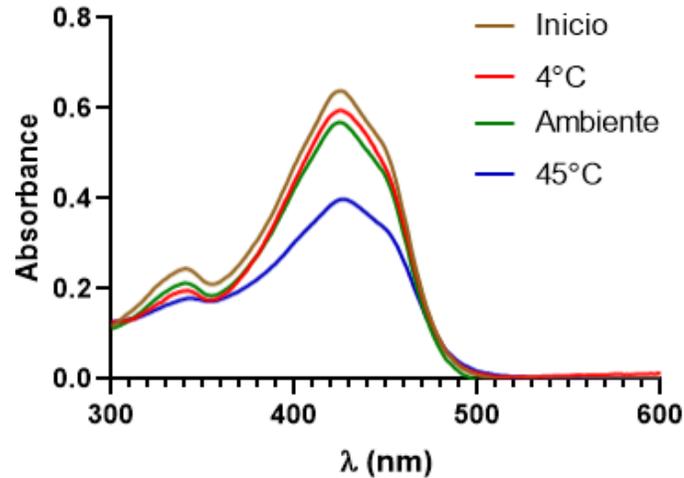


Figura 48. Espectrograma nanoemulsión W/O 1 mg curcumina/g formulación más extracto de luche liofilizado y resuspendido en 2 mL de agua desionizada, expuesto a diferentes temperaturas. Factor de dilución 100.

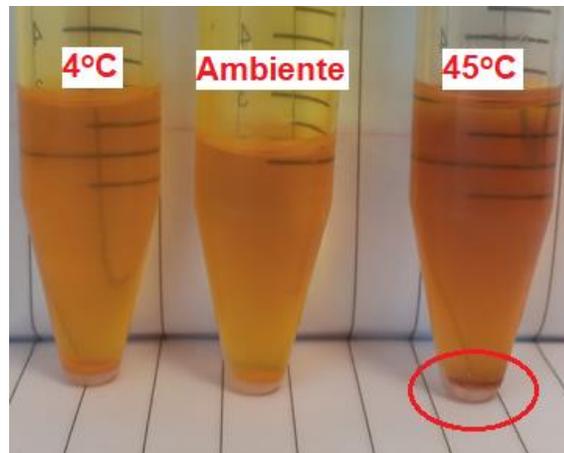


Figura 49. Nanoemulsión W/O 1 mg curcumina/g formulación más extracto de Luche liofilizado-resuspendido en 2 mL de agua desionizada. En rojo se indica precipitado de curcumina.

En el caso de la formulación doble, se generaron dos nanoemulsiones que contenían curcumina cuya concentración final fue 0.1 mg curcumina/g formulación y 0.3 mg curcumina/g formulación. Mientras que el glóbulo interno más pequeño correspondió a la fase acuosa o extracto de luche liofilizado y resuspendido en 2 mL de agua desionizada. Además, estas nanoemulsiones

fueron formuladas con 1% del preservante Iscaguard BSB para evitar la aparición de microorganismos durante el tiempo de exposición a las diferentes temperaturas. Este preservante es una mezcla de alcohol bencílico, alcohol benzoico y ácido ascórbico. De manera similar, las nanoemulsiones dobles fueron expuestas a diferentes temperaturas (4°C, ambiente y 45°C) y se realizó la medición espectrofotométrica e inspección visual luego de cuatro semanas de exposición.

Se observó una disminución en la señal del espectrograma tanto para curcumina y MAAs en ambas nanoemulsiones expuestas durante cuatro semanas a 45°C (Figura 50 y 52). Sin embargo, visualmente no se apreció desestabilización (Figura 51 y 53).

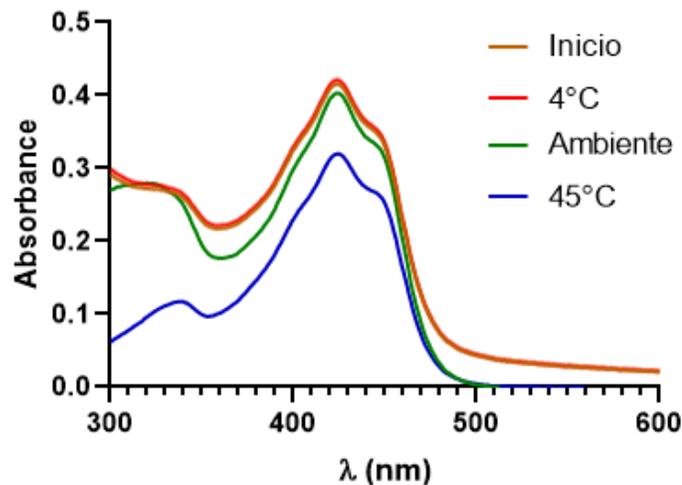


Figura 50. Espectrograma para nanoemulsión doble que contiene 0.1 mg curcumina/g formulación. Mientras que el extracto de Luche liofilizado y resuspendido en 2 mL de agua desionizada se encuentra doblemente encapsulado. Factor dilución 10.

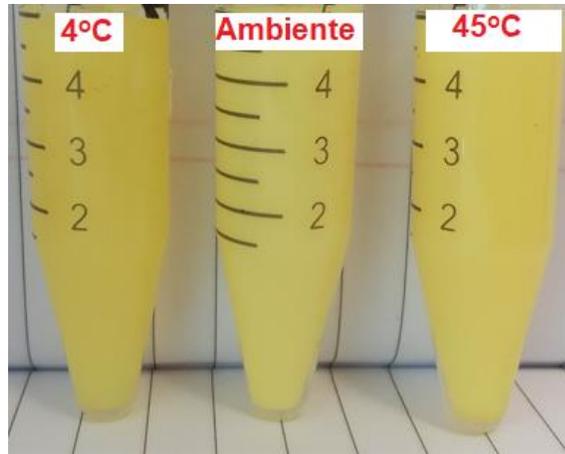


Figura 51. Nanoemulsión W/O/W expuesta a diferentes temperaturas durante cuatro semanas.

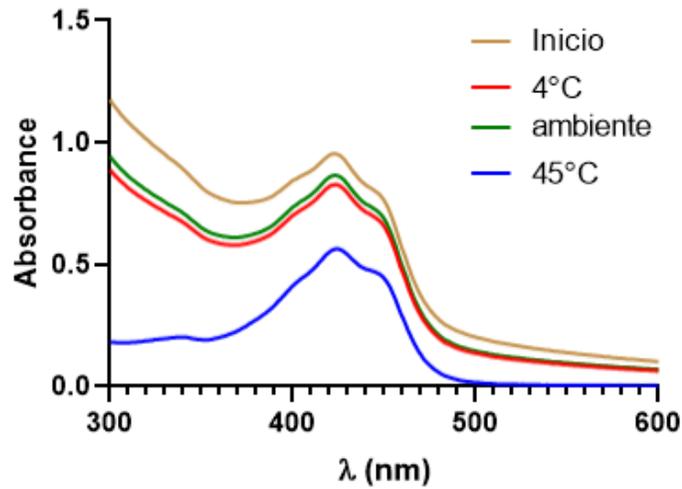


Figura 52. Espectrograma para nanoemulsión doble que contiene 0.3 mg curcumina/g formulación. Mientras que el extracto de Luche liofilizado y resuspendido en 2 mL de agua desionizada se encuentra doblemente encapsulado. Factor dilución 10.

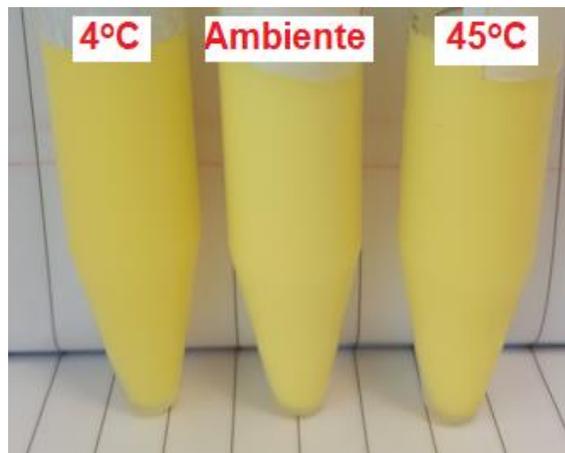


Figura 53. Nanoemulsión W/O/W con aumento en la concentración de curcumina expuesta diferentes temperaturas durante cuatro semanas.

Se observó una disminución en la señal del espectrograma tanto para curcumina como MAAs en ambas nanoemulsiones expuestas durante cuatro semanas a 45°C. Sin embargo, visualmente no se apreció desestabilización. La figura 54 muestra las mediciones de tamaño de glóbulo e índice de polidispersidad para las nanoemulsiones dobles que contienen 0.1 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada. Se observó un incremento en el tamaño de glóbulo de las nanoemulsiones para las temperaturas 4°C y ambiente, siendo esta última significativa tras 4 semanas de exposición. Interessantemente, las nanoemulsiones dobles expuesta a 45°C mostraron una disminución significativa en el tamaño de glóbulo con respecto al inicio (Anexo 8.9, tabla 8.13). En el caso de la polidispersidad no hubo diferencias significativas para las diversas temperaturas con respecto al inicio (Anexo 8.9, tabla 8.14).

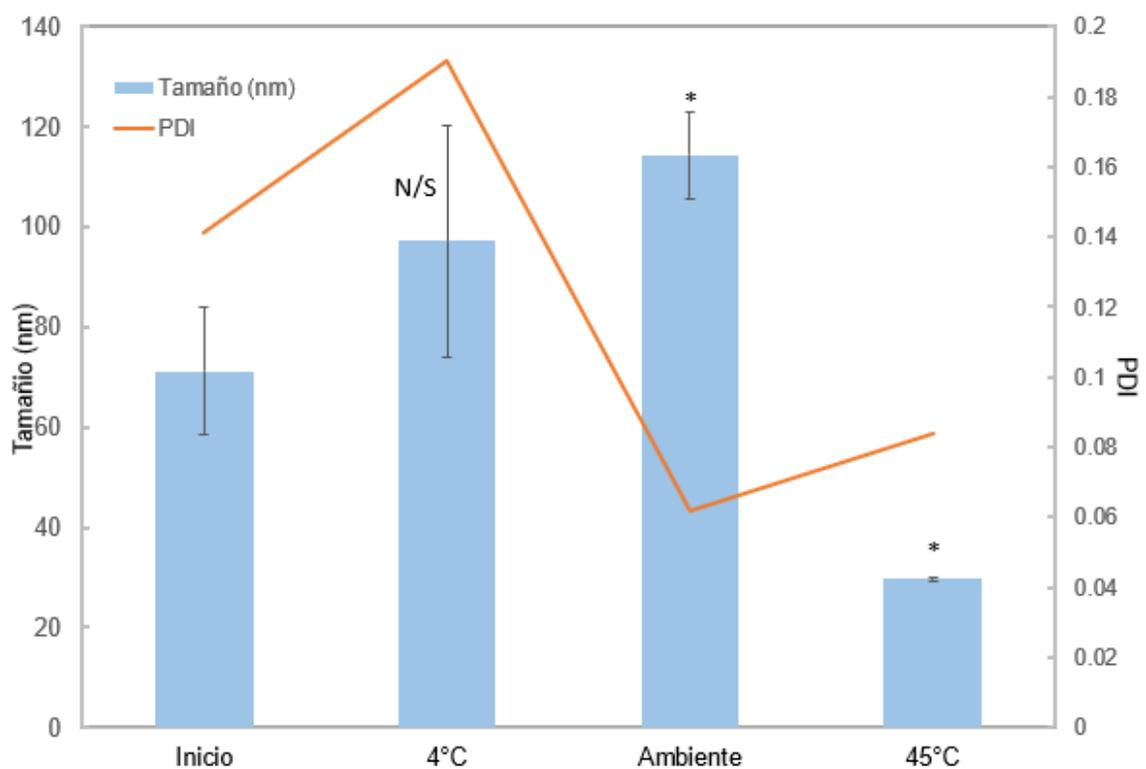


Figura 54. Tamaño e índice de polidispersidad (PDI) para nanoemulsión doble formulada con 0.1 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada. Medición luego de cuatro semanas.

En el caso de las nanoemulsiones dobles que contienen 0.3 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada, se observó que tras cuatro semanas de exposición a 4°C no existió diferencias significativas con respecto a la nanoemulsión doble inicial. Sin embargo, si existieron diferencias significativas para la temperatura ambiente y 45°C (Anexo 8.10, tabla 8.15). Al igual que en la nanoemulsión doble anterior, se apreció una disminución en el tamaño de glóbulo para la temperatura de 45°C (Figura 55). El cambio en la polidispersidad no fue significativo para la temperatura de 4°C, mientras que para la temperatura ambiente y 45°C si lo fue (Anexo 8.10, tabla 8.16)

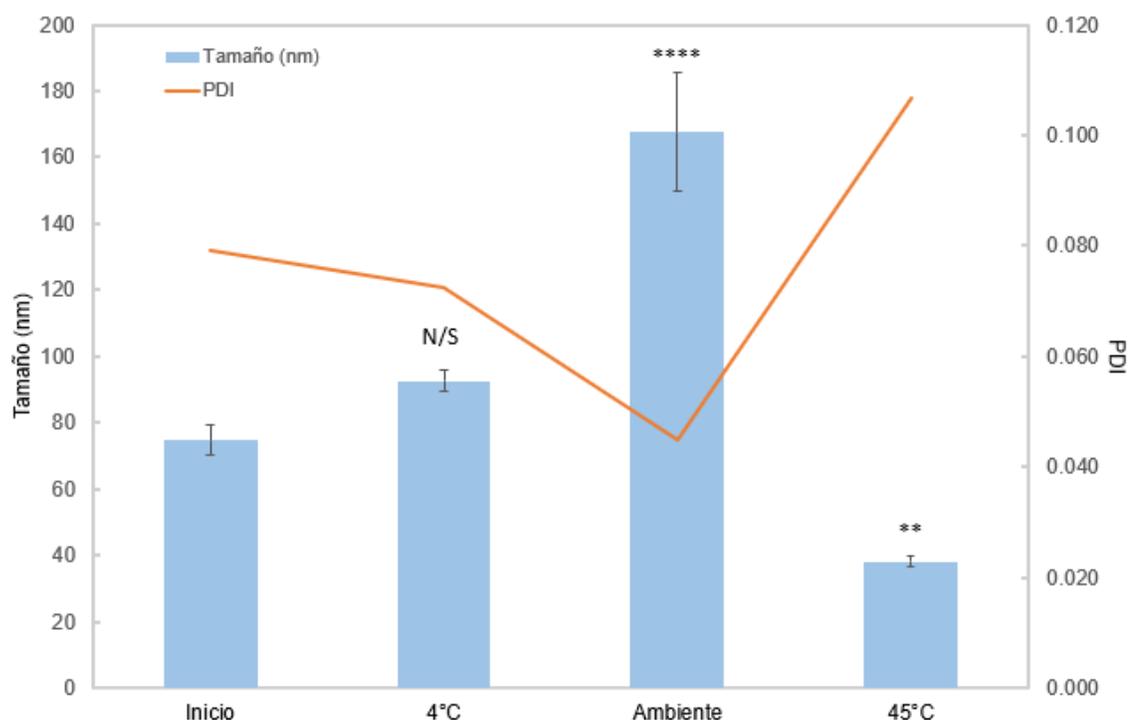


Figura 55. Tamaño e índice de polidispersidad (PDI) para nanoemulsión doble formulada con 0.3 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada. Medición luego de cuatro semanas.

4.2.2. FT-IR en nanoemulsión W/O

A continuación, en la figura 56. se muestra el espectrograma integrado para las muestras de nanoemulsión W/O (incluye curcumina y extracción de *P. columbina*), aceite mineral, extracción de MAAs y curcumina solubilizada en aceite mineral/surfactantes. El componente mayoritario de las nanoemulsiones

W/O fue el aceite mineral pesado. Este es altamente purificado y cuya composición es principalmente alcanos saturados y ramificados. En este sentido el análisis de FTIR para aceite mineral muestra tres regiones en donde se hay una seña medible, estas corresponden a 722, 1376-1458 y 2852-2918. Estas señales corresponden al movimiento asimétrico en el plano de flexión de los enlaces C-H, movimiento de tijeras de los enlaces C-H y estiramiento de los enlaces C-H, respectivamente. De la figura 56, se observa que las señales del aceite mineral se mantienen tanto para la nanoemulsión W/O y los controles que contienen curcumina-aceite mineral-surfactantes y surfactantes-aceite mineral. En el caso de la nanoemulsión W/O solo fue posible identificar una señal diferente a la de aceite mineral y surfactantes en los 3411 cm^{-1} . La cual se puede asociar a la presencia del extracto acuoso presente en la nanoemulsión W/O, y supondría un desplazamiento en el peak 3305 cm^{-1} del extracto acuoso (MAAs) a 3411 cm^{-1} en la nanoemulsión W/O.

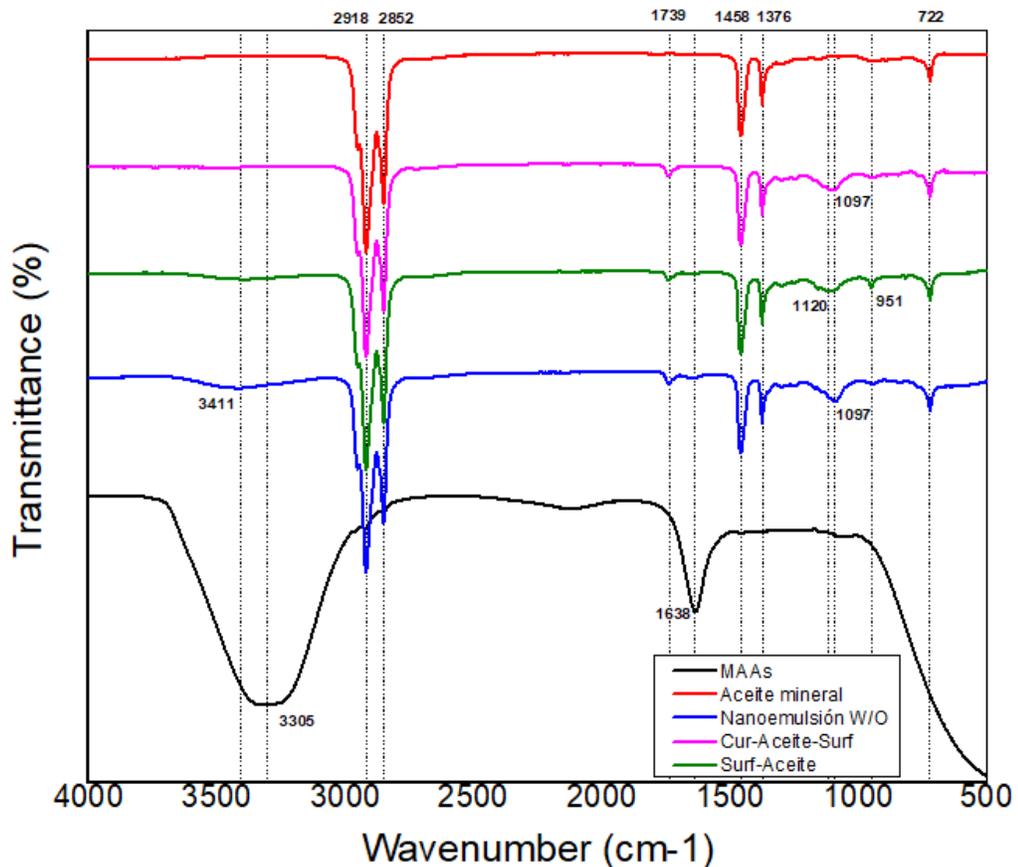


Figura 56. Espectrograma de FT-IR para nanoememulsión W/O y otros componentes.

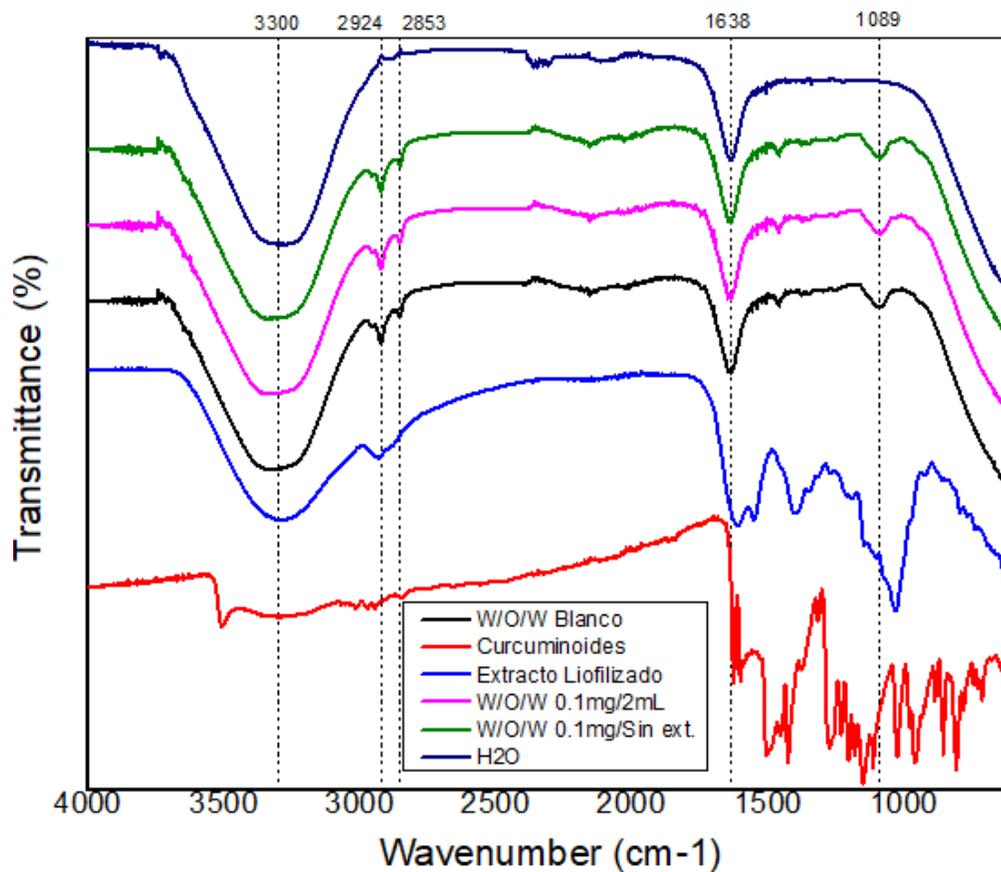


Figura 57. Espectrograma de FT-IR para nanoemulsión W/O/W y otros componentes.

En el caso de la nanoemulsión W/O/W, el componente principal corresponde a la fase continua o acuosa. Se ha descrito que el compuesto H₂O presenta bandas características que representan movimientos vibracionales de tijeras, y movimientos vibracionales de estiramiento. En la figura 57, estos movimientos están relacionados a los peaks 1638 cm⁻¹ y 3300 cm⁻¹, respectivamente. Estos peaks también son identificables en las muestras de nanoemulsión W/O/W blanco, y W/O/W cargadas con curcumina y MAAs. De igual manera el peak posicionado en 3300 cm⁻¹ aparece en la muestra de extracto liofilizado, lo cual podría indicar la presencia de H₂O en esta. El peak de curcumina cercano a los 3500 cm⁻¹ se relaciona con movimientos de estiramiento de los enlaces O-H. Los peaks bajo los 2000 cm⁻¹ se relacionan a movimientos vibracionales de los enlaces C=C (alquenos), C=O (carbonilo), C=C (aromático) y la mezcla de las diferentes configuraciones presentes en los curcuminoides. Los peaks

relacionados a los curcuminoides y al extracto liofilizado de *P. columbina* no pudieron ser identificados en las muestras de nanoemulsiones W/O/W.

4.2.3. Calorimetría diferencial de barrido para nanoemulsión W/O

A continuación, se muestran los resultados de calorimetría diferencial de barrido para la extracción de alga Luche (Figura 58). Las lecturas se realizaron en el intervalo de temperatura de -20 a 100°C sin registro del proceso entre la temperatura ambiente y el inicio (-20°C). Si bien, no se muestra el gráfico completo para el extracto acuoso, se analizó la señal obtenida cuyo peak se encuentra en la temperatura 3.09°C.

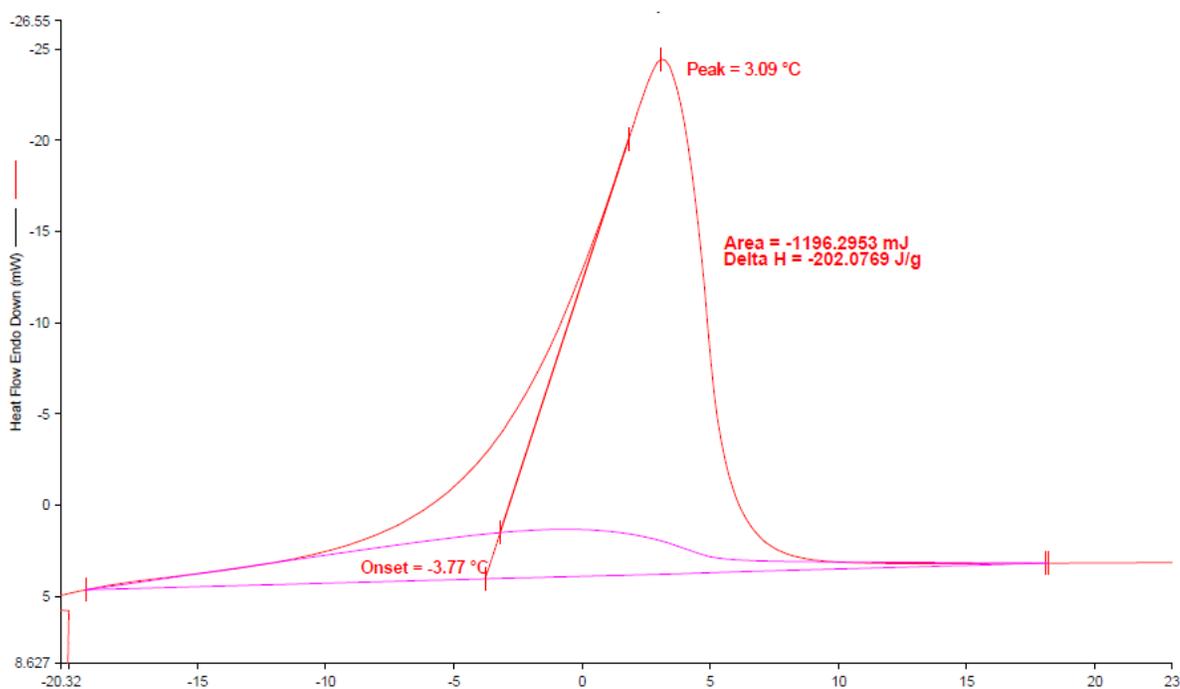


Figura 58. Termograma de DSC para extracto de *P. columbina*.

Cabe mencionar que este peak corresponde al proceso de fusión (cambio de estado). Durante este proceso endotérmico el sistema absorbe energía, evidenciado en el peak del termograma de la figura 58. El gráfico indica que la fusión comienza en -3.77°C y la velocidad máxima se logra a los 3.09°C, mientras que el calor latente necesario para la fusión es de 202.0769 J/g. No se observó otra señal asociada a degradación u otro tipo de proceso.

En la figura 59 se muestra una aproximación del termograma para una nanoemulsión cargada con curcumina-sin extracto de alga, y una nanoemulsión sin curcumina-con extracto de alga. Estas muestras de nanoemulsión W/O se componen en mayor proporción de aceite mineral. En el caso de este componente el punto de fusión y congelación se encuentra aproximadamente en -15°C , para lo cual en este punto no se detectó una señal medible de cambio de estado. De igual manera no se observó otro tipo de proceso como degradación o cambio de estado. En el caso del punto de ebullición, el aceite mineral lo alcanza a la temperatura de 218°C , dicha temperatura no fue alcanzada en las mediciones de DSC realizadas.

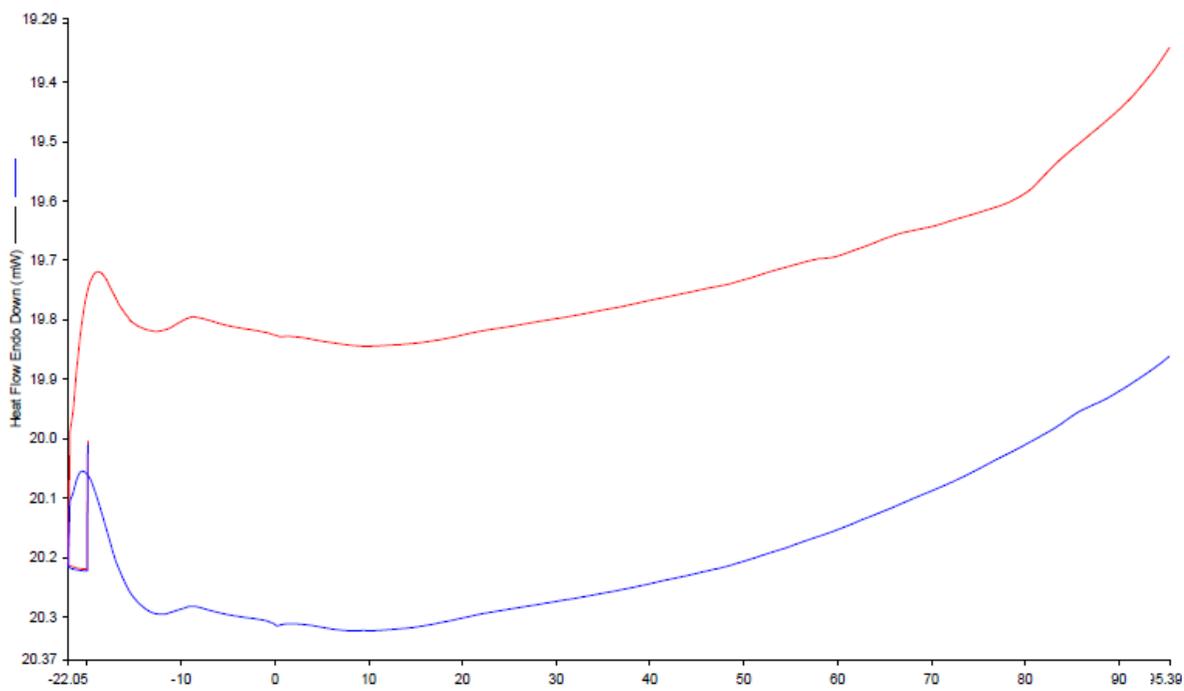


Figura 59. Termograma de nanoemulsión W/O cargada con curcumina (línea roja) y nanoemulsión W/O cargada con extracto de alga (línea azul).

4.2.4. Capacidad de encapsulación nanoemulsión W/O/W

La capacidad de encapsulación se determinó para la nanoemulsión doble que contenía curcumina en concentración final $0.3 \text{ mg curcumina/g formulación}$ y fase acuosa proveniente de extracto liofilizado y resuspendido en 2 mL de agua desionizada. Si bien el extracto acuoso contiene una mezcla de diversos MAAs, se cuantificó la presencia de P-334. La concentración final de P-334 en la

formulación doble fue 0.012 mg P-334/g formulación. Una muestra de 6 g de nanoemulsión doble que contenía 72 µg de P-334 fue sometida a centrifugación mecánica utilizando el tubo concentrador Vivaspin 20® durante 30 minutos. La concentración tanto de curcumina como de P-334 se realizó mediante cromatografía líquida con las condiciones descritas en secciones anteriores. La figura 60, muestra un tubo concentrador con una muestra de nanoemulsión doble después de ser sometida a centrifugación. La cantidad de líquido que logró permear la membrana del tubo concentrador fue 1.4 ± 0.1 g.



Figura 60. Tubo concentrador cargado con nanoemulsión doble post-centrifugación. En rojo se destaca líquido permeado.

El análisis cromatográfico del líquido permeado con las condiciones de fase móvil para la detección de curcumina no evidenció la presencia de esta. La figura 61 muestra el cromatograma para el líquido permeado en donde no se observan peaks cuantificables, más bien, solo se aprecia señal de ruido del equipo.

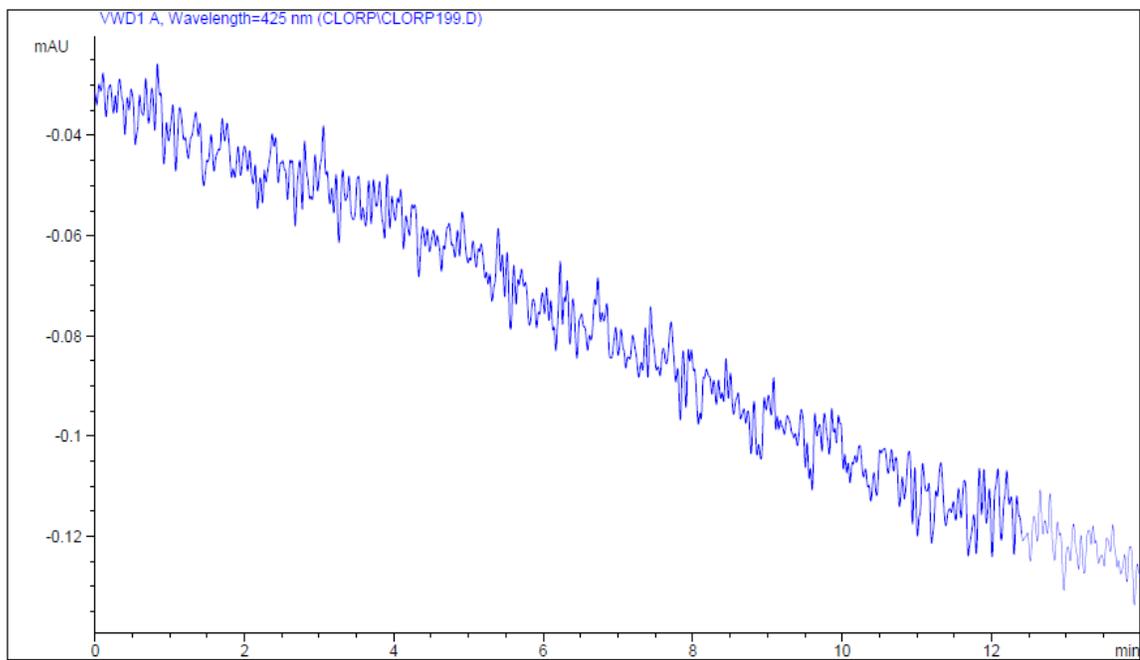


Figura 61. Cromatograma realizado a permeado con condiciones para la detección de curcumina. No se observa señal medible.

Por otra parte, el análisis cromatográfico para detectar la presencia de P-334 se muestra en la figura 62. Se evidencia la presencia de 4 peaks, el mayor de estos corresponde a P-334.

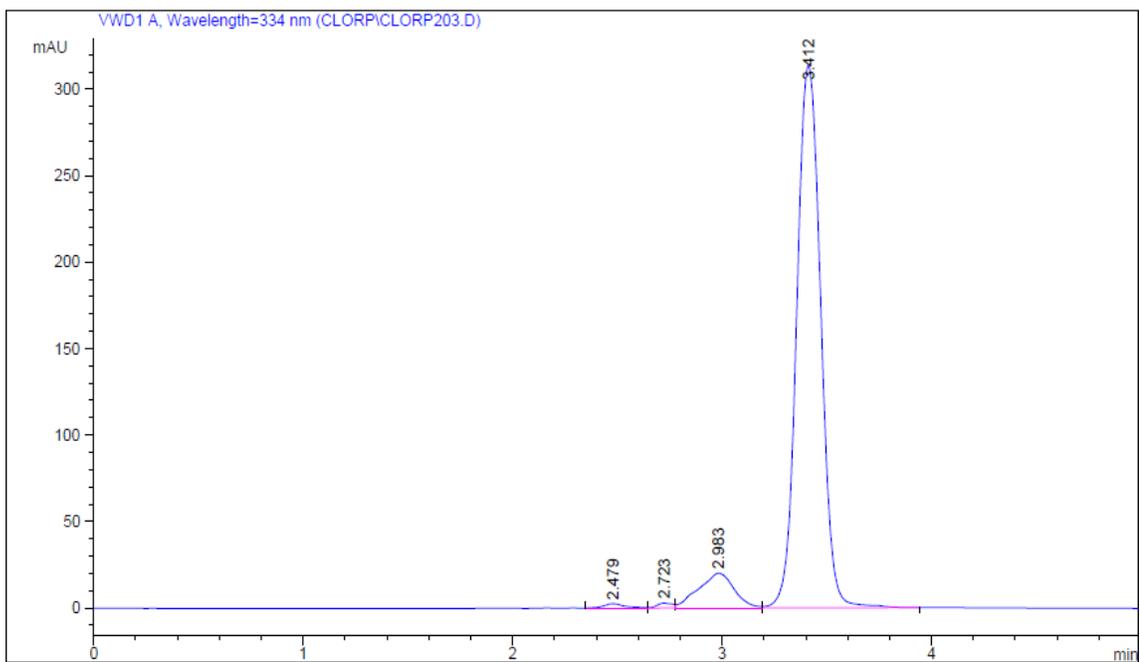


Figura 62. Cromatograma realizado a permeado con condiciones para la detección de curcumina. Se observa señal medible para P-334.

Teóricamente la cantidad total de P-334 en las muestras sometidas a la separación mecánica fue de 72 μg , mientras que la concentración estimada para el permeado fue $17.6 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$. Dado que la masa del líquido permeado fue $0.472 \pm 0.027 \text{ g}$, la cantidad total de P-334 permeada es 8.31 μg , lo cual corresponde a 11.54% del total de P-334 en la nanoemulsión doble. Por lo tanto, es posible que el 88.46% de P-334 quedó encapsulada en la nanoemulsión.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

5.1. Procesamiento y cuantificación de MAAs

Estudios previos realizados en el Laboratorio de Nanobiotecnología y Optoelectrónica han permitido determinar condiciones que permiten la extracción eficiente de MAAs desde el alga *P. columbina*. En diversos reportes la concentración MAAs presente en el alga *P. columbina* y otras algas rojas, se ha realizado en base a relaciones entre peaks espectrofotométricos o fracciones semipurificadas que posteriormente pueden ser analizadas mediante técnicas analíticas para comprobar la identidad de los compuestos presentes (Huovinen *et al.* 2004; Bathia *et al.* 2010; Charpentier *et al.* 2016). En este estudio la cuantificación de MAAs se realizó mediante HPLC y el estándar de P-334. Esto permitió determinar el contenido de P-334 en dos muestras de alga obtenidas en diferentes años, meses y lugares diferentes. Este análisis evidenció una diferencia en la concentración de P-334 para ambas muestras, lo cual indica que existen condiciones en el ambiente que influyen en el aumento y disminución de MAAs. Jofre *et al.* (2020) evidenciaron estos cambios de concentración en las algas rojas subantárticas *I. tuberculosa*, *N. fastigiata* y *C.* para los cuales existieron cambios según el nivel de radiación y estación, aumentando en la temporada de verano y primavera. Nishida *et al.* (2020) en estudios realizados sobre el alga roja *Palmaria palmata*, documentaron el contenido de las MAAs shinorina, palitina, asterina-330, porphyra-334 durante los meses de enero, febrero, abril y mayo, registrando un aumento de estas durante los meses de febrero y abril. Si bien las diferencias registradas en este trabajo muestran un cambio en la concentración, es necesario un análisis más detallado tomando en cuenta factores como mes de extracción, radiación, temperatura del medio, entre otros.

5.2. Formulación de la nanoemulsión primaria W/O

La formulación de emulsiones y nanoemulsiones es un problema multifactorial influido por variables tales como el porcentaje de las fases, tipo y concentración de

los tensioactivos, sinergia entre tensioactivos, compuestos activos, métodos de producción, las cuales son esenciales para lograr una emulsión estable. La combinación de los surfactantes Tween 80 y Span 80 ha sido descrito como altamente estable para emulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones tipo O/W (Syed & Peh. 2014). En el caso de las nanoemulsiones tipo W/O, Gómez (2014) demostró que estos surfactantes permiten la incorporación de al menos 8% de fase acuosa para un HLB 7.5, aceite mineral y homogenización ultrasónica, mediante esto se obtienen nanoemulsiones de 17-20 nm. La adición de un mayor porcentaje de fase dispersa provoca el incremento en el diámetro de glóbulo formado, evidenciado visualmente como un aspecto lechoso (Porrás *et al.* 2004). El diseño experimental realizado en este trabajo siguió los pasos descritos por Gómez (2014). Sin embargo, ninguno de los puntos experimentales resultó estable para la cantidad de fase dispersa añadida. Esto requirió la disminución de la fase dispersa al 3% del total de nanoemulsión. Los ensayos realizados por Gómez (2014) solo consideraron la adición de agua como fase dispersa. Sin embargo, añadir otro tipo de fase dispersa o una rica en sales puede provocar desestabilización de la emulsión generada (Maaref & Ayatollahi. 2017). El cambio en el porcentaje de la fase dispersa y el número HLB indican que la presencia de los compuestos activos puede influir en la formación y estabilidad de esta, al contribuir en el aumento o disminución de la tensión superficial (Di Mattia *et al.* 2010).

5.3. Formulación de la nanoemulsión doble W/O/W

La formulación exitosa de nanoemulsiones requiere primero definir el método de síntesis, alta o baja energía. Dependiendo del método seleccionado es posible realizar un análisis crítico de los factores imperantes en determinado método. Un ejemplo de esto fue descrito por Ahmad *et al.* (2019), quienes realizaron el diseño racional de nanoemulsiones para la encapsulación de curcumina. Primero seleccionaron una serie de aceites y agentes tensioactivos adecuados para la disolución de curcumina en esta fase oleosa. Posteriormente, para la síntesis de las nanoemulsiones se definió utilizar homogenización por ultrasonido. Según esto, procedieron a identificar variables independientes (% fase oleosa, % surfactantes,

tiempo ultrasonicación, intensidad y temperatura) para optimizar mediante un diseño central compuesto el tamaño de glóbulo, transmitancia e índice de polidispersidad. En el caso de la doble emulsificación también es posible tomar este enfoque como lo describe Sawant *et al.* (2017), quienes utilizaron un diseño de *screening* Plackett Burman para determinar los factores más relevantes para la formación de la primera emulsión (W/O) y segunda emulsión de forma conjunta. Posteriormente en este estudio se optimizó el tamaño de glóbulo y % eficiencia de encapsulación de lisinopril. En el caso de esta investigación, las condiciones experimentales de la nanoemulsión primaria W/O derivaron de la modificación de un punto experimental del diseño central compuesto que cumplió con los criterios para tamaño de glóbulo y PDI, evidenciándose cualitativamente como una emulsión de aspecto translúcido. Esto permitió continuar con la formulación de la nanoemulsión doble que exitosamente pudo ser formulada, tomando como estrategia la elaboración de un diseño experimental de *screening* que incluyó factores propios del método de emulsificación como el tiempo de homogenización por ultrasonido y amplitud; y los inherentes a la formulación como el % de surfactante y número HLB. A su vez el intervalo utilizado en el diseño experimental para el término HLB surgió de un análisis cualitativo previo en el que se determinó que el HLB adecuado para emulsificar 10% de fase oleosa se encontraba cercano a 12 (no mostrado en el documento). En este sentido el número HLB juega un papel esencial para lograr una formulación estable, ligado a lo anterior surge el término HLB requerido que es el valor de HLB del surfactante o mezcla de surfactante que permite una emulsión estable. Específicamente, el aceite utilizado para solubilizar la curcumina y formular la nanoemulsión fue aceite mineral pesado cuyo HLB requerido se ha descrito entre 10 y 11 (Croda. 2013). Sin embargo, la nanoemulsión doble formulada para la encapsulación de curcumina y MAAs fue lograda con HLB 12, obtenido mediante la interacción de los tensioactivos Brij L4® y Tween 80. En este sentido Kim & Cho (2014) en experimentos para la emulsificación de aceite mineral mediante el método de inversión de fases y surfactantes Tween80/Span80, describieron que el HLB para obtener glóbulos nanométricos se encuentra entre 12 y 13. Esta variación en el HLB requerido y reportado en literatura se debe

principalmente a que ciertas combinaciones de agentes tensioactivos y temperatura en el proceso resultan termodinámicamente estables favoreciendo la formación de micelas que permiten la encapsulación de la fase dispersa. Especialmente, se ha descrito que la combinación de diversos agentes tensioactivos de la serie Brij y Tween resultan altamente estables, influenciado por la diferencia de tamaño entre el segmento polar y apolar, y su interacción con las moléculas de agua. Esto incrementa los grados de libertad y los niveles de entropía en el sistema (Obradović & Poša. 2017). Ligado a lo anterior, la temperatura es un parámetro que se debe tener en cuenta para la formulación de nanoemulsiones. Kim & Cho (2014) determinaron el proceso de nanoemulsificación se ve favorecido a medida que se incrementa la temperatura y se mantiene sin cambios sobre los 70°C. En el presente estudio no se tomó la temperatura como una variable crítica en el proceso, más bien se definió como la temperatura a la cual los tensioactivos lograron homogenizarse con la fase en la que fueron inmersos, dicha temperatura fue superior a 60°C. Por la naturaleza del agente tensioactivo utilizado, Brij L4, tiende a formar espuma en presencia de agitación. Sin embargo, esta disminuye cuando se supera el umbral de temperatura mencionado anteriormente. Lo anterior da cuenta de la necesidad de considerar este factor a la hora de formular la nanoemulsión. Según lo anterior, se reconoce que el diseño experimental tanto de *screening* como de optimización es una estrategia adecuada para definir rápidamente los parámetros de HLB, temperatura, % fases dispersa y continua, entre otros, que son requeridos para emulsionar la fase oleosa u acuosa determinada.

Una estrategia alternativa para lograr emulsiones o nanoemulsiones estables es la que hace referencia a la exploración del diagrama de fases ternario en donde las variables con las que se construye el gráfico corresponden a % fase oleosa, %fase acuosa y % surfactantes. En este sentido, la exploración del diagrama lleva al descubrimiento de zonas en donde se da la formación de emulsiones O/W, W/O, estructuras bicontinuas, y dependiendo del método de producción también es posible encontrar otro tipo de estructuras. Sin embargo, este método resulta poco eficiente ya que requiere explorar diferentes áreas del diagrama de fases ternario, a su vez no permite la adición de otros factores en la estrategia experimental.

5.4. Proceso de nanoemulsificación y encapsulación de los compuestos curcumina y MAAs

La capacidad de la nanoemulsión doble para encapsular los MAAs fue de aproximadamente un 88.5%, mientras que para curcumina no hubo señal detectable ni cuantificable en el líquido permeado que se obtuvo tras someter la nanoemulsión al ensayo correspondiente. Este ensayo se realizó según lo descrito por Sari *et al.* (2015) quienes lo aplicaron para determinar la eficiencia de encapsulación de una nanoemulsión O/W para la encapsulación de curcumina (emulsificación por ultrasonido), obteniendo un porcentaje de encapsulación del 90.56% que fue determinado considerando el contenido fenólico total como marcador. Saari *et al.* (2020) en estudios para la encapsulación de curcumina mediante la emulsificación de aceite de coco/miel mediante un método de baja energía, determinaron una eficiencia de encapsulación del 98%. Lo anterior indica que mediante métodos de alta y baja energía es posible lograr una alta eficiencia de encapsulación de curcumina. Como se mencionó anteriormente, no fue posible detectar curcumina en el líquido permeado del tubo concentrador, indicando que la capacidad de encapsulación de la nanoemulsión doble es 100% para curcumina. Sin embargo, previo a la formulación de la nanoemulsión doble, la nanoemulsión W/O fue sometida a centrifugación mediante tubo concentrador Vivaspin 20 100 kDa, donde no se detectó ningún componente permeado, ya sea fase acuosa, fase oleosa o curcumina. Un resultado similar se observó para la nanoemulsión W/O blanco y muestras de aceite mineral, sugiriendo que este efecto se debe a la imposibilidad del aceite mineral para atravesar la membrana del tubo concentrador antes mencionado.

Dentro de este contexto y en el caso de la doble emulsificación, Lu *et al.* (2022) estudiaron el efecto de utilizar tensioactivos de diferente naturaleza sobre formulaciones dobles tomando como modelo insulina (molécula hidrofílica) y quercetina (molécula lipofílica). El agente tensioactivo Tween 80 mostró mejores cualidades sobre la emulsión generada, tales como menor tamaño de partícula (1326 nm), estabilidad frente a cambios de pH y encapsulación de los compuestos

activos (>90% para ambas moléculas). El método utilizado para la cuantificación de estos compuestos fue someter la emulsión a centrifugación durante determinado tiempo y temperatura, para posteriormente cuantificar la insulina y quercetina solubilizada en la fase acuosa depositada en el fondo del tubo. Utilizando el mismo método de cuantificación, Aditya *et al.* (2015) describieron que las emulsiones dobles de tamaño micrométrico para la encapsulación de catequina y curcumina tienen una capacidad de encapsular ambas moléculas sobre el 90%. Igualmente, estos autores mencionan que debido a la presencia del tensioactivo Tween 80 y exceso de este, la curcumina que no ha sido encapsulada es capaz de solubilizarse en la fase acuosa. Sin embargo, es importante constatar que esto no fue observado en la presente investigación, por lo que no fue posible determinar la capacidad de encapsulación de curcumina en la nanoemulsión doble. En el caso de los MAAs, si fue posible detectar P-334 en el líquido permeado, indicando que la capacidad de encapsulación de la nanoemulsión doble es del 88.5%.

Considerando que la nanoemulsión desarrollada es doble y el extracto acuoso corresponde al glóbulo más interno, es evidente que P-334 logró pasar desde los glóbulos internos hacia la fase continua final (acuosa). Respecto a esto Leister & Karbstein (2020) se refieren a diversos mecanismos de desestabilización, donde la distribución de los tensioactivos y actividad osmótica de los compuestos activo son esenciales para una formación estable de los glóbulos.

En teoría se espera que los tensioactivos se distribuyan según su afinidad por la fase en la que se encuentran inmersos. Sin embargo, la doble emulsificación supone la existencia de más fases en las que el o los tensioactivos se pueden reordenar alcanzando un nuevo equilibrio para la emulsión primaria y/o secundaria. Este nuevo equilibrio también supone que el compuesto activo pueda estar distribuido en el glóbulo más interno y en la fase continua debido al movimiento osmótico de la molécula. En este caso, seguramente la molécula en estudio se encontraría en la fase más externa provocando que el porcentaje de encapsulación no sea del 100%. Estos procesos también pueden estar acompañados de un incremento en el tamaño de glóbulo debido a los mecanismos de desestabilización como coalescencia y

Ostwald rippening (maduración de Ostwald). Otro proceso que provoca la desestabilización de la doble emulsificación es lo llamado “sobreprocesamiento”, ocurre cuando se excede en la energía suministrada para llevar cabo la emulsificación. Esto fue observado por Bamba *et al.* (2020), quienes realizaron emulsiones dobles para la encapsulación de polifenoles y antocianinas provenientes del orujo de arándano. En este estudio, los autores recurrieron a los métodos de homogenización por alta velocidad y homogenización de alta presión, observando que existe un intervalo de velocidad y presión para los cuales los tamaños de glóbulo y polidispersidad disminuyen, mientras que la eficiencia de encapsulación aumenta. Sin embargo, al aumentar los parámetros de homogenización se observó que tanto el tamaño de glóbulo como polidispersidad aumentan, y la eficiencia de encapsulación disminuye.

En la presente investigación no se realizaron pruebas como la antes descrita, si se observó que el único parámetro que modela el tamaño de glóbulo en la ecuación obtenida mediante el diseño de *screening* fue el tiempo de homogenización por ultrasonido. La ecuación que describe este proceso es de tipo cuadrática cuya concavidad es positiva y por lo tanto la predicción del tamaño de glóbulo indica que existe un punto mínimo, y por lo tanto un aumento en el tiempo de homogenización ultrasónica influenciará en el aumento del tamaño de glóbulo

5.5 Estabilidad y caracterización de nanoemulsión y compuestos activos curcumina y MAAs

No fue posible hacer seguimiento del tamaño de glóbulo a la nanoemulsión W/O. Sin embargo, los resultados obtenidos para las formulaciones desarrolladas indican su estabilidad ante diferentes condiciones de temperatura (4^oC, temperatura ambiente y 45^oC) para lo cual no se observaron señales de desestabilización en el periodo de tiempo que se desarrolló el ensayo. Si bien, para la formulación de la nanoemulsión W/O se siguieron algunas de las recomendaciones descritas por Gómez (2014), quien desarrolló nanoemulsiones W/O para la emulsificación de aceite mineral mediante Tween80/Span80 y emulsificación por ultrasonido, fue necesaria la modificación del porcentaje de la fase acuosa (extracción acuosa de *P.*

columbina) y HLB para alcanzar una nanoemulsión exitosa. Cabe mencionar que en el experimento de estabilidad realizado por Gómez (2014), la fase acuosa correspondió agua desionizada en un 8% (del total de la formulación). Sin embargo, otros experimentos realizados por la misma autora en donde adicionó una fase acuosa de NaCl 0.1M, indicaron que la adición de esta en porcentajes mayores a 3% un aspecto translúcido-turbio en la nanoemulsión W/O.

La estabilidad de los compuestos activos en la nanoemulsión W/O se midió mediante espectrofotometría tras el tiempo de realización. Este ensayo se realizó dos veces debido a que en la primera oportunidad la dilución de la nanoemulsión estuvo muy cercana a la señal de saturación del equipo. A pesar de esto se pudo observar una leve disminución en la señal asociada a MAAs y más pronunciada para la de curcumina en el caso de la nanoemulsión expuesta a 45°C. Visualmente la nanoemulsión expuesta a 45°C cambio la tonalidad de esta en comparación las nanoemulsiones expuestas a temperatura 4°C y ambiente. En la segunda oportunidad se trabajó con la misma formulación que en el primero ensayo y adicionalmente se aumentó la concentración de curcumina a 1 mg/g formulación y la concentración del extracto acuoso. En este caso se aumentó la dilución de las nanoemulsiones para no saturar la señal, observando nuevamente una disminución en la señal de la curcumina presente en la nanoemulsión W/O expuesta a 45°C. Interesantemente bajo esta condición la señal de MAAs aumentó. En el caso de la nanoemulsión para la cual se incrementó la concentración de los compuestos activos, nuevamente se apreció una disminución en la señal de curcumina mientras que la señal de MAAs disminuyó levemente.

En estudios previos en donde se determinaron ciertas condiciones de procesamiento del extracto de *P. columbina*, existieron temperaturas bajo las cuales se observó una disminución en la señal de absorbancia del extracto asociados a una degradación de MAAs. Este comportamiento se evidenció al realizar las extracciones a altas temperaturas durante no más de 3 horas. Con respecto a esto Zhang *et al.* (2005) estudiaron el efecto de someter diversas extracciones de *P. yezoensis* ricas en MAAs a diferentes condiciones de pH y temperatura. Fue

evidente que para pH 12 y 13 los máximos de absorción disminuyeron considerablemente, mientras que para las condiciones de pH 1 hasta 11 la disminución en el máximo de absorción es dependiente de la temperatura y tiempo de exposición, no habiendo diferencias apreciables para 20°C y 40°C. A la temperatura de 60°C y transcurrida 25 horas de exposición hay una disminución significativa para las extracciones con pH 1 y pH 2. 25 horas de exposición a 80°C el máximo de absorción disminuye para todas las condiciones de pH. La encapsulación y en particular la estrategia de nanoemulsificación desarrollada en esta investigación permiten evitar que los compuestos activos sean afectados por condiciones como las mencionadas anteriormente. En este sentido, el cambio en la absorbancia es mucho más apreciable para la curcumina (no encapsulada) que para los MAAs (encapsulado), incluso cambiando la tonalidad y aspecto de la nanoemulsión.

En el caso de la nanoemulsión doble, fue posible medir el tamaño de partícula transcurrido el tiempo de exposición a diferentes temperaturas, además de realizar la medición espectrofotométrica correspondiente. Para este último se observaron efectos similares a los evidenciados en la nanoemulsión W/O, luego de cuatro semanas de exposición a 45°C hubo una disminución en el máximo de absorción para la curcumina presente en las dos nanoemulsiones doble desarrolladas cargadas con 0.1 y 0.3 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de una extracción de luche liofilizado y resuspendido en 2 mL de agua desionizada. Sin embargo, la degradación de curcumina depende de varios factores como el medio en el que está dispersa, pH, presencia de luz y temperatura de almacenamiento. Al respecto, Bathia *et al.* (2016) realizaron diversos experimentos de estabilidad sobre curcumina, determinando que el comportamiento de la curcumina disuelta en una solución acuosa de etanol 5%, diferentes pH (2, 7 y 9), exposición a temperaturas entre 20 y 60°C, indicó que incluso bajo condiciones extremas existe una estabilidad relativa para la curcumina. Este escenario que cambia al exponer la curcumina a pH9, en donde a temperaturas superiores a 25°C se observa una rápida degradación de la curcumina. Kharat *et al.* (2017) estudiaron el efecto de encapsular curcumina en una emulsión tipo O/W y exponer dicha

emulsión a diversas condiciones de pH (3, 5, 7, 7.4 y 8) en la fase continua (W_2) y temperatura 37°C , durante 30 días. De igual manera se observó que el pH de la fase continua también afecta la estabilidad de la curcumina, disminuyendo levemente y siendo más estable para pH 3 y 5. Luego de realizar la formulación doble que contenía curcumina y MAAs, el pH de esta fue de 5.6 ± 0.1 . Sin embargo, las formulaciones que se sometieron al ensayo de estabilidad se les añadió el preservante Iscaguard BSB, lo que disminuyó el pH de la formulación hasta 4.2 ± 0.1 . Si bien, se observó que los compuestos activos son relativamente estables a las temperaturas 4°C y ambiente, hubo una disminución en el máximo de absorción para ambos compuestos activos a la temperatura de 45°C a pesar de que el pH de la formulación se encontraba en el intervalo de pH para el cual Kharat *et al.* (2017) mencionan como de poco cambio.

En relación con el tamaño de partícula registrado en el ensayo de estabilidad, este se realizó para dos formulaciones con diferentes concentraciones de curcumina. Los efectos observados para ambas nanoemulsiones doble expuestas a las temperaturas de 4°C , temperatura ambiente y 45°C fue similar. Ribeiro *et al.* (2015) expusieron nanoemulsiones tipo O/W blanco y cargadas con extracto de *Opuntia ficus-indica* a las temperaturas 4°C , 25°C y 45°C , durante 60 días. Para la temperatura de 4°C no se observó diferencia significativa con respecto al inicio. Sin embargo, se reportaron diferencias para las temperaturas de 25° y 45°C . Al igual que en esta investigación, el tamaño de glóbulo tuvo una disminución significativa con respecto al inicio para la temperatura de 45°C , pasando de 119 a 92.17 nm. En experimentos similares a los anteriores, Bernardi *et al.* (2011) sintetizaron nanoemulsiones O/W en donde la fase oleosa consistió en aceite de salvado de arroz. Esta nanoemulsión fue expuesta a las temperaturas 5°C , 25°C y 40°C , observando una disminución en el tamaño de glóbulo para todas las formulaciones tras 90 días de medición. Esta disminución fue más pronunciada para la nanoemulsión expuesta a 40°C . Raviadaran *et al.* (2021) formularon nanoemulsiones dobles para la encapsulación conjunta de ácido cafeico y cisplatino, las cuales fueron sometidas a un ensayo de estabilidad durante 180 días a 25°C . Los resultados indicaron que el tamaño de diámetro incrementó de 175.5

nm a 254.7 nm. Con respecto a esto, los autores se refieren a que el mecanismo de desestabilización está relacionado con la migración de la fase acuosa interna hacia la fase más externa. Sin embargo, esto puede ser minimizado mediante el uso de los tensioactivos adecuados y agentes espesantes. Como se mencionó anteriormente, los cambios en el tamaño de glóbulo (temperatura ambiente y 45⁰C) y PDI registrado en la presente investigación, se puede asociar a la reorganización de los tensioactivos y a la migración conjunta de fase acuosa y compuestos activos hacia la fase acuosa más externa.

Las mediciones de FT-IR para las nanoemulsiones W/O y W/O/W no evidenciaron la presencia de peaks relacionados a los compuestos curcumina y MAAs. Con respecto a lo anterior, Hu *et al.* (2015) en experimentos para la encapsulación de curcumina mencionan los posibles efectos que puede tener la matriz sobre esta molécula. Dicha interacción puede generar la aparición de nuevos peaks o el desplazamiento de peaks existentes. En este sentido los autores mencionan que los grupos carbonilo presentes en la curcumina pueden formar puentes de hidrógeno con grupos hidroxilos presentes en la matriz polimérica en la que fue inmersa, registrando una disminución en la señal cercana a los 1627 cm⁻¹. En el caso de la nanoemulsión W/O solo fue posible identificar un peak que se mantiene tanto en la muestra control que contiene curcumina-surfactantes-aceite mineral y la nanoemulsión W/O, y que podría estar asociada a la presencia de esta molécula. En tanto, la presencia de MAAs no pudo ser corroborada mediante la técnica de FT-IR. Las mediciones de FT-IR para la nanoemulsión W/O/W no permitieron identificar si los compuestos antes mencionados fueron incorporados en la nanoemulsión doble, al no evidenciar la presencia de los peaks característicos para ambas moléculas.

CONCLUSIONES

Mediante la estrategia de dos pasos utilizada en esta investigación fue posible formular exitosamente una nanoemulsión doble para la encapsulación conjunta de los compuestos curcumina y MAAs proveniente de un extracto eco-amigable de *P. columbina*.

Con el fin de lograr la nanoemulsión fue necesario realizar un análisis de los diferentes factores que afectan la formación de esta, en tanto el método de dos pasos permite estudiar y optimizar por separado las nanoemulsiones W/O y W/O/W. En este sentido la nanoemulsión W/O se realizó mediante la fase oleosa aceite mineral (86%), los tensioactivos Tween80/Span80 (11%) y fase acuosa correspondiente al extracto de *P. columbina* (3%). La solubilización de la curcumina fue posible en virtud del uso de estos agentes tensioactivos y una estrategia experimental que requirió homogenización mediante agitación magnética, baño ultrasonido y agitación orbital durante 24-72 horas dependiendo de la concentración de curcumina que se quiso alcanzar (0.2 mg hasta 1 mg/g formulación).

En cuanto, al extracto de *P. columbina*, la concentración de MAAs se pudo aumentar mediante la liofilización y resuspensión del extracto en un volumen menor al inicial. Dependiendo de la concentración de los compuestos activos fue necesaria la utilización de homogenización por ultrasonido adicional.

La nanoemulsión doble se logró realizar mediante los tensioactivos Tween80/Brij L4 y los métodos de homogenización de alta velocidad y homogenización por ultrasonido. A través de este procedimiento fue posible formar glóbulos nanométricos de diferentes tamaños dependiendo de la concentración de los compuestos activos y la fase oleosa que correspondió a la nanoemulsión W/O.

Los ensayos de FT-IR fueron realizados tanto para la nanoemulsión W/O como la nanoemulsión W/O/W. Si bien se realizaron las mediciones para los compuestos curcumina y MAAs, y se obtuvieron los espectrogramas para estas. No fue posible identificar los peaks de estas moléculas en las muestras de nanoemulsión W/O y W/O/W.

Fue posible efectuar el ensayo de estabilidad durante cuatro semanas, el cual permitió determinar el comportamiento de la nanoemulsión W/O/W frente a diferentes condiciones de almacenamiento. Se observó un leve incremento en el tamaño de glóbulo en la condición de almacenamiento de 4⁰C, aunque este no fue significativo. En la condición de almacenamiento de temperatura ambiente se observó un significativo aumento en el tamaño de glóbulo, mientras que para la temperatura 45⁰C se evidenció una disminución en el tamaño de glóbulo con respecto al inicio. Tanto aumento como disminución de tamaño se asociaron a mecanismos de desestabilización propios de emulsiones dobles.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

Adtiya, N. Aditya, H. Yang, H. Kim, S. Park, S. Ko, S. (2015). Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. *Food Chemistry*. 173:7-13.

Ahmad, N. Ahmad, R. Al-Qudaihi, R. Edrees, S. Zuhair, I. Saifuddin, M. Hyder. (2019). Preparation of a novel curcumin nanoemulsion by ultrasonication and its comparative effects in wound healing and the treatment of inflammation. *RSC Advances*. 9:20192-20206.

American Cancer Society (2018) Key Statistics for melanoma skin cancer. Recuperado de <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>. Consultado en 05-01-2019.

Ansel, J. Lupo, E. Mijouin, L. Guillot, S. Butaud, J. Ho, R. Lecellier, G. Raharivelomanana, P. Pichon, C. (2016). Biological Activity of Polynesian *Calophyllum inophyllum* Oil extract on Human Skin Cells. *Planta Medica*. 82(11/12): 96-966.

Anton. N, Vandame. T (2011) Nano.emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical Research*. 28(5):978-985.

Apalla, Z. Nashan, D. Weller, R. Castellsagué, X. (2017). Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatology and Therapy*. 7(Suppl 1):S5-S19.

Araiza. A, Akhtar. M, Sarkar. A (2018). Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From en capsulation to bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology*. 71:155-169.

Arango, M. Quintero, P. Castiblanco, J. Montoya, G. (2013). Cell culture and cell análisis. J, Anaya. Y, Shenfeld. A, Rojas. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. (1st Ed.). Bogotá. El Rosario Univeristy Press.

Arantes. P, Santos. Q, Faria. Z, Santos. A, Cerqueira. C, Vazquez. Am Pereira. E, Ricci. E (2017) Promotion of cutaneous penetration of nifedipine for nanoemulsion. *Brzilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 53(2):e15249.

AppliChem (2010). Cell Proliferation Assay XTT. Recuperado de <https://www.applichem.com/en/literature/applications/no-12-cell-proliferation-assay-xtt/>. Consultado en 09-01-2019.

- Auh, J. Madhavan, J. (2021). Protective effect of a mixture of marigold and Rosemary extracts on UV-induced photoaging in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 135:111178.
- Azevedo, R. Andrade, S: Arantes, E. Rocha, P. Mafra, L. Ferrari, M. (2015). Production and Characterization of Cosmetic Nanoemulsions Containing *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill Extract as Moisturizing Agent. *Molecules*. 20(2):2492-2509.
- Babajanzadeh, B. Sherizadeh, S. Ranji, H. (2019). Detergents and surfactants. A brief Review. *Journal of Science*. 3(3):94-99.
- Bajpai, D. Tyagi, V. (2010), Nonionic Surfactants: An Overview. *Tenside Surfactants Detergents*. 47(3):190-196.
- Bamba. B, Shi. J, Tranchant. C, Xue. S, Forney. C, Lim. L, Xu. W, Xu. G (2020). Coencapsulation of Polyphenols and Anthocyanins from Blueberry Pomace by Double Emulsion Stabilized by Whey Proteins: Effect of Homogenization Parameters. *Molecules*. 23(10):2525.
- Bathia, S. Sharma, K. Sharma, A. Garg, A. Kumar, S. Purohit, A. (2011). Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount toll against ultra-violet irradiation. *Pharmacognosy Reviews*. 5(19):138-146.
- Bathia. N, Kishor. S, Katyal. N, Gogoi. P, Narang. P, Deep. S (2016). Effect of pH and temperatura on conformational equilibria and aggregation behaviour of curcumin in aqueous binaty mixture of etanol. *RSC advances*. 6(105):103275-103288.
- Becker, K. Hartmann, A. Ganzera, M. Fuchs, D. Gostner, J. (2016). Immunomodulatory Effects of the Mycosporine-Like Amino Acids Shinorine and Porphyra-334. *Marine Drugs*. 14:119.
- Benediktsdottir, B. Baldursson, O. Gudjonsson, T. Tonnesen, H. Masson, M. (2015). Curcumin, bismethoxycurcumin and dimethoxycurcumin complexed with cyclodextrins have structure specific effect on the paracellular integrity of lung epithelia *in vitro*. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 4:405-410.
- Bernardi. D, Pereira. T, Maciel. N, Bortoloto. J, Viera. G, Oliveira. G, Rocha. P (2011). Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *in vitro* and *in vivo* assessments. *Journal of Nanobiotechnology*. 9:44.
- Bias. A, Lucas. R, Bronma. J, Williamson. C, Sulzberger. B, Austin. A, Wilson. S, Andrad. A, Bernhard. G, Mckenzie. R, Aucamp (2018). Environmental effects of ozone depletion, UV radiation and interactions with climate change: UNEP environmental Effects Assessment Panel, update 2017. *Photochemical & Phobiological Sciences*. 17(2)127-179.

Bourbon, A. Raquel, F. Gonçalves, R. Vicente, A. Pinheiro, A. (2018). Characterization of Particle Properties in Nanoemulsion. S. Mahdi, D. MacClements. *Nanoemulsions: Formulation, Applications and Characterization*. (1st Ed.). United Kingdom. Academic Press.

Browne, S. Al-Rubeai, M. (2011). Defining viability in mammalian cell cultures. *Biotechnology Letters*. 33(9):1745-1749.

Brunning, A. (2019). Sunscreen and Coral Reef Damage. Recuperado de <https://cen.acs.org/content/dam/cen/97/28/WEB/09728-coralreefs.pdf>. Consultado en 26-04-2021.

Calò, R, Marabini, L (2014). Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UV-B-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 132:27-35.

Cancer.Net. (2019). Skin Cancer (Non-Melanoma): Risk Factors and Prevention. Recuperado de <https://www.cancer.net/cancer-types/skin-cancer-non-melanoma/risk-factors-and-prevention>. Consultado en 05-04-2021.

Carrasco, B. (2013). Metodologías para el aislamiento de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) en las macroalgas *Porphyra columbina* y *Chondracanthus chimassoi* para la aplicación en la industria farmacéutica. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología. Universidad San Sebastián. Chile.

Charpenter, C. Pizarro F. Navarro, N. (2016). Variación en la concentración de aminoácidos tipo micosporina en macroalgas de las regiones de Valparaíso y Magallanes. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 51(3):703-708.

Cho, B. Che, D. Shin, J. Kang, H. Kim, S. Choi, J. Kim, S. Jang, S. (2018). Photoprotective properties of combined extracts from *Diospyros lotus* leaves and *Curcuma longa* rizomas against chronic UVB-induced photodamage. *Journal of Food Biochemistry*. e12672.

Choi, Y. Yang, D. Kulkarni, A. Moh, S. Kim, K. (2015). Mycosporine-Like Amino Acids Promote Wound Healing through Focal Adhesion Kinase (FAK) Mitogen-Activated Protein Kinases (MAP Kinases) Signaling Pathway in Keratinocytes. *Marine Drugs*. 13:7055-7066.

Chrapusta, E, Kaminski, A, Duchnik, K, Bober, B, Adamski, M, Bialczyk, J (2017) Mycosporine-Like Aminoacids: Potential Health and Beauty Ingredients. 15(236):1-29.

Ciążyńska, M. Kamińska, G. Lesiak, A. (2021). The incidence and clinical análisis of non-melanoma skin cancer. *Scientific reports*. 11:4337.

Croda (2010). Brij Ethoxylated natural fatty alcohol for home care. Yorkshire, England. Croda Europe LTD.

Croda (2013). The HLB Sywstem: Croda's Time SAving Guide to Surfactant Selection. Yorkshire, England Croda Europe LTD.

Gibco (2020). TrypLE™ Express. Recuperado de https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FtrypLE_man.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogVHJ5cExFIEV4cHJlc3M=. Consultado en 15-04-2021.

Gonçalves. G, Da Silva. G, Barros. P, Srebernich. S, Shiraishi. C, Cammargos. V, Lasca. T (2014) Use of *Curcuma longa* in cosmetics: Extraction of curcuminoid pigments, development of formulations, and *in vitro* skin permeation studies. *50(4):885-894*.

Dalmazzone. C, Noik. C, Clausse. D (2009) Application of DSC Emulsified System Characterization. *Oil & Gas Science and Technology*. 64(5):545-555.

Dave, N. Joshi, T. (2017). A Concise Review on Surfactants and Its Significance. *International Journal of Applied Chemistry*. 13(3):663-672.

Delaney, S. Jarem, D. Volle, C. Yennie, C. (2012). Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. *46(4):420-441*.

D'Orazio. J, Jarrett. S, Amaro. A, Scott. T (2013) UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Science*. 14:12222-12248.

Gacesa. R, Barlow. D, Dunlap. W, Georgakopoulos. N, Wells. G, Long. P (2017) Mycosporine-like amino acid activation of the Keap1-Rrf2 pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 154:35-44.

Gheisari. S, Gavagsaz. R, Malaki. M, Safarpour. P, Zandi. M. (2018). Ultrasonic Nano-emulsification- A review. *Ultrasonic Sonochemistry*. 52:88-105.

Gómez, G. (2014). Formulación y caracterización de nano-emulsiones de aceite de parafina tipo agua-en-aceite (W/O). Tesis para optar al grado de Maestría en Ciencias en Nanotecnología. Centro de Investigación en Materiales Avanzados. Monterrey, México.

Han. Lu, Lu. K, Zhou. S, Qi. B, Li. Y (2022). Co-delivery of insulin and quercetin W/O/W double emulsions stabilized by different hydrophilic emulsifiers. *Food Chemistry*. 369(1):130918.

Hawaii State Legislature. (2021). A BILL FOR AN ACT RELATING TO SUNSCREENS. Recuperado de <https://www.capitol.hawaii.gov/session2021/bills/HB102 .HTM>. Consultado en 26-04-2021.

Halpern, A. Marghoob, A. Reiter, O. (2020). Melanoma Risk Factors: The Risks. The Causes. What You Can Do. Recuperado de <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/melanoma-causes-and-risk-factors/>. Consultado en 05-04-2021.

Heng. M (2017) Topical Curcumin: A review of MEchanisms and uses in dermatology. *International Journal of dermatology and clinical research*. 3(1):10-17.

Heo. S, Ko. S, Cha. S, Kang. D, Park. Hm Choi. Y, Kim. D, Jung. W, Jeon. Y (2009). Ffect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogénesis and their protective effect gainst photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicology In vitro*. 23:1123-1130.

Hernández, V. (2013). Estudio de la Reducción del Contenido de Sodio y Deshidratación del Alga Luche (*Porphyra* sp). Proyecto para optar al título de Ingeniería en Alimentos Universidad Austral de Chile.

Hirano, T. Morii, H. Nakashima, T. (2015). Instant Coffee and Protection against DNA Damage. T. Hirano. *Coffe in Health and Disease Prevention*. (1st Ed). 597-602. London. Academic Press.

Hwang. E, Thi. N (2014) Effects of Extraction and Processing Method son Antioxidant Compound Contents and Radical Scavenging Activities of Laver (*Porphyra tenera*). *Preventive Nutrition and Food Science*. 19(1):40-48.

Jablonski. N, Chaplin. G (2010) Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proceedings of the Natioal Academy of Sciences of the United States of America*. 107:8962-8968.

Hu. L, Shi. Y, Heng. L, Gao. N, Ji. J, Chen. Q, Yang. X, Wang. S. (2015). Enhancement of Oral Bioavailability of Curcumin by a Novel Solid Dispersion System. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 16(6):1327-1334.

Huovinen, P. Gómez, I. Lopez, F. Lovengreen, C. (2004). Ultraviolet-absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile (2004). *Botanica Marina*. 47(1):21-29.

Jiju, A. (2014). Fractional Factorial Designs. En A. Jiju, *Design of Experiments for Engineers and Scientists*. (2nd Ed). Londres. Elsevier.

Jofré, J. Celis, P. Figueroa, F. Navarra, N. (2020). Seasonal Variation of Mycosporine-Like Amino Acids in Three Subantarctic Red Seaweeds. *Marine Drugs*. 18(2):75.

Joung, H. Choi, M. Kim, J. Park, S. Park, H. Shin, G. (2016). Development of Food-Grade Curcumin Nanoemulsion and its Potential Application to Food Beverage System: Antioxidant Property and *In vitro* Digestion. *Journal of Food Science*. 81(3):745-753.

Kaul. S, Verma. D, Mukherjee. Sm Nagaich. U (2018) Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A review of recent advances. *Journal of Pharmaceutics*. V2018:3420204.

Khan. N, Ali. A, Khan. H, Khan. Zu, Ahmed. Z (2018). Stability Studies and Characterization of Glutathione-Loaded Nanoemulsion. *Journal of Cosmetical Science*. 69(4):257-267.

Kharat. M, Du. Z, Zhang. G, McClements. D (2017). Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(8):1525-1532.

Kim. E, Choo. W (2014) Stable Liquid Paraffin-in-water Nanoemulsions Prepared by Phase Inversion Composition Method. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 40:133-139.

Klimová, Z. Hojerová, J. Beránková, M. (2015). Skin Absorption and human exposure estimation of three widely discussed UV filters in sunscreens-*In vitro* study mimicking real-life consumer habits. *Food and Chemical Toxicology*. 83:237-250.

Korbee, N. Figueroa, F. Aguilera, J. (2006). Acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): Biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Revista Chilena de Historia Natural*. 79:119-132.

Korbee, N. Figueroa, F. Aguilera, J. (2006). Acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): Biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Revista Chilena de Historia Natural*. 79:119-132.

Kuanpradit, H. Jaisin, Y. Jungudomjaroen, S. Mitu. S, Puttikamonkul, S. Sobhon, P. Cummins, S. (2017). Attenuation of UV-B exposure-induced inflammation by abalones hypobranchial gland and gill extracts.

Larsson, P. Andersson, E. Johansson, U. Öllinger, K. Rosdahl, I. (2005). Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. *Experimental Dermatology*. 14(2):117-123.

Latha, M. Martis, J. Shobha, V. Sham, R. Bangera, S. Krishnakuttym B. Bellary, S. Varughese, S. Rao, P. Kumar, N. (2013). Sunscreening Agents. *Clinical and Aesthetic Dermatology*. 6:16-26.

Leister. N, Karbstein. H (2020). Evaluating the Stability of Double Emulsions-A review of the Measurement Techniques for the Systematic Investigation of Instability Mechanisms. *Colloids and interfaces*. 4(1):8.

Li, H. Gao, A. Jiang, N. Liu, Q. Liang, B. Li, R. Zhang, E. Li, Z. Zhu, H. (2016). Protective Effect of Curcumin Against Acute Ultraviolet B Irradiation induced Photo-damage. *Photochemistry and Photobiology*. 92:808-815.

Li, J. Uchida, T. Todo, T. Kitagawa, T. (2006). Similarities and Differences between Cyclobutane Pyrimidine Dimer PHotolyase and (6-4) Photolyase as Revealed by Resonance Raman Spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(35):25551-25559.

Liu. W, Sun. D, Li. C, Liu. Q, Xu. J (2006). Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsión inversión point method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 303(2):557-563.

Liu, K. Zhao, J. Yang, L. Guan, L. Yuan, L. Geng, Y. (2020). Protective effects of calbindin-D28K on the UVB radiatrion-induced apoptosis of human lens epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 45:1793-1802.

Luna. A, Román. J, González. M, Cózar. M, Rabasco. A, Motilva. V, Talero. E (2018). Fucoxanthin-Containing Cream Prevents Epidermal Hyperplasia and UVB-Induced Skin Erythema in Mice. *Marine Drugs*. 16(378):1-22.

Matta, M. Zusterzeel, R. Pilli, N. Patel, V. Volpe, D. Florian, J. Oh, L. Bashaw, E. Zineh, I. Sanabria, C. Kemp, S. Godfrey, A. Adah, S. Coelho, S. Wang, J. Furlong, L. Ganley, C. Michele, T. Strauss, D. (2019). Effect of Sunscreen Application Under Maximal Use Conditions on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 321(21):2082-2091.

McClements. S, McClements. D (2018) Nanoemulsion, Applications, and Characterization. (1 st Ed.) Academic Press, London.

Mehmood. T, Ahmed. A, Ahmad. A, Sheeraz. M, Abdullah. M (2018). Optimization of mixed surfactants-based β -carotene nanoemulsions using response Surface

methodology: An ultrasonic homogenization approach. Food Chemistry. 253: 179-184.

Mirmajidi, A, Abbasi, S (2015) Optimization of Ultrasonic emulsification conditions for the production of orange peel essential oil nanoemulsion. Journal of Food Science Technology. 52(5):2679-2689.

Mishra, M. Muthuprasanna, P. Prabha, K. Rani, P. Satish, A: Chandiran, S. Arunachalam, G. Shalini, S. (2009). Basics and Potential Applications of Surfactants- A review. International Journal PharmTech Research. 1(4):1354.1365.

Mitsuishi, Y. Motohashi, H. Yamamoto, M. (2012). The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. Frontiers in oncology. 2(200):1-13.

Miyamoto, K. Komatsu, M. Ikeda, H. (2014). Discovery of Gene Cluster for Mycosporine-Like Amino Acid Biosynthesis from *Actinomyces* Microorganisms and Production of a Novel Mycosporine-Like Amino Acid by Heterologous Expression. Applied and Environmental Microbiology. 80(15):5028-5036.

Mohamed, A. Hussein, I. Sultan, A. Al-Muntasheri, G. (2018). Use of organoclay as stabilizer for water-in-oil emulsions under high temperature high-salinity conditions. Journal of Petroleum Science and Engineering. 160:302-312.

Nanjwade, B, Varia, P, Kadam, V, Srichana, T, Kamble, M (2013). Development and Evaluation of Nanoemulsion of Repaglinide. JSM Nanotechnology and Nanomedicine. 1(2):1-8.

Narayanan, D. Saladi, R. Fox, J. (2010). Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. International Journal of Dermatology. 49(9):978-986.

Narla, S. Lim, H. (2020). Sunscreen: FDA regulation, and environmental and health impact. 19:66-70.

Nastiti, C. Ponto, T. Abd, E. Grice, J. Benson, H. Roberts, M. (2017). Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. Pharmaceutics. 9(4):37.

Ngan, C. Basri, M. Fang, L. Fard, H. Tripathy, M. Abedi, R. Abdul, E. (2014). Comparison of Box-Behnken and central composite designs in optimization of fullerene loaded palm-based nano-emulsions for cosmeceutical application. Industrial Crops and Products. 59:309-317.

Ngoennet, S. Nishikawa, Y. Hibino, T. Waditee, R. Kageyama, H. (2018). A Method for the Isolation and Characterization of Mycosporine-Like Amino Acids from Cyanobacteria. Methods and Protocols. 1(46):1-15.

Nishida, Y. Kumagai, Y. Michiba, S. Yasui, H. Kishimura, H. (2020). Efficient Extraction and Antioxidant Capacity of Mycosporine-Like Amino Acids from Red Alga Dulse *Palmaria palmata* in Japan. *Marine Drugs*. 18(10):502.

NIST/SEMATECH (2012). Central Composite DEsigns (CCD). Recuperado de <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm>. Consultado en 06-08-2021.

Noonan, F. Raza, M. Wolnicka, A. Anver, M. Bahn, J. Wielgus, A. Cadet, J. Douki, T. Mouret, S. Tucker, M. Popratiloff, A. Merlino, G. De Fabo, E. (2012). Melanoma Induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nature Communications*. 3:884.

Pandika, M. (2019). Common sunscreen ingredient octocrylene might be harmful to coral. Recuperado de [https://cen.acs.org/environment/water/Common-sunscreen-ingredient-octocrylene-might/97/web/2019/01#:~:text=January%2022%2C%202019&text=For%20the%20first%20time%2C%20researchers,metabolism%20at%20high%20concentrations%20\(Anal](https://cen.acs.org/environment/water/Common-sunscreen-ingredient-octocrylene-might/97/web/2019/01#:~:text=January%2022%2C%202019&text=For%20the%20first%20time%2C%20researchers,metabolism%20at%20high%20concentrations%20(Anal).

PanReac ApplieChem. (2021). Cell Proliferation Kit XTT. Recuperado de <https://itwreagents.com/unitedstates/es/product/cell+proliferation+kit+xtt/A8088>. Consultado en 26-01-2021.

Pasquali, R. Taurozzi, M. Bregni, C. (2008). Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. *International Journal of Pharmaceutics*. 365(2):44-51.

Petersen, A. Gniadecki, R. Vicanova, J. Thorn, T. Wulf, H. (2000). Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. 59(1-3):123-131.

Philips, J. Moore, T. Sonavane, K. Ekshyyan, O. McLarty, J. Nathan, C. (2013). Curcumin Inhibits UV Radiation-Induced Skin Cancer in SKH-1 Mice. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 148(5):797-803.

Pools, C. Owens, F. (2007). *Introducción a la Nanotecnología*. (1st Ed.). Barcelona. Editorial Reverté.

Porras, M. Solans, C. González, C. Martínez, A. Guinart, A. Gutiérrez, J. (2004). Studies of formation of W/O nano-emulsions. 24(1-3):115-118.

Reviadaran. R, Ng. M, Chandran. D, Ooi. K, Manickam. S (2021). Stable W/O/W multiple nanoemulsion encapsulating natural tocotrienols and caffeic acid with cisplatin synergistically treated cancer cell lines (A549 and HEP G2) and reduced

toxicity on normal cell line (HEK 293). *Materials Science & Engineering C*. 121:111808.

Ribeiro. R, Barreto. S, Ostrosky. E, da Rocha-Filho.P, Veríssimo. L, Ferrari. M (2015). Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill Extract as Moisturizing Agent. 20:2492-2509.

Rodrigues. I, Ramos. A, Falcao. D, Ferreira. J, Basso. S, Rocha. J, Amaral. A (2018) Development of Nanoemulsions to Enhance the Antileishmanial Activity of *Copaifera paupera* Oleoresins. *Biomedical REsearch*. 1:1-9.

Rosic, N. (2019). Mycosporine-like Amino Acids: Making the Foundation for Organic Personalised Sunscreens. *Marine Drugs*. 17(683):1-17.

Ruszkiewicz, J. Pinkas, A. Ferrer, B. Peres, T. Tsatsakis, A. Aschner, M. (2017). Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. *Toxicological Reports*. 4:245-259.

Ryu. J, Park. S, Kim. I, Choi. Y, Nam. T (2014) Protective effect of pophyra-334 on UVA-induced photoaging in human skin fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*. 34:796-803.

Sari. T, Mann. B, Kumar. R, Singh. R, Sharma. R, Bhardwaj. M, Athira. S (2014) Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. 43:540-546.

Saari. N, Chua. L, Hasham. R (2020). Optimization of curcumin-Loaded Coconut Oil and Honey Nanoemulsion for Better Skin Permeation. *International Journal of Nanoscience*. 19(06):2050006.

Sample, A: He, Y. (2018). Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*. 34(1):13-24.

Sawant. K, Mundada, V, Patel. V (2017). Development and Optimization of w/o/w Multiple Emulsion of Lisinopril Dihydrate Using Plackett Burman and Box-Behnken Designs. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. 8(1):1000422.

Schmidts. T, Dobler. D, Guldán. A, Paulus. N, Runkel. F (2010) Multiple W/O/W Emulsions-Using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 372(1-3):48-54.

Sahu. A, Bothara. S (2015) Formulation and Evaluation of Self-microemulsifying drug delivery system of Curcumin for enhanced solubility and dissolution.

Salager, J. (2002). Surfactantes: Tipos y usos (2da Ed.). Mérida, Venezuela. Laboratorio FIRP.

Saewan. N, Jimtaisong. A (2015) Natural products as photoprotection. Journal of cosmetic Dermatology. 0:1-17.

Seethacheewakul. S, Mahattanadol. S, Phandoongsombut. N, Pichayakorn. W, Wiwattanapatapee. R (2010). Development and evaluation of self-microemulsifying liquid and pellet formulations of curcumin, and absorption studies in rats. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 76(3):475-485.

Seo, M. Kang, T. Lee, C. Lee, A. Noh, M. (2012). HaCaT Keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope-associated genes to T Helper cell cytokines. Biomolecules & Therapeutics. 22(2):171-176.

Shehzad, A. Lee, Y. (2013). Molecular mechanisms and uses in dermatology. International Journal of dermatology and clinical research. 3(1):10-17.

Sheth, T. Seshadri, S. Prileszky, T. Helgeson, M. (2020). Multiple nanoemulsiones. Nature Reviews. 5:214-228.

Silva. F (2019). Evaluación *in vitro* del potencial foto-protector de extractos del alga *Pyropia columbina* (Luche) ricos en amino ácidos tipo microsporina. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología. Universidad San Sebastián. Chile.

Sood. S, Jain. Km Gowthamarajan. K (2014) Optimization od curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assesment. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 113:330-337.

Souzzi, K. Turban, J. Girardi, M. (2020). Cutaneous Photoprotection: A Review of the Current Status and Evolving Strategies. Yale Journal of Biology And Medicine. 93:55-67.

Spencer, E. Dunlap, W. Shick, J. Long, P. (2012). Redundant Pathways of sunscreen Biosynthesis in Cyanobacterium. 13(4):531-533.

Statgraphics. (2006). Diseño de Experimentos-Diseño de Superficie de Respuesta. Recuperado de <http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE%20-%20Diseno%20de%20Superficies%20de%20Respuesta.pdf>. Consultado en 05-08-2021.

Stoddart, M. (2011). Cell viability assays: Introduction. M. Stoddart. *Mammalian cell viability*. (1st Ed.). pp.1-6. Berlin. Springer.

Syed, H. Peh, K. (2014). Identification of phases of various oil, surfactant/co-surfactants and water system by ternary phase diagram. 71(2):303-309.

Tang, S, Sivakumar. M (2012). Design and evaluation of aspirin-loaded water-in-oil-in-water submicron multiple emulsions generated using two-stage ultrasonic cavitation emulsification technique. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering. 7:145-156.

Taylor, J. Rosen, C. (2020). Systemic Photoprotection. Current Dermatology Reports. 16(1):8-15.

Yang, S. Han, T. Choi, E. (2012) The protective effect of laver extract against the UV-A and UVB-induced damage in HaCaT cells. Toxicology and Environmental Health Sciences. 4(3):186-193.

Yildirim, M. Sumnu, G. Sahin, S. (2017). The effects of emulsifier type, phase ratio, and homogenization methods on stability of the double emulsion. Journal of Dispersion Science and Technology. 38(6):807-814.

Yoo. H, Lee. B, Kim. W, Lee. J, Kim. G, Chu. O, Koo. S, Kim. D (2014) *Lithospermum erythrorhizon* Extract Protects Keratinocytes and Fibroblast Against Oxidative Stress. Journal of Medicinal Food. 0 (00):1-8.

Young, A. Claveau, J. Rossi, A. (2016). Ultraviolet radiation and the skin:Photobiology and sunscreen photoprotection. Journal of the American Academy of Dermatology. 76(3):S100-S109.

Yu, L. Li, C. Xu, J. Hao, J. Sun, D. (2012). Highly Stable Concentrated Nanoemulsions by Phase Inversion Composition Method at Elevated Temperature. Langmuir. 28(41):14547-14552.

Yukuyama. M, Ghisleni. D, Pinto. T, Bou. N (2016) Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics-a review. International Journal of Cosmetic Science. 38:13-24.

Verri, W. Vicentini, F. Baracat, M. Georgetti, S. Cardoso, R. Cunha, T. Ferreira, S. Cunha, F. Fonseca, M. Casagrande, R. (2012). Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms. W, Verri. *Studies in Natural Products Chemistry: Bioactives Natural Products Volume 36*. (1st Ed.). Gran Bretaña. Elsevier.

Wang, X. Lu, X. Wen, L. Yin, Z. (2018). Incomplete phase inversion W/O/W emulsion and formation mechanism from an interfacial perspective. Journal of Dispersion Science and Technology. 39(1):122-129.

Wang, J, Shi, A, Agyei, D, Wang, Q (2017). Formulation of wáter-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions containing *tras-resveratrol*. Royal Society of Chemistry Advances. 7:35917-35927.

Wang, C: Wang, S. Xia, Q. He, W. Yin, J. Fu, P. Li, J. (2013). Phototoxicity oz Zinc Oxide Nanoparticles in HaCaT Keratinocytes-Generation of Oxidative DNA Damage During UVA and Visible Light Irradiation. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 13:3880-3888.

World Cancer Research Fund. (2017) The associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Skin cáncer. Recuperado de <https://www.wcrf.org/sites/default/files/Skin-cancer-slr.pdf>. Consultado en 03-01-2019.

World Health Organization (2002) Global Solar UV Index: A Practical Guide. Ginebra. WHO Library. Recuperado de <https://www.who.int/uv/publications/en/UVIGuide.pdf>. Consultado en 02-01-2019.

World Health Organization (2018) Ultraviolet radiation (UV). Recuperado de https://www.who.int/uv/uv_and_health/en/. Consultado en 03-01-2019.

World Health Organization (2018) Ultraviolet Radiation: Skin Cancers. Recuperado de <https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. Consultado en 05-01-2018.

World Health Organization (2018) Ultraviolet radiation: The Known health effects of UV. Recuperado de <https://www.who.int/uv/faq/uvhealthfac/en/index1.html>. Consultado en 05-01-2018.

Zhang, Z, Tashiro, Y, Matsukawa, S, Ogawa, H (2005). Influence of pH and temperatura on the ultraviolet-absorbing properties of porphyra-334. Fisheries Science. 71:1382-1384.

Zetasizer (2013). Zetasizer Nano User Manual. Recuperado de <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf>. Consultado en 11-04-2021.

CAPÍTULO 8

ANEXOS

Anexo. 8.1. Estudios previos: Diseño experimental para la extracción de MAAs desde *P. columbina*.

La metodología de superficie respuesta es una herramienta estadística utilizada para determinar y optimizar las variables críticas dentro de un proceso cuantificable. Silva (2019) utilizó el diseño Box-Behnken (BBD) para optimizar la extracción MAAs desde el alga *P. columbina*. En particular, BBD permite estudiar la interacción de factores generando un arreglo cuadrado situando la mayoría de los puntos experimentales en los vértices y aristas de la región experimental (Statgrpahics. 2006). Las variables utilizadas fueron pH (4-10), tiempo (0.5-3 horas) y temperatura (4-45°C). Las cuales generaron 12 puntos experimentales más 3 puntos centrales. Se determinó que las condiciones ideales de extracción son pH=4 (solvente de extracción), temperatura 28°C y 3 horas para el tiempo de extracción (Figura 8.1). Los solventes de extracción fueron los *buffer* acetato, fosfato y bicarbonato para alcanzar el pH de cada punto experimental (Tabla 8.1).

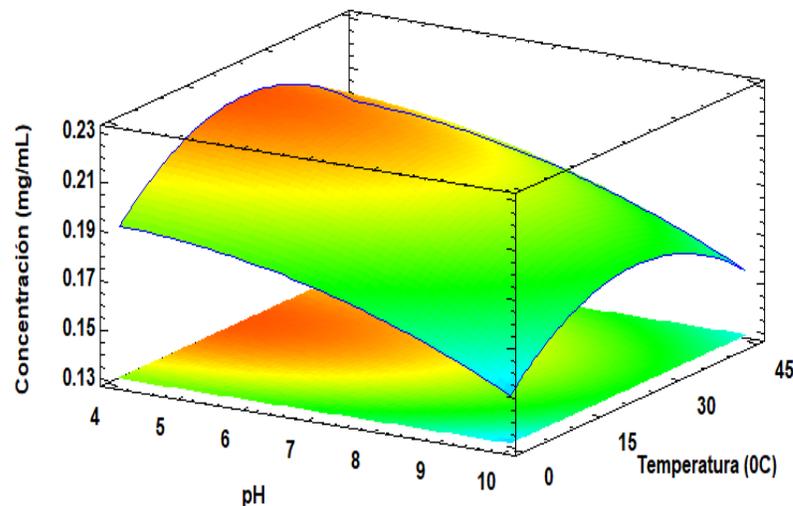


Figura 8.1. Superficie respuesta obtenido mediante BBD. Se observan las variables independientes pH y temperatura de extracción. La variable respuesta es concentración de MAAs (mg/mL).

La cuantificación de las MAAs se realizó mediante HPLC. Para esto, el área total de los cromatogramas se relacionó con el estándar micosporina-serinol ($\lambda_{\text{máx}}$ 310 nm). Los puntos experimentales y la concentración total de MAAs que permitieron optimizar la extracción se observa en la tabla 8.1.

Tabla 8.1. Puntos experimentales de BBD para la optimización en la extracción de MAAs desde *P. columbina*.

Corrida	pH	Tiempo (hrs)	Temperatura (°C)	Concentración (mg MAAs/mL)
1	4	1.5	4	0.189±0.022
2	7	0.5	4	0.191±0.012
3	10	1.5	4	0.146±0.020
4	7	3	4	0.182±0.013
5	4	0.5	24	0.212±0.009
6	4	3	24	0.219±0.019
7	7	1.5	24	0.187±0.014
8	7	1.5	24	0.213±0.014
9	7	1.5	24	0.193±0.014
10	10	0.5	24	0.175±0.008
11	10	3	24	0.184±0.002
12	4	1.5	45	0.194±0.004
13	7	0.5	45	0.177±0.004
14	7	3	45	0.190±0.001
15	10	1.5	45	0.139±0.002

Anexo 8.2. Curva de calibrado P-334 mediante HPLC

Tabla 8.2. Concentración de estándar P-334 y área cromatográfica.

Concentración (µg/mL)	Área 1 (mAU)	Área 2 (mAU)	Área 3 (mAU)	Promedio
100	12858.4	13259	15505	13874.133
50.000	6789.07616	7195.4248	6426.99609	6803.8324
25.000	3293.70313	3524.94385	3351.72119	3390.1227
12.500	1773.48328	1827.95532	1679.51636	1760.3183
6.250	911.15302	943.92523	886.49695	913.8584
3.125	481.68732	504.28421	441.34662	475.77272
1.563	256.60992	270.28067	211.12308	246.00456
0.781	146.59436	146.12657	113.21651	135.31248
0.391	73.43855	73.43855	57.2205	68.670603
0.195	34.00864	34.00864	28.10302	28.10302
0.098	20.19524	20.19524	14.82275	14.82275

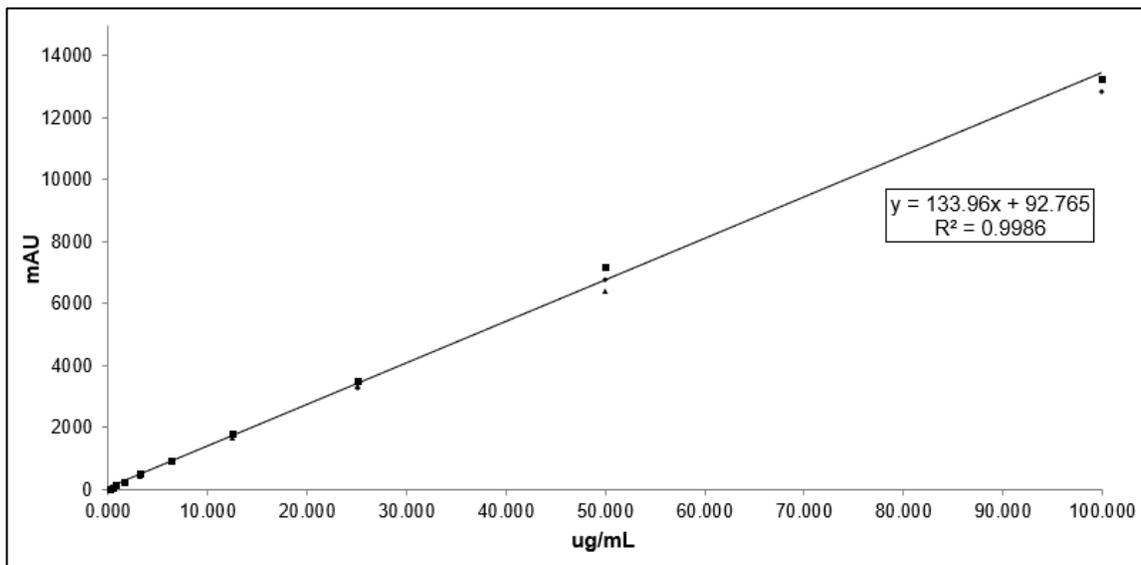


Figura 8.2. Curva calibrado P-334.

La ecuación de la curva corresponde a $y=133.96x+92.765$, donde y es el área del cromatograma y x es la concentración en µg/mL. El límite de detección y cuantificación son 1.464 y 4.361 µg/mL, respectivamente.

Anexo 8.3. Diseño central compuesto para la formulación de nanoemulsión W/O

Tabla 8.3. Puntos experimentales del diseño central compuesto con respectivos factores y variables respuesta.

Exp. No	%Surf.	HLB	%Extracto	Tiempo (min)	Bloque	Tamaño (nm)	Polidispersidad
1	15	7	3	3	1	526.7	0.514
2	7	8	3	3	1	50.47	0.319
3	7	7	8	3	1	158.47	0.442
4	15	8	8	3	1	470.8	0.392
5	7	7	3	10	1	430.4	1
6	15	8	3	10	1	578	0.724
7	15	7	8	10	1	234.3	1
8	7	8	8	10	1	74.46	0.226
9	11	7.5	5.5	6.5	1	388.4	1
10	11	7.5	5.5	6.5	1	818.2	0.787
11	11	7.5	5.5	6.5	1	558	1
12	7	7	3	3	2	453.7	0.95
13	15	8	3	3	2	494.3	0.568
14	15	7	8	3	2	114.7	0.15
15	7	8	8	3	2	21.04	1
16	15	7	3	10	2	1084	0.673
17	7	8	3	10	2	29.05	0.563
18	7	7	8	10	2	630.8	0.736
19	15	8	8	10	2	34.74	0.142
20	11	7.5	5.5	6.5	2	852.7	1
21	11	7.5	5.5	6.5	2	693.3	1
22	11	7.5	5.5	6.5	2	306.1	0.447
23	3	7.5	5.5	6.5	3	450.5	1
24	19	7.5	5.5	6.5	3	222.8	1
25	11	6.5	5.5	6.5		633.3	1
26	11	8.5	5.5	6.5	3	37.65	0.221
27	11	7.5	0.5	6.5	3	641.3	1
28	11	7.5	10.5	6.5	3	369.8	0.234
29	11	7.5	5.5	0	3	636.4	0.902
30	11	7.5	5.5	13.5	3	793.9	0.215
31	11	7.5	5.5	6.5	3	987.4	1
32	11	7.5	5.5	6.5	3	902.2	0.612
33	11	7.5	5.5	6.5	3	44.63	-

Anexo 8.4. Puntos experimentales para el diseño factorial fraccionado para la formulación de una nanoemulsión doble

Tabla 8.4. Puntos experimentales para el diseño factorial fraccionado con respectivos factores y variables respuesta.

No.	Surfactante (%)	Amplitud (%)	Tiempo (s)	HLB	Tamaño (nm)	Polidispersidad
1	8	40	30	11.5	450	0.466
2	12	40	30	12.5	327	0.180
3	8	90	30	12.5	365	0.373
4	12	90	30	11.5	339	0.393
5	8	40	120	12.5	176.8	0.171
6	12	40	120	11.5	261	0.433
7	8	90	120	11.5	121.6	0.253
8	12	90	120	12.5	91.5	0.464
9	10	65	75	12	115.2	0.378
10	10	65	75	12	71.8	0.326
11	10	65	75	12	71.4	0.334

Anexo 8.5. Listado de coeficientes para tamaño de glóbulo y polidispersidad.

Tabla 8.5. Listado de coeficientes para tamaño de glóbulos.

Size	Coeff.Sc	Std. Err.	P	Conf. Int (±)
Constant	217.3	34.8823	0.000791373	85.3544
%surf.	-10.6101	36.5848	0.781567	89.5205
Amplitud	-33.2839	36.5848	0.398015	89.5205
Tiempo	-92.808	36.5848	0.0442722	89.5205
HLB	-23.6241	36.5848	0.542343	89.5205
N=11	Q2 =	0.032	Cond. No. =	1.0488
DF=6	R2 =	0.564	Y-miss =	0
Comp.=2	R2 Adj. =	0.273	RSD =	115.6914
			Conf. Lev. =	0.95

**Coeficientes escalados y centrados.*

Tabla 8.6. Listado de coeficientes para polidispersidad.

PDI	Coeff.Sc	Std. Err.	P	Conf. Int (±)
Constant	0.342791	0.0343963	5.90581e-005	0.0741653
%surf.	0.0231992	0.0360751	0.54395	0.0882734
Amplitud	0.0259943	0.0360751	0.498279	0.0882734
Tiempo	-0.01023	0.0360751	0.786267	0.0882734
HLB	-0.0398579	0.0360752	0.311546	0.0882734
N=11	Q2 =	0.000	Cond. No. =	1.0488
DF=6	R2 =	0.271	Y-miss =	0
Comp.=2	R2 Adj. =	-0.214	RSD =	0.1141
			Conf. Lev. =	0.95

**Coeficientes escalados y centrados.*

Anexo 8.6. Tablas ANOVA para modelo tamaño de glóbulo y polidispersidad

Tabla 8.7. ANOVA para tamaño de glóbulo obtenido para modelo lineal.

Size	DF	SS	MS (variance)	F	P	SD
Total	11	703637	63967			
Constant	1	519412	519412			
Total Corrected	10	184225	18422.5			135.73
Regression	4	103918	25979.5	1.94102	0.223	161.182
Residual	6	80307	13384.5			115.691
Lack of Fit	4	79039.6	19759.9	31.1821	0.031	140.57
Pure Error	2	1267.39	633.693			25.1733
	N=11	Q2 =	0.032	Cond.	0.0488	
	DF=6	R2 =	0.564	Y-miss=	0	
	Comp.=2	R2 Adj =	0.273	RSD=	115.6914	

Tabla 8.8. ANOVA para polidispersidad obtenido para modelo lineal.

PDI	DF	SS	MS (variance)	F	P	SD
Total	11	1.39972	0.127247			
Constant	1	1.29256	1.29256			
Total Corrected	10	0.107157	0.0107157			0.103517
Regression	4	0.0290721	0.00726801	55847	0.702	0.0852526
Residual	6	0.0780849	0.0130142			0.11408
Lack of Fit	4	0.0765169	0.0191292	24.3995	0.040	0.138308
Pure Error	2	0.001568	0.000784			0.028
	N=11	Q=	0.000	Cond.	1.0488	
	DF=6	R2=	0.271	Y-miss=	00	
	Comp.=2	R2 Adj=	-0.214	RSD=	0.1141	

Anexo 8.7. Listado de coeficientes para tamaño de glóbulo y polidispersidad.

Tabla 8.9. Lista de coeficientes para tamaño de glóbulo con interacción cuadrática de tiempo.

Size	Coeff.Sc	Std. Err.	P	Conf. Int (±)
Constant	86.133	24.950	0.018	64.136
%surf.	-10.610	13.666	0.473	35.129
Amplitud	-33.284	13.666	0.059	35.129
Tiempo	-92.808	13.666	0.001	35.129
HLB	-23.624	13.666	0.144	35.129
Tiempo*Tiempo	144.283	23.405	0.002	60.165
N=11	Q2 =	0.691	Cond. No. =	3.556
DF=6	R2 =	0.949	Y-miss =	0
Comp.=2	R2 Adj. =	0.899	RSD =	43.215
			Conf. Lev. =	0.95

*Coeficientes escalados y centrados.

Tabla 8.10. Lista de coeficientes para polidispersidad con interacción cuadrática de tiempo.

PDI	Coeff.Sc	Std. Err.	P	Conf. Int (±)
Constant	0.346	0.072	0.004	0.185
%surf.	0.023	0.039	0.583	0.101
Amplitud	0.026	0.039	0.539	0.101
Tiempo	-0.010	0.039	0.806	0.101
HLB	-0.039	0.039	0.359	0.101
Tiempo*Tiempo	-0.003	0.068	0.960	0.173
N=11	Q2 =		Cond. No. =	3.556
DF=6	R2 =		Y-miss =	0
Comp.=2	R2 Adj. =		RSD =	0.125
			Conf. Lev. =	0.95

*Coeficientes escalados y centrados.

Anexo 8.8. Tablas ANOVA para modelo cuadrático de tamaño de glóbulo y polidispersidad

Tabla 8.11. ANOVA para tamaño de glóbulo obtenido para modelo cuadrático.

Size	DF	SS	MS (variance)	F	P	SD
Total	11	703637	63967			
Constant	1	519412	519412			
Total Corrected	10	184225	18422.5			135.73
Regression	5	174887	34977.5		0.003	187.023
Residual	5	9337.61	1867.52			43.2148
Lack of Fit	3	8070.22	2690.07		0.197	51.8659
Pure Error	2	1267.39	633.693			.25.1733
	N=11	Q2 =	0.691	Cond. No.	3.5563	
	DF=5	R2 =	0.949	Y-miss=	0	
	Comp.=2	R2 Adj =	0.899	RSD=	43.2148	

Tabla 8.12. ANOVA para polidispersidad obtenida para modelo cuadrático.

PDI	DF	SS	MS (variance)	F	P	SD
Total	11	1.39972	0.127247			
Constant	1	1.29256	1.29256			
Total Corrected	10	0.107157	0.0107157			0.103517
Regression	5	0.0291145	0.00582291	0.37306	0.848	0.076308
Residual	5	0.0780425	0.0156085			0.124934
Lack of Fit	3	0.0764745	0.0254915	32.5147	0.030	0.159661
Pure Error	2	0.001568	0.00784			0.028
	N=11	Q2 =	0.000	Cond. No.	3.5563	
	DF=5	R2 =	0.272	Y-miss=	0	
	Comp.=2	R2 Adj =	-0.457	RSD=	0.1249	

Anexo 8.9. Tabla de comparaciones múltiples para nanoemulsiones expuestas a diferentes temperaturas durante cuatro semanas: 0.1 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.

Tabla 8.13. Test de comparaciones múltiples de Dunnett's para tamaño de glóbulo. Nanoemulsión 0.1 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.

Number of families			1					
Number of comparison per family			3					
Alpha			0.05					
Dunnet's multiple comparison test	Mean Diff.	95% CI of Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-	Temperatura	
Inicio vs 4	- 22.53	- 55.50 to 10.43	No	Ns	0.1913	B	4	
Inicio vs Ambiente	- 39.57	- 72.63 to - 6.703	Yes	*	0.0213	C	Ambiente	
Inicio vs 45	44.36	11.40 to 77.32	Yes	*	0.0119	D	45	
Test Details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of Diff	N1	N2	Q	DF
Inicio vs 4	74.60	97.13	-22.53	11.45	3	3	1.969	8
Inicio vs Ambiente	74.60	114.3	-39.67	11.45	3	3	3.465	8
Inicio vs 45	74.60	30.24	44.36	11.45	3	3	3.875	8

Tabla 8.14. Test de comparaciones múltiples de Dunnett's para polidispersidad. Nanoemulsión 0.1 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.

Number of families			1					
Number of comparison per family			3					
Alpha			0.05					
Dunnet's multiple comparison test	Mean Diff.	95% CI of Diff.	Significant ?	Summary	Adjusted P Value	A-	Temperatura	
Inicio vs 4	-0.0337	-0.1745 to 0.1071	No	Ns	0.8318	B	4	
Inicio vs Ambiente	0.0938	-0.4699 to 0.2346	No	Ns	0.2054	C	Ambiente	
Inicio vs 45	0.0679	-0.07286 to 0.2087	No	Ns	0.4170	D	45	
Test Details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of Diff	N1	N2	Q	DF
Inicio vs 4	0.1558	0.189	-0.03373	0.04889	3	3	0.6900	8
Inicio vs Ambiente	0.1558	0.062	0.09380	0.04889	3	3	1.919	8
Inicio vs 45	0.1558	0.0878	0.06793	0.04889	3	3	1.390	8

Anexo 8.10. Tabla de comparaciones múltiples para nanoemulsiones expuestas a diferentes temperaturas durante cuatro semanas: 0.3 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.

Tabla 8.15. Test de comparaciones múltiples de Dunnett's para tamaño de glóbulo. Nanoemulsión 0.3 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.

Number of families			1					
Number of comparison per family			3					
Alpha			0.05					
Dunnet's multiple comparison test	Mean Diff.	95% CI of Diff.	Significant ?	Summary	Adjusted P Value	A-	Temperatura	
Inicio vs 4	-17.97	-36.96 to 4.026	No	Ns	0.1093	B	4	
Inicio vs Ambiente	-92.60	-114.9 to -70.94	Yes	****	<0.0001	C	Ambiente	
Inicio vs 45	36.60	14.61 to 58.59	Yes	**	0.0035	D	45	
Test Details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of Diff	N1	N2	Q	DF
Inicio vs 4	74.67	92.63	-17.97	7.637	3	3	2.353	8
Inicio vs Ambiente	74.67	167.6	-92.93	7.637	3	3	12.17	8
Inicio vs 45	74.67	38.07	36.60	7.637	3	3	4.792	8

Tabla 8.16. Test de comparaciones múltiples de Dunnett's para polidispersidad. Nanoemulsión 0.3 mg curcumina/g formulación y fase acuosa interna proveniente de extracto liofilizado y reconstituido en 2 mL de agua desionizada.

Number of families			1					
Number of comparison per family			3					
Alpha			0.05					
Dunnet's multiple comparison test	Mean Diff.	95% CI of Diff.	Significant ?	Summary	Adjusted P Value	A-	Temperatura	
Inicio vs 4	0.006633	-0.01813 to 0.03139	No	Ns		B	4	
Inicio vs Ambiente	0.03413	0.009373 to 0.05889	Yes	*		C	Ambiente	
Inicio vs 45	-0.02753	-0.05229 to -0.002773	Yes	*		D	45	
Test Details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of Diff	N1	N2	Q	DF
Inicio vs 4	0.07917	0.07253	0.006633	0.008598	3	3	0.7715	8
Inicio vs Ambiente	0.07917	0.04503	0.03413	0.008598	3	3	3.970	8
Inicio vs 45	0.07917	0.1067	-0.02753	0.008598	3	3	3.202	8

Anexo 8.11. Mediciones de FT-IR para nanoemulsión W/O y respectivos controles

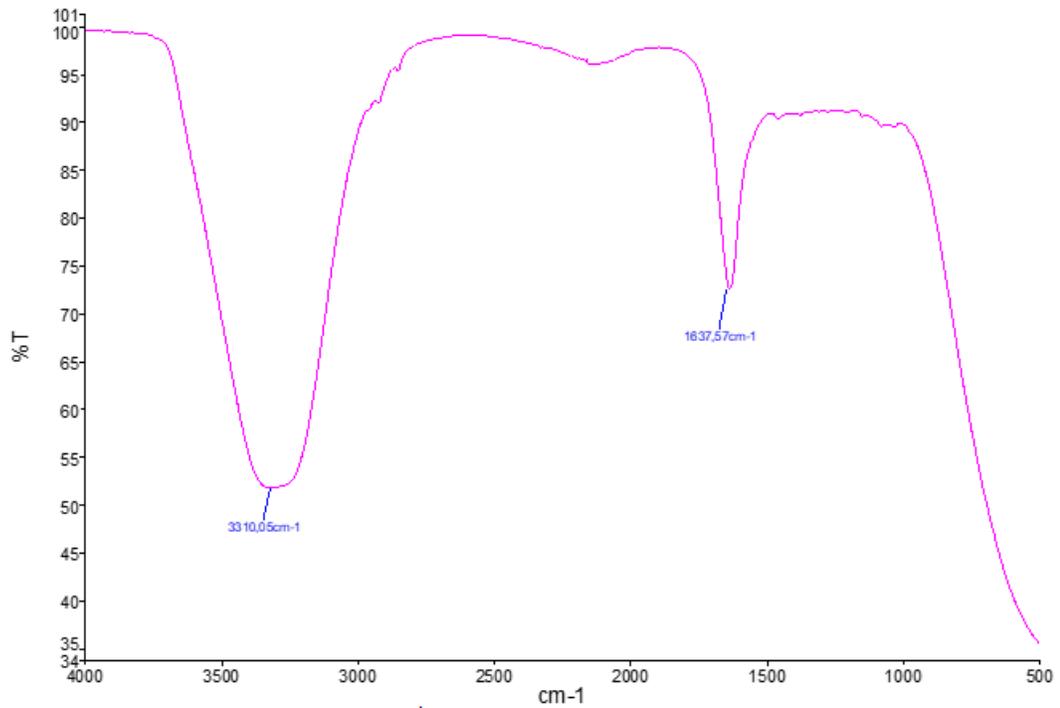


Figura 8.3. Espectro de FTIR para extracción de alga Luche. Peaks 1637.57 y 3310.05 cm^{-1} .

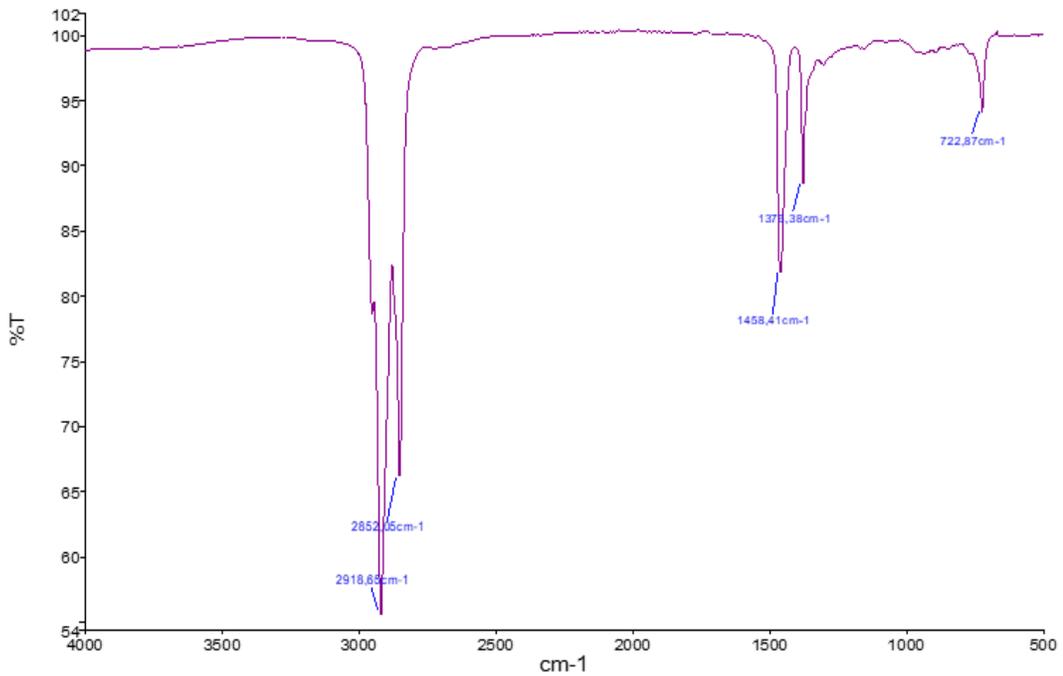


Figura 8.4. Espectro de FTIR para Aceite mineral Pesado. Peaks en 722.87, 1376.78, 1458.41, 2852.05 y 2918.65 cm^{-1} .

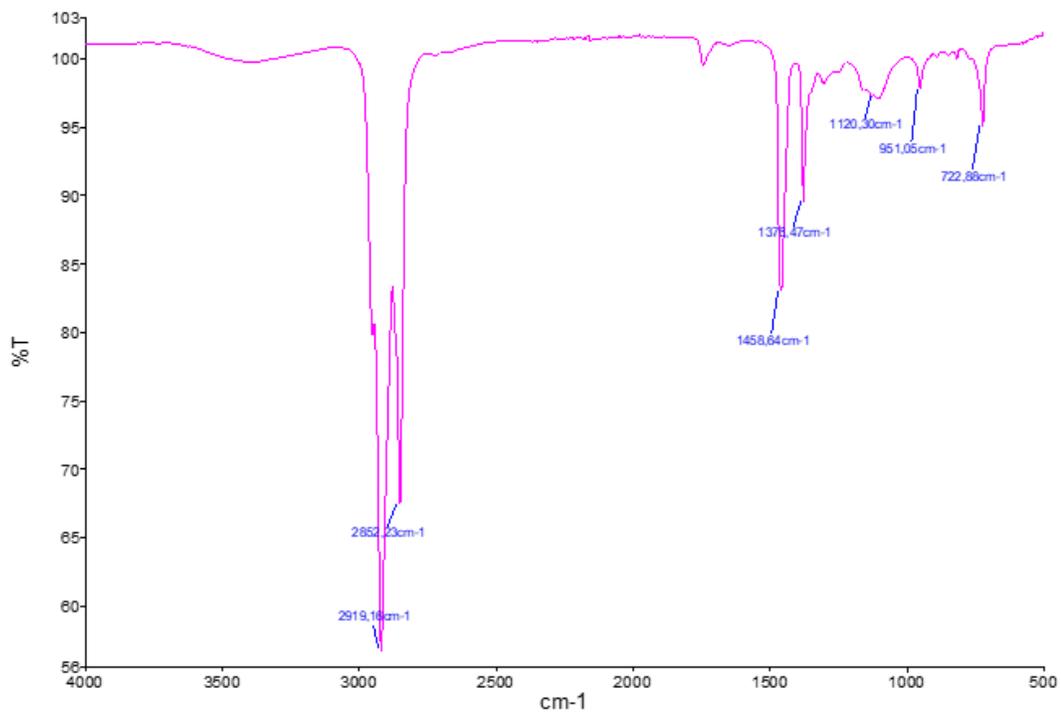


Figura 8.5. Espectro FTIR para aceite mineral y surfactantes Tween80/Span80. Se identifican los Peaks 722.88, 951.05, 1120.30, 1376.47, 1458.64, 2852.23 y 2919.18 cm⁻¹.

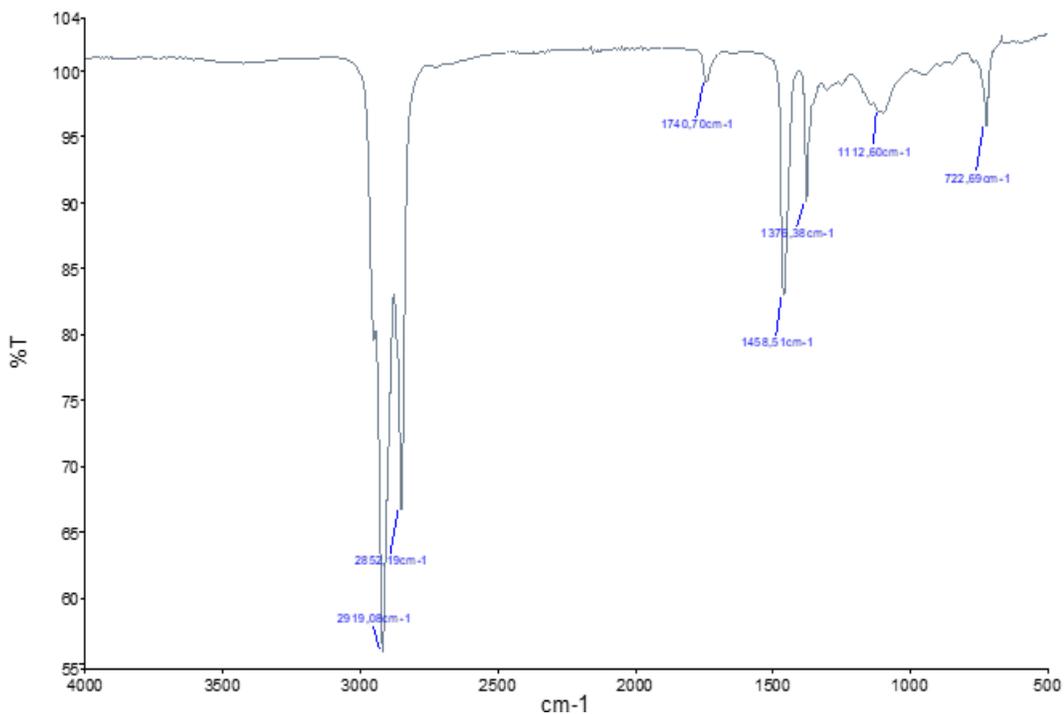


Figura 8.6. Espectro FTIR para aceite mineral, surfactantes Tween80/Span80 y curcumina. Se identifican los Peaks 722.69, 1112.60, 1376.38, 1458.51, 1740.70, 2852.19 y 2919.08 cm⁻¹.

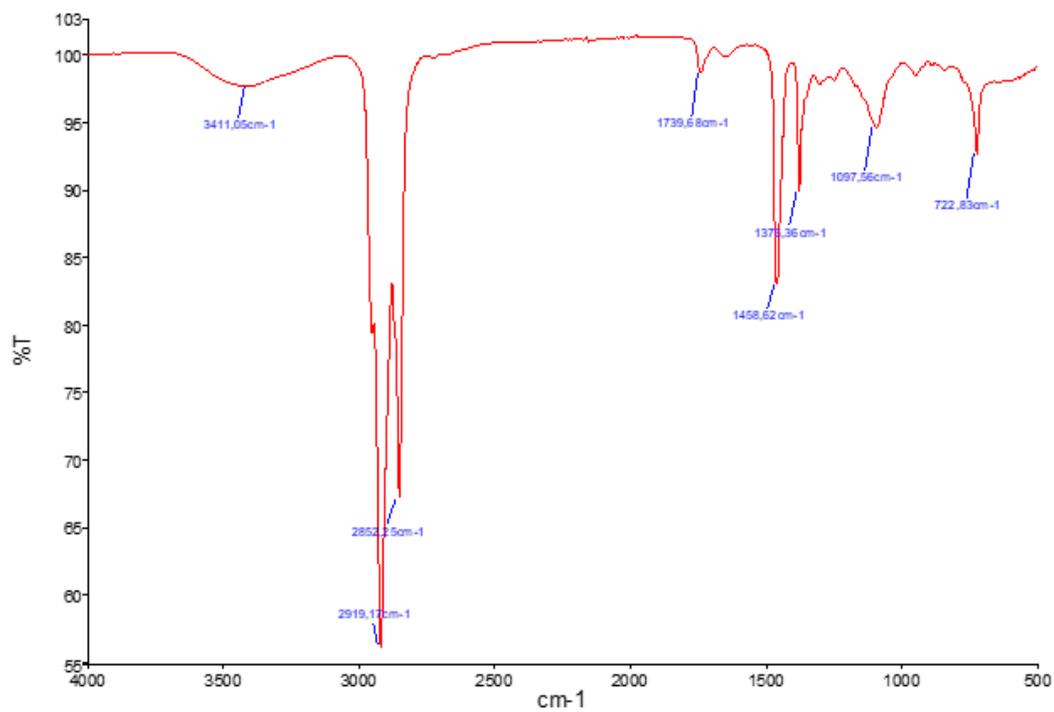


Figura 8.7. Espectro FTIR para Nanoemulsión W/O que contiene los compuestos activos. Se identifican los Peaks 722.83, 1097.56, 1376.38, 1458.62, 1739.68, 2852.25, 2919.17 y 3522.05 cm^{-1} .

Anexo 8.12. Revisión “Una visión actualizada sobre la síntesis, escalado y aplicaciones de las nanoemulsiones dobles”

A continuación, se adjunta la revisión presentada a la revista Entre Ciencia e Ingeniería. Esta revista pertenece a la Universidad Católica de Pereira (Colombia) y se encuentra indexada en WoS (Web of Science) a través del índice Emerging Source Citation Index (ESCI).

Una visión actualizada sobre la síntesis, escalado y aplicaciones de las nanoemulsiones dobles

An updated overview about the synthesis, scaling-up and applications of double nanoemulsions

F. A. Silva & P. A. Oyarzún

Recibido: enero 21 de 2021 – Aceptado: noviembre 15 de 2021

Resumen— Las nanoemulsiones son sistemas emulsionados de tamaño nanométrico. Estas pueden ser producidas mediante diversos métodos, los cuales se pueden clasificar como métodos de baja y alta energía. La disminución en el tamaño de glóbulo formado permite que estas puedan penetrar con mayor facilidad diferentes barreras como la piel o la barrera gastrointestinal. De este modo la encapsulación de compuestos activos a través de nanoemulsiones permite mejorar su biodisponibilidad. Además de ofrecer protección frente a factores ambientales como temperatura, humedad o radiación UV. Asimismo, es posible formular nanoemulsiones dobles con el fin de encapsular moléculas de naturaleza hidrofílica y lipofílica en un solo glóbulo. Este proceso de formación requiere un análisis integral que incluye aproximaciones físicas y termodinámicas.

Palabras clave— Nanoemulsión, Nanoemulsión doble, Microemulsión, emulsificación, emulsión sub-micrométrica

Abstract— Nanoemulsions are nano-sized emulsified systems. They can be produced by different methods, which can be classified as low and high energy methods. The decrease in the size of formed globules allows them to penetrate different barriers such as the skin or the gastrointestinal barrier. Thus, the encapsulation of active compounds through nanoemulsions makes it possible to improve their bioavailability and to offer protection against environmental conditions such as temperature, humidity, or UV radiation. In the same way, it is possible to formulate double nanoemulsions to encapsulate hydrophilic and lipophilic molecules in one single globule. Their formulation process requires a comprehensive analysis involving physical and thermodynamic approaches.

Keywords— Nanoemulsion, Double Nanoemulsion, Microemulsion, emulsification, sub-micrometric emulsion

¹Producto derivado del proyecto de investigación FONDEF VIU18E0030, apoyado por la Universidad San Sebastián sede Tres Pascualas, Concepción., y el laboratorio de Nanobiotecnología y optoelectrónica (USS)

F. A. Silva, Universidad San Sebastián, Concepción, Chile, email: fsilvaj1991@gmail.com

P. A. Oyarzún, Universidad San Sebastián, Concepción, Chile, patricio.oyarzun@uss.cl

Como citar este artículo: Silva, F. A., Oyarzún, P. A., Nanoemulsiones: Una aproximación hacia Nanoemulsiones dobles y sus aplicaciones, Entre

I. INTRODUCCIÓN

Las emulsiones son sistemas coloidales que permiten la unión de fases inmiscibles entre sí. Esto se logra gracias al uso de estabilizantes, los cuales disminuyen la tensión superficial entre las fases y forma una capa entre la fase dispersa y la fase continua. Estos tipos de coloide son utilizados en diversas industrias como la cosmética, farmacéutica, alimentos, agricultura, entre otras [1]. En general el tamaño de las emulsiones es micrométrico y pueden ser observadas mediante microscopía óptica. Existen algunas estrategias para reducir el tamaño de las emulsiones, los cuales van desde invertir fases hasta incrementar la energía para romper los glóbulos formados. Estas reciben el nombre de nanoemulsiones y microemulsiones según el método de formación. En particular las nanoemulsiones son emulsiones nanométricas para las cuales algunos autores incluso han definido un diámetro máximo <1000 nm. Las nanoemulsiones permiten encapsular diversos compuestos activos entregando ciertas ventajas con respecto a las emulsiones. Debido a la disminución en el tamaño de glóbulo son capaces de aumentar el área de contacto, aumentar la disponibilidad de los compuestos activos, protección contra factores ambientales y liberación controlada de estos [2]. Las nanoemulsiones son flexibles y permiten la incorporación de diversas fases, siendo posible formular nanoemulsiones dobles del tipo W/O/W y O/W/O, las mayormente descritas. Estas facilitan la unión de compuestos activos lipofílicos e hidrofílicos en un solo glóbulo [3]. La

Ciencia e Ingeniería, vol. 15, no. 30, pp. 23-33, julio-diciembre año 2021. DOI: <https://doi.org/10.31908/19098367.2095>.



Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

existencia de la doble interfase requiere un análisis comprehensivo para su formulación y se deben tomar en cuenta consideraciones físico-químicas para lograr estabilizar los glóbulos formados. A continuación, se describen aspectos básicos para la formación de nanoemulsiones simples y conceptos claves para la formulación de nanoemulsiones dobles y sus aplicaciones

II. ANÁLISIS GLOBAL DE MICROEMULSIONES, NANOEMULSIONES Y NANOEMULSIONES DOBLES

Los términos nanoemulsiones y microemulsiones pueden ser confundidos por el prefijo de cada uno de estos. El prefijo nano- hace referencia al tamaño nanométrico del glóbulo formado (10^{-9} m), mientras que micro- lo hace a su correspondiente prefijo (10^{-6} m). Sin embargo, la diferencia no recae en lo anteriormente descrito. Más bien, se deben considerar otros elementos para la clasificación de uno u otro grupo [4]. Si bien, para nanoemulsiones producidas de manera convencional mediante métodos de alta energía es posible simplificar el análisis mediante generalizaciones de las ecuaciones 1 y 2. Sin embargo, en el caso de nanoemulsiones y microemulsiones producidas mediante métodos de baja energía requiere un análisis más fino, debido a que ambos tipos de emulsiones descritas están regidas por un mecanismo de formación universal [5]. Anton & Vandamme [6] realizaron una clara diferenciación entre los términos, describiendo la formación de nanoemulsiones mediante dos mecanismos (I) Métodos de alta energía como homogenización de alta velocidad, ultrasonido u homogenización de alta presión. La alta energía suministrada a la emulsión provoca la disminución del tamaño de glóbulo formado e incrementa el área interfacial entre la fase dispersa y continua. (II) Método de baja energía emulsificación espontánea. Este método consiste en dispersar el o los surfactantes en la fase contraria a la que son afines. En el caso de las nanoemulsiones O/W el surfactante hidrofílico se añade en la fase oleosa. Esta es calentada hasta los 30°C , mientras que la fase dispersa se mantiene a temperatura ambiente. Cuando ambas fases se unen, se genera rápidamente un glóbulo de tamaño nanométrico.

Algunos estudios en donde se utilizan estos métodos se muestran en la Tabla 1.

TABLA I.
ESTUDIOS REFERENTES A LA FORMACIÓN DE NANOEMULSIONES

Nanoemulsión	Método de emulsificación	Descripción	Referencia
O/W	HSH (HPH), HSH+HPH	10% w/w DHA sobre solución acuosa de Tween 40.	[7]
O/W	Emulsión gruesa HSH Nanoemulsión HPH	3.75% w/w Span 80 en aceite de soya 1.25% w/w Tween 80 (1:9).	[8]
O/W	Emulsificación espontánea	Adición de Labrafil M1944 Cs y Cremophor ELP sobre la fase oleosa.	[5]
O/W	Emulsificación espontánea	Adición de Kolliphor HS15 y Span 80 sobre la fase oleosa.	[9]
O/W	Emulsión gruesa HSH Nanoemulsificación por ultrasonido	Adición de Tween 80 y lecitina de soya en la fase continua.	[10]

*HSH=High Speed Homogenizer, HPH=High Pressure Homogenizer

Termodinámicamente, las nanoemulsiones son coloides inestables que no se generan espontáneamente. Sin embargo, debido al mecanismo de formación universal, mencionado anteriormente, es posible obtener nanoemulsiones mediante métodos de baja energía. Un análisis termodinámico general permite explicar la formación de nanoemulsiones a través de métodos de alta energía. Según lo presentado por McClements [11] en base a [12], y lo presentado por [13], la emulsificación y nanoemulsificación se ve favorecida por dos componentes: energía libre de interfase y entropía de configuración, Ec. (1) y Ec. (2), respectivamente.

$$\Delta G = H - T\Delta S \quad (1)$$

$$\Delta G_{\text{Formación}} = \Delta G_{\text{Interfase}} - T\Delta S_{\text{Configuración}} \quad (2)$$

Donde el término $\Delta G_{\text{Interfase}}$ representa la energía libre de la interfase o trabajo requerido para incrementar el área de la interfase. Esta última resulta de la consideración de que no existen cambios de volumen e intercambio de calor en el sistema y el término asociado a la energía libre es igual a la energía interna. Láng [14] dentro del marco del modelo de Gibbs define la tensión superficial según la Ec. (3).

$$\gamma = \left(\frac{\partial U^E}{\partial A} \right)_{S^E, n_1^E, \dots, n_m^E} \quad (3)$$

Donde U^E es energía interna en exceso, A es área superficial, S^E es entropía en exceso, y n_m es el componente m en exceso. Sin embargo, Láng [14] se refiere a la Ec. (3) como poco práctica en términos experimentales debido a las variables presentes en ella. Tras una serie de transformaciones es más conveniente expresar la tensión superficial en términos de energía libre de Gibbs o Helmholtz, Ec. (4).

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T, p, n_1, \dots, n_m} = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{T, V, n_1, \dots, n_m} \quad (4)$$

De manera simplificada la $\Delta G_{\text{Interfase}}$ puede ser representada mediante la Ec. (5).

$$\Delta G_{\text{Interfase}} = \gamma \Delta A \quad (5)$$

La tensión superficial γ tiene unidades de N/m o mN/m y ΔA es la diferencia entre el área de interacción de los componentes no emulsionados (A_1) y la emulsión/nanoemulsión (A_2), donde $A_2 \gg A_1$.

Por otra parte, la entropía de configuración hace referencia a la configuración o curvatura que adquiere el surfactante utilizado. En emulsiones y nanoemulsiones, el estabilizante se curva generando un “radio de curvatura”. Existen dos ecuaciones útiles para entender el efecto de lo anterior sobre la ecuación general, la primera es la ecuación de presión de Laplace (Ec. 6), la otra es la ecuación de “entropía de configuración” (Ec. 7).

$$\Delta p = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) = \gamma \left(\frac{2}{r} \right) \quad (6)$$

$$\Delta S_{\text{configuración}} = \frac{nk}{\phi} (\phi * \ln \phi + (1 - \phi) * \ln(1 - \phi)) \quad (7)$$

Donde Δp es la diferencia de presión interior y exterior (medida en Pa), r es el radio del glóbulo formado, n es el número de glóbulos en la dispersión coloidal y ϕ es la fracción de volumen de la fase dispersa. En términos generales el proceso de nanoemulsificación será viable si la energía libre total es negativa. Por lo tanto, la entropía de configuración debe ser $\Delta S_{\text{configuración}} > 0$ y la energía de interfase debe ser minimizada mediante la introducción de surfactantes que disminuyen la tensión superficial y la presión de Laplace. Sin embargo, a medida que disminuye el tamaño de glóbulo la presión de Laplace aumenta, esta presión actuará como resistencia a cualquier efecto externo, requiriendo una mayor cantidad de energía para disminuir el tamaño de glóbulo [15]. Adicionalmente, existen diversos factores que determinan una configuración favorable del punto de vista energético como la temperatura, sinergia entre surfactante/surfactante o surfactante/co-surfactante, la distribución y longitud de la porción hidrofílica/lipofílica de los surfactantes, y la interacción de los tensioactivos con la fase continua [16].

En contraposición con las nanoemulsiones, las microemulsiones son sistemas coloidales termodinámicamente estables. La baja energía necesaria para lograr la formación de microemulsiones las hacen ser una interesante alternativa en comparación con los métodos de alta energía descritos para nanoemulsiones. La unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a las microemulsiones como “Una dispersión hecha de agua, aceite y surfactante(s), que es isotrópica y termodinámicamente estable con dominio del diámetro de la dispersión variando aproximadamente desde 1 a 100 nm, usualmente de 10 a 50 nm” [17]. Estas se forman exclusivamente por métodos de baja energía los cuales incluyen la emulsificación espontánea y métodos de inversión por temperatura (PIT) e inversión de fases (PIC), para los cuales Solans & Solè [18] refieren como principal diferencia la difusión rápida de los surfactantes entre las diferentes fases y cambios espontáneos en la curvatura de estos, respectivamente. Los métodos de inversión de fases pueden ser utilizados tanto para la formación de nanoemulsiones como microemulsiones.

En base a lo presentado por [18], mediante la síntesis primaria de una microemulsión que posteriormente es diluida, es posible formar una nanoemulsión. Esta es generada tras alcanzar un nuevo equilibrio que provoca la salida de moléculas de surfactante desde la interfase y un aumento en el tamaño de glóbulo. Esto ha sido una de las bases para diferenciar una microemulsión de una nanoemulsión, al asumir que esta última requiere una menor cantidad de tensioactivo. Sin embargo, de manera crítica, una mayor o menor cantidad de tensioactivo solo abarca una región diferente en el diagrama de fases ternario, en el cual también se encuentran otras estructuras. Por esto, en esencia una nanoemulsión preparada mediante métodos de baja energía es una microemulsión que puede ser obtenida al analizar un diagrama de fases ternario.

Anton & Vandamme [5] realizaron una comparación entre el método PIT y el de emulsificación espontánea, evidenciando que solo difieren en el factor razón surfactante/aceite (SOR=surfactante/oil ratio), proponiendo que el método PIT se rige por el mismo mecanismo de emulsificación espontánea tras alcanzar la temperatura crítica. A partir de lo anterior, está ampliamente aceptado que las microemulsiones son formuladas con concentraciones altas de surfactantes (~20%), por el contrario, las nanoemulsiones requieren una menor cantidad de surfactantes (~10) [19]-[20]. En particular, se ha descrito que las microemulsiones no solo adoptan una configuración globular la cual recibe el nombre de *swollen micelles*. Más bien, es posible encontrar estructuras laminares, bicontinuas, hexagonales, cilíndricas o líquidos cristalinos. Dichas estructuras se presentan para ciertas condiciones que pueden ser exploradas mediante el diagrama de fases ternario (aceite, agua, surfactante/surfactante o surfactante/co-surfactante). Justamente, es en este diagrama en donde se sitúan las regiones Winsor (I-IV) que representan la formación de microemulsiones en equilibrio, exceso de fase continua o estructura bicontinua [6]. Alternativamente a la exploración del sistema de fases ternario, es posible predecir el tamaño y viscosidad de microemulsiones mediante el método descrito por Acosta *et al.* [21] y Kiran & Acosta [22]. Aproximaciones más modernas incluyen el modelado *in silico* de microemulsiones basado en la teoría termodinámica y minimización de la energía libre de Gibbs [23] y la simulación mediante dinámica molecular combinada con diversos algoritmos permiten calcular parámetros como potenciales químicos, coeficientes de actividad, densidad de carga de la superficie y coeficientes de partición de los componentes de la microemulsión y la fase continua [24]. El trasfondo termodinámico para la formación de microemulsiones puede ser analizado en [25], [26], [27], [28]-[29].

En el caso de las nanoemulsiones dobles es posible realizar formulaciones que incluyan estrategias de alta y baja energía, tal como lo demostraron Ding *et al.* [30]. Inicialmente los autores generaron una nanoemulsión tipo W/O mediante homogenización rotor/estator y microfluidizador, logrando un tamaño de glóbulo de 50 nm. Posteriormente se utilizó el método de emulsificación espontánea para obtener la nanoemulsión W/O/W.

III. ASPECTOS FÍSICOS EN LA FORMACIÓN DE

NANOEMULSIONES POR MÉTODOS DE ALTA ENERGÍA

La formación de nanoemulsiones también puede ser explicada mediante ecuaciones físicas y números adimensionales. Existe una rica teoría para describir y predecir el tamaño de glóbulo en las emulsiones tradicionales frente a flujos laminares y turbulentos. Parámetros como viscosidad de la fase continua, viscosidad de la fase dispersa, tensión superficial, entre otros; son esenciales para entender el proceso [31]. En líneas generales, el proceso de emulsificación y la disminución en el tamaño de glóbulo está gobernado por dos números adimensionales. Estos son el número de Weber que es la razón entre las fuerzas inerciales y de tensión superficial (Ec. 8).

$$We = \frac{\tau_{aplicado} d}{\sigma} \quad (8)$$

Donde τ es el esfuerzo de corte, d es el diámetro del glóbulo y σ es la tensión superficial. Y el número de Ohnesorge que es la razón entre la viscosidad de la fase dispersa (fuerzas viscosas) y tensión superficial (Ec. 9).

$$Oh = \frac{\mu_d}{\sqrt{\rho_d \sigma d}} \quad (9)$$

Donde μ_d es la viscosidad de la fase dispersa y ρ_d es la densidad de la fase dispersa. Dichos números adimensionales se relacionan según la Ec. (10)

$$We_{crit} = C_1(1 + f(Oh)) \quad (10)$$

Gupta *et al.* [32] resumen y desarrollan el efecto de $f(Oh)$ sobre la Ec. (10). En los casos donde $f(Oh) \ll 1$, se considera que las fuerzas viscosas son despreciables y We_{crit} se convierte en la constante C_2 que es similar a la ecuación 6. y cuyo tamaño de glóbulo puede ser explicado por la Ec. (11). que surge de sustituir $\tau \sim \mu_c \gamma$.

$$d = \frac{C_1 \sigma}{\mu_c \gamma} \quad (11)$$

μ_c es la viscosidad de la fase continua, γ es la velocidad de corte y C_1 o número de capilaridad es en función de la razón de viscosidad entre las fases. En este escenario la disminución en el tamaño de glóbulo se dará en regímenes de flujo laminar si las razones de viscosidad entre la fase dispersa y continua son bajas (<4 para velocidad de corte normal), y si la escala de tiempo de la deformación es menor a la escala de tiempo del flujo [33]. Por el contrario, si $f(Oh) \gg 1$, la viscosidad de la fase dispersa tiene efectos significativos sobre el tamaño de glóbulo y mayor estrés inercial es requerido para obtener glóbulos nanométricos. Este régimen es denominado viscoso-turbulento y está gobernado por $\tau = \sqrt{\mu_c \rho_c \varepsilon}$, ρ_c es la densidad de la fase continua y ε es la densidad de potencia de entrada definida como la disipación de potencia por unidad de masa del fluido [34]. Luego la relación entre los números adimensionales Weber y Ohnesorge se da mediante la Ec. (12).

$$We_{crit} = C_4 Oh^{0.4} \quad (12)$$

Donde We_{crit} es igual a $\frac{\sqrt{\mu_c \rho_c \varepsilon} d}{\sigma}$. Para la constante C_4 , Gupta *et al.* [32] hace referencia a la existencia de un colapso universal en el rompimiento del glóbulo que en el caso de homogenización por alta presión es 0.063 y homogenización por ultrasonido es 0.057. No se menciona el valor de la constante para homogenización de alta velocidad o microfluidizador. Por este motivo, el cálculo de ε es característico para cada técnica de homogenización. Sin embargo, debido al *colapso universal*, el valor de ε debe ser de orden similar para las diferentes técnicas mencionadas. Finalmente, para regímenes de flujo turbulento y alta viscosidad de la fase dispersa como en nanoemulsiones tipo O/W, el tamaño de glóbulo está dado por la Ec. (13).

$$d = \frac{\sigma_6^{5/12} \mu_d^{1/3}}{(\rho_d \sigma)^{1/5} (\mu_c \rho_c \varepsilon)^{5/12}} \quad (13)$$

IV. SÍNTESIS DE NANOEMULSIONES DOBLES

El método más utilizado para la síntesis de emulsiones y nanoemulsiones dobles es el método secuencial en donde se genera una nanoemulsión inicial la cual, posteriormente, es añadida en la fase dispersa final. Generalmente se ha descrito este método para la formación de nanoemulsiones W/O/W ó O/W/O. Requiere el estudio y selección de emulsionantes que puedan estabilizar las tres fases. La preparación de la fase final W_2 , se realiza añadiendo un emulsionante hidrofílico que estabilice la nanoemulsión $W1/O/W2$ [35]-[36]. La selección de emulsionantes que permitan la síntesis de una primera fase $W1/O$ altamente estable es crucial para la estabilización de la doble emulsión, este debe cumplir con propiedades como expansibilidad, compresibilidad y dar balance entre la presión osmótica y Laplace [35], especialmente para esta última que en nanoemulsiones incrementa a medida que disminuye el tamaño de glóbulo. Otras estrategias que se han diseñado para la formación de nanoemulsiones dobles es la mezcla entre métodos de alta y baja energía, la cual fue propuesta por Ding *et al.* [30].

Existen una serie de aproximaciones que se han propuesto para lograr nanoemulsiones dobles. Una de estas es la descrita por Hanson *et al.* [37] que propone el uso de bloques de co-polipéptidos con estructura general poly(L-lysine*HBr)_x-b-poly(racemic-leucine)_y, Kx(rac-L)_y en donde el segmento hidrofílico corresponde a poly(L-lysine*HBr)_x(20-100 residuos) y el segmento hidrofóbico es poly(leucine)_y(5-30 residuos). Este último capaz de formar una estructura de varilla helicoidal que puede penetrar la fase oleosa e interactuar con la fase acuosa $W1$ a través de su parte Kx(rac-L). Facilitando la formación de nanoemulsiones W/O/W. Aunque no tiene una aproximación nanotecnológica, Kim *et al.* [38] desarrollaron un proceso de doble emulsificación en una etapa basada en colisiones entre glóbulos formados, al colisionar consiguen interiorizar la fase continua convirtiéndola en fase dispersa, de esta manera se crea

una doble emulsión. La emulsión O/W/O se logra obtener mediante la fase continua compuesta por tolueno, un polímero liposoluble y partículas de sílica. A pesar del enfoque innovador descrito, se requieren diversos estudios para determinar cuáles son las condiciones que permiten obtener un tamaño nanométrico y estabilicen la formación de los glóbulos internos. Zhao *et al.* [39] siguiendo los ensayos descritos por Zhang *et al.* [40], fueron capaces de sintetizar una nanoemulsión doble mediante el uso de una cámara de alta presión a la cual suministraron CO₂. Dichos experimentos indicaron que bajo ciertas condiciones de presión y concentración de surfactante iónico las moléculas de H₂O y tensioactivo son capaces de ingresar y estabilizarse dentro de la fase oleosa quedando como nanoemulsión W/O/W. Se describe este método como barato y sencillo para lograr la doble emulsificación. Requiere del diseño y construcción de un equipo como el utilizado por los autores. Si bien, se ha utilizado los tensioactivos Tritón X100, Pluronic P104 y CTAB para la síntesis de nanoemulsiones por alta presión, la estabilidad de estas es baja y se observa desestabilización total en 2 horas. Finalmente, se recomienda leer la interesante revisión publicada por Sheth *et al.* [3], quienes realizan una clasificación general de las nanoemulsiones dobles: emulsificación por secuencia, engullimiento, co-emulsificación y emulsificación por separación de fases.

V. OTROS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN DE NANOEMULSIONES

La formulación de nanoemulsiones simples (W/O y O/W) y en consecuencia las nanoemulsiones dobles (W/O/W y O/W/O) requiere tomar en cuenta diversos factores experimentales o de operación. Estos factores dependen del método de síntesis, la concentración de sus componentes, la incorporación de compuestos activos, entre otros. A continuación, se describen diferentes factores a considerar en la formulación de nanoemulsiones en general.

A. Balance hidrofílico-lipofílico (HLB)

El balance hidrofílico-lipofílico es un término desarrollado por William Griffin en 1949, definido como el balance entre tamaño y fuerza de la cabeza hidrofílica y lipofílica, a la cual se le puede asignar un valor numérico. El aporte o contribución de los diferentes grupos de la molécula indicarán su solubilidad y capacidad para formar emulsiones W/O u O/W [41]. Posteriormente, diferentes autores contribuirían otras ecuaciones para relacionar el número HLB con otros grupos funcionales e incluso con surfactantes iónicos. En general un HLB entre 1.5-8 son surfactantes que permiten la formación de emulsiones W/O, los surfactantes con valores sobre 8 son útiles para formar emulsiones O/W [42]. Otros autores han descrito nuevos métodos para el cálculo del número HLB los cuales pueden ser consultados en [42], [43], [44]-[45]. Estos incorporan diversos parámetros que el método HLB no toma en cuenta como la temperatura, salinidad, % de las fases, estructurales, entre otros. A pesar de los esfuerzos realizados, el

método HLB sigue estando vigente debido a que permite entender el proceso de emulsificación de manera simplificada.

B. HLB y su relación en nanoemulsiones

El método de producción junto a otros parámetros determina el tamaño de glóbulo, polidispersidad y estabilidad. Lu *et al.* [46] realizando estudios para la preparación y caracterización de nanoemulsiones O/W incorporando aceite esencial de citral, logran determinar el HLB requerido, utilizando los emulsionantes Span 85 (HLB=1.8) y Brij 97 (HLB=12). Variando el HLB entre 2 a 12, se determinó que existe una relación lineal entre HLB y tamaño de glóbulo, obteniendo un tamaño mínimo para HLB 12. Sin embargo, se registró el aumento de tamaño de glóbulo. Asociado principalmente al método de producción y la alta energía aplicada, la nanoemulsión alcanza un periodo de maduración relacionada con la desestabilización *Ostwald ripening*.

La elección de surfactantes para nanoemulsiones del tipo W/O ó O/W se realiza dependiendo de su afinidad por determinada fase. En el caso del tensioactivo hidrofílico Tween 80 debiese ser añadido en la fase acuosa, mientras que un tensioactivo hidrofóbico (e.g. Span 80) debe ser añadido en la fase oleosa [47]. Sin embargo, es posible añadir el surfactante hidrofílico en la fase oleosa incrementando la temperatura. A medida que el emulsionante se aproxima al punto de enturbiamiento (*cp=cloud point*) comienza a tener solubilidad reversa y será más afín a la fase oleosa. Esta es una propiedad que se puede utilizar para incrementar la sinergia entre tensioactivos con afinidad opuesta. De este modo el HLB se hace manejable y mejora la estabilidad de la nanoemulsión final. La adición de otros compuestos como co-surfactantes, espesantes y/o un compuesto osmóticamente activo permite equilibrar fuerzas y evita desestabilizaciones debido a la presión osmótica [48].

C. Efectos energéticos en la formación de nanoemulsiones dobles

Otro factor importante en la formación de nanoemulsiones doble es la energía suministrada para lograr la emulsificación. Dependiendo del método seleccionado, existirán diversos parámetros que se deben manejar u optimizar. En el caso de los métodos de alta energía como homogenización por ultrasonido, homogenización por alta presión y homogenización de alta velocidad puede ocurrir un efecto llamado sobreprocesamiento, en donde el tamaño de los glóbulos formados incrementa debido a desestabilizaciones asociadas a coalescencia y *Ostwald ripening* (principalmente por esta última) [49]-[50]. Diversos autores mencionan que mayores tiempos de homogenización y una concentración adecuada de tensioactivo llevan a la obtención de nanoemulsiones con menor diámetro [51]-[52]. Sin embargo, en nanoemulsiones dobles, un mayor tiempo de homogenización no necesariamente indica menor tamaño de partícula y estabilidad. Tang & Sivakumar. [53], en estudios de encapsulación de aspirina en una nanoemulsión doble mediante homogenización ultrasonido sugiere realizar la

segunda emulsificación con menor amplitud y tiempo de homogenización para no romper el sistema. Bamba *et al.* [54] determinaron el efecto de diversas condiciones de homogenización (Microfluidizador y alta velocidad) sobre una nanoemulsión doble para la encapsulación de polifenoles y antocianinas. Los autores observaron bajo ciertas condiciones de presión o velocidad, hay un incremento en el tamaño de glóbulo, asociado a la imposibilidad del emulsionante atenuar rápidamente el aumento de la tensión superficial y la presión de Laplace. Un incremento en la concentración de surfactante permite soportar la disminución del tamaño de glóbulo [55]. Aunque, una mayor concentración de surfactante es un parámetro que se debe evaluar dependiendo de la aplicabilidad de la nanoemulsión (e.g en cosmética una alta concentración de emulsionante puede causar irritación en la piel).

VI. PROCESO DE ESCALAMIENTO

El proceso de escalamiento para nanoemulsiones dependerá del equipo y método utilizado para dicho fin. Si bien, en esencia los métodos de baja y alta energía son diferentes, mantienen en común la necesidad de una adecuada distribución de sus fases. Los métodos que requieren agitación mecánica van desde la emulsificación tradicional hasta los métodos de inversión de fases (temperatura y espontánea). La agitación mecánica sigue mecanismos generales para lograr una distribución. En este caso de la agitación mecánica es posible hacer uso de diversas relaciones provenientes del análisis de reactores agitados. Solè *et al.* [56] estudiaron el proceso de escalamiento para una nanoemulsión hecha mediante el método PIC (*phase inversión composition*). En primera instancia realizaron un análisis de dimensiones del recipiente. Respetando proporciones de altura y ancho, al igual que el tamaño del agitador. Posteriormente, se determinó estadísticamente si los factores velocidad de adición de la fase dispersa, velocidad lineal, tiempo total de adición y velocidad característica son significativos para diferentes formulaciones. Adicionalmente se propone el uso de la velocidad lineal característica como parámetro de escalamiento mostrando una buena relación entre tamaño de glóbulo y volumen de reacción. Se desestima el uso del número de Reynolds como parámetro debido a que el aumento de escala podría generar una velocidad angular excesiva. Otras relaciones de escalamiento pueden ser utilizadas, como la relación empírica entre número de Reynolds y el número de Newton o número de poder, este último característico para cada tipo de agitador. Sin embargo, se debe tener en consideración el régimen laminar o turbulento, y el tipo de fluido, Newtoniano o no Newtoniano, este último característico en formulaciones cosméticas y alimentarias. En base a lo anterior, las relaciones de potencia necesaria para la agitación pueden ser modificadas, como la propuesta por Metzner-Otto [57]. Un ejemplo de esto es lo descrito por James *et al.* [58], en donde desarrolla ecuaciones empíricas de escalamiento para regímenes laminares y turbulentos logrados mediante un agitador rotor-estator marca Silverson. En el caso de las nanoemulsiones preparadas mediante homogenización por ultrasonido, los factores operacionales que dominan el proceso son el tiempo de homogenización (expresado como tasa de procesamiento o mL emulsión/minuto) para operaciones continuas, amplitud,

potencia y configuración de la sonda del equipo [59]. Además de lograr una formulación ideal en términos de proporciones de fases continua, dispersa y concentración de surfactante, es importante determinar las condiciones de procesamiento que permiten un tamaño nanométrico de los glóbulos sin causar sobreprocesamiento de estos, lo cual puede ser evidenciado al observar un aumento en el tamaño de glóbulo y una disminución en la capacidad de encapsulación [60]. Khadem & Sheibat [61], desarrollaron ecuaciones de modelamiento para predecir el tamaño y capacidad de encapsulación en emulsiones dobles en base a las aproximaciones de Taylor, Hinze y las modificaciones propuestas por Gupta *et al.* [32]. De igual manera que en nanoemulsiones simples, un aumento en el tiempo de procesamiento genera una menor capacidad de encapsulación debido al rompimiento de los glóbulos. Si bien, se describen buenas correlaciones para emulsiones micrométricas, en nanoemulsiones dobles los tamaños de glóbulo se mantienen <500 nm, esto genera la necesidad de una mayor cantidad de energía que puede provocar la desestabilización de la nanoemulsión interior. Lo descrito por Khadem & Sheibat [61] es una buena aproximación para explicar el proceso de doble emulsificación por ultrasonido, pero es necesario un mayor análisis para explicar la síntesis de nanoemulsiones dobles sub-micrométricas. Otras estrategias utilizadas para lograr nanoemulsiones son las referentes al uso de homogenización por alta presión, microfluidizador y microfluidica. Las dos primeras utilizan altas presiones (50-350 MPa) y una estructura determinada por donde pasa una emulsión gruesa. El gradiente de presión genera una emulsión fina de glóbulo pequeño que puede ser controlado mediante diferentes ciclos de procesamiento. Se ha descrito el uso de estas estrategias para formular emulsiones dobles. Sin embargo, no se recomienda para producir nanoemulsiones dobles, a fin de evitar la alta energía y sobreprocesamiento de estas, cuyo principal efecto es la desestabilización y rompimiento de los glóbulos evidenciado a través de un aumento en el tamaño de glóbulo [62].

VII. APLICACIONES DE LAS NANOEMULSIONES DOBLES

Las nanoemulsiones y la encapsulación de compuestos activos dentro de un glóbulo permiten la protección de estos frente a diversos factores ambientales como radiación UV, temperatura, humedad, agentes oxidantes, entre otros. Además de mejorar la biodisponibilidad debido a la disminución en el tamaño de partícula y aumento en el área de contacto [63]. En particular las nanoemulsiones dobles permiten la incorporación de compuestos activos de diversa naturaleza química. El campo de aplicación es variado y comprende áreas como la cosmética, farmacéutica, medicina de diagnóstico y tratamiento, industrial, etc [3].

A. Alimentos

El desarrollo de nanoemulsiones en la industria de alimentos está destinado a evitar la degradación de los compuestos activos y aumentar la biodisponibilidad de estos. Además de proteger dichos compuestos en su paso por el aparato digestivo. La encapsulación se realiza principalmente para minerales,

proteínas, aminoácidos, pigmentos, endulzantes, prebióticos. Sin embargo, no es posible para probióticos, debido al tamaño celular [64]-[65]. Un caso de estudio interesante es la amplia literatura con respecto a incrementar la biodisponibilidad de la curcumina y su concentración en la sangre. Adicionalmente, se han desarrollado varios métodos para este fin, que no solo incluye a nanoemulsiones, sino también conjugados poliméricos, liposomas, emulsiones Pickering, entre otros [66]. Una alternativa para complementar compuestos lipofílicos como la curcumina con compuestos hidrofílicos es el desarrollo de nanoemulsiones dobles. Aditya *et al.* [67] desarrollaron una emulsión doble que en su primera fase dispersa (acuosa) contenía catequina (antioxidante polifenólico), gelatina (espesante), cloruro de sodio y ácido ascórbico, estos compuestos fueron inmersos en la fase oleosa compuesta de aceite de oliva, curcumina y el tensioactivo hidrofóbico poliglicerol polirricinoleato (PGPR, HLB=0.6). Posteriormente, utilizando homogenización de ultrasonido, se añadió la primera emulsión en la fase dispersa final, compuesta por H₂O y el surfactante Tween 80 (1% v/v). Sin embargo, el tamaño del glóbulo formado se estimó en 6.7 µm (6700 nm). Una estrategia para la disminución del tamaño de glóbulo es la adición de una mayor cantidad de tensioactivo [68]. Gharehbeglou *et al.* [36], consiguieron nanoemulsiones dobles cargadas con oleuropeína, un Polifenol presente en la pulpa de aceitunas verdes y hojas de olivo. La oleuropeína fue añadida en la nanoemulsión doble siguiendo el método de dos pasos, para lo cual se utilizó una fase oleosa compuesta por aceite de soja junto al emulsionante Span 80. La nanoemulsión doble final se obtuvo mediante el uso de WPC (*whey protein concentrate*), el espesante pectina y homogenización por ultrasonido durante 10 minutos. Siguiendo un diseño experimental se obtuvo un glóbulo de 191.1 nm. Mehrnia *et al.* [69] desarrollaron una nanoemulsión doble para la encapsulación del compuesto bioactivo crocina, carotenoide proveniente de la especia azafrán, sensible a diversas condiciones de almacenamiento. Mediante el uso del emulsionante PGPR y aceite de oliva se pudo realizar la nanoemulsión primaria W/O. La nanoemulsión final W/O/W consistió en WPC y goma arábiga. Recurriendo a métodos de alta energía se generó una emulsión gruesa mediante homogenización por rotor-estator y homogenización por alta presión a temperatura ambiente. Una revisión más detalla de emulsiones y nanoemulsiones dobles destinadas a la industria de alimentos se puede encontrar en Mohammad *et al* [65].

B. Cosmética

Los cosméticos han tenido un rol fundamental en la historia humana. Si bien, las grandes empresas de cosméticos se fundan a partir del siglo XX, ya las culturas mesopotámicas y egipcias utilizaban ungüentos con fines religiosos, terapéuticos y estéticos. Estas costumbres luego son llevadas a Grecia y Roma, en donde crean sus propias mezclas destinadas al cuidado de la piel [70].

Actualmente se estima que la industria cosmética obtiene

ingresos aproximados 537 billones de dólares, por productos destinados al cuidado de la piel y protectores solares, cabello, maquillaje, fragancias [71]-[72]. Las principales marcas que lideran el mercado son L’Oreal, Unilever, The Estée Lauder, Procter & Gamble, Shiseido, Coty, LVMH, Beiersdorf, entre otras [73]. Diversos productos se han desarrollado en base a nanotecnología los cuales incluyen nanopartículas lipídicas sólidas, liposomas, liposomas, dendrímeros, polímeros, nanopartículas en general [74]. L’Oreal es una de las principales empresas que invierten en tecnología y desarrolla productos con base nanotecnológica. Si bien en el año 2004 invertía aproximadamente \$600 millones de dólares, en la actualidad invierte más de 1 billón de dólares en ciencia y tecnología [75]. Esta compañía fue la primera en lanzar un producto que incluía “nanosomas” o liposomas para la encapsulación de Pro-retinol A. En la Tabla II, se observan patentes registradas para nanoemulsiones dobles destinadas a la industria cosmética.

C. Farmacéutica y Biomedicina

Las nanoemulsiones destinadas a la industria farmacéutica y aplicaciones biomédicas tienen como objetivo la incorporación de compuestos activos lipofílicos e hidrofílicos, y la protección de estos de factores ambientales. Además de promover la liberación controlada de estos y aumentar su biodisponibilidad. Lo anterior es conocido como *drug delivery*, y es utilizada en el área oftalmológica, oral, tópica, transdérmica, intranasal y parenteral [76] (Tabla III). Dentro del desarrollo de este tipo de nanoemulsiones es esencial el uso adecuado de emulsionante y/o sus otros componentes, de modo que no genere daño celular y disrupción de la membrana celular [77]-[78].

Si bien, generalmente, se prefiere el uso de emulsionantes no iónicos, también es posible realizar emulsiones nanométricas con emulsionantes iónicos con bajos efectos celulares [79]. Existen diversos métodos para comprobar la seguridad de estos preparados y que se corresponden con su potencial uso. Por ejemplo, los ensayos de hemólisis son útiles cuando la nanoemulsión es de uso parenteral. En particular, el programa nacional de toxicología de los Estados Unidos dependiente de *National Institute of Health*, actualiza regularmente el listado de métodos alternativos (*no animal testing*) aceptados por diversos organismos como la FDA (*Food and Drug Administration*), USDA (*United States Department of Agriculture*) e ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). Esta última colabora con la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) para la validación y utilización de los métodos en los países miembro [80]. En particular, la FDA regula todo producto o actividad relacionada a la nanotecnología, esto incluye productos o procedimientos destinados a su uso en humanos y la práctica de la medicina [81].

TABLA II
PATENTES PARA NANOEMULSIONES DOBLES DESTINADAS A COSMÉTICA

Estado	Descripción	Referencia
--------	-------------	------------

Concedida	Nanoemulsión del tipo Oil/Water/Silicone procesada en frío para incorporar ingredientes solubles en agua e ingredientes lipofílicos.	[82]
Solicitud	Proceso de formulación de una nanoemulsión doble para uso farmacéutico y cosmético. Proceso realizado a 25°C y utilización de tensioactivos glicéridos poliglicozilados y ésteres de sorbitano polihidroxiethylados.	[83]
Abandonada	Diseño de diversas nanoemulsiones supersaturadas para la incorporación de Coenzima Q10 y tocoferol	[84]
Concedida	Nanoemulsión doble para incorporar fitoquímicos hidrosolubles y liposolubles utilizando tensioactivos tipo Tween, Span y Cremophor EL. Co-surfactantes y espesantes.	[85]
Solicitud	Nanoemulsión doble polimérica tipo O/W/O y posterior purificación. Destinada a diversas industrias, dentro de las cuáles está la cosmética.	[86]
Concedida	Preparación de nanopartículas lipídicas sólidas que contienen catalasa como compuesto activo. Se sintetiza a partir de una nanoemulsión W/O/W	[87]

TABLA III
NANOEMULSIONES DOBLES DESTINADAS AL ÁREA FARMACÉUTICA Y BIOMÉDICA

Tamaño (nm)	Compuesto	Descripción	Referencia
257	mAb anti-EGFR, mitomicina y verde indocianina	Encapsulación de compuestos activos para tratamiento de cáncer de vejiga mediante fototerapia.	[88]
100	Aciclovir	Nanoencapsulación de Aciclovir para incrementar su estabilidad y penetración en la piel	[89]
25	5-fluoracil	Nanoemulsión doble para la encapsulación de un compuesto quimiopreventivo.	[90]
174.3-184.5	Gadolinium (III)	Nanoemulsión doble que contiene Gadolinium (III) como contraste para resonancia magnética.	[91]
500	Insulina	Nanoemulsión doble-polimérica para la encapsulación de insulina	[92]
160	Celecoxib/Cellvue	Incorporación de un inhibidor de COX-2 y prueba fluorescente en una nanoemulsión O/O/W.	[93]
187-200	Verteporfina/Cisplatino	Polimerización de una nanoemulsión doble que contiene compuestos para tratamiento de cáncer mediante fototerapia.	[94]

VIII. CONCLUSIONES

Existe una vasta y compleja literatura para explicar la formación de nanoemulsiones. De igual forma se han publicado un sin número de artículos evidenciando las ventajas de los sistemas nanoemulsionados. Si bien, no es el único método con enfoque nanotecnológico para aumentar la disponibilidad de diversos compuestos, este es un proceso fácil de entender y de poder implementar gracias a la amplia disponibilidad de agentes tensioactivos y equipamientos disponibles, e incluso sin equipamiento sofisticado se puede realizar si se recurre a métodos como emulsificación espontánea o PIT. Por otra parte, el desarrollo de las nanoemulsiones dobles entrega una versatilidad aún mayor al mundo de la emulsificación. Esto permite incorporar de diferentes maneras compuestos químicos que no podrían unirse mediante una nanoemulsión normal o que sí podrían, pero uno de ellos no se encontraría en el glóbulo

nanométrico. El desarrollo de este tipo de nanoemulsiones requiere un análisis más fino debido a que la fase dispersa corresponde a una nanoemulsión W/O que puede ser desestabilizada si no se optimizan los factores imperantes dependiendo del método utilizado (alta energía). Sin embargo, es posible realizar formulaciones que combinen métodos de alta y baja energía para evitar el sobreprocesamiento y rotura de los glóbulos internos.

Agradecimientos

La elaboración de esta revisión se enmarca en el desarrollo del proyecto FONDEF VIU18E0030 "Nanoemulsión con propiedades biomédicas a base de los compuestos bioactivos curcumina y micosporina para aplicaciones en el ámbito cosmético y de productos naturales", el cual se financia mediante el programa Valorización de la Investigación en la Universidad (VIU) a través del Fondo de Fomento al Desarrollo

Científico y Tecnológico (FONDEF) perteneciente a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), Gobierno de Chile.

REFERENCIAS

- [1] F. Goodarzi, S. Zendejboudi, "A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries", *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 97, no. 1, pp. 281-309, 2018.
- [2] N.A.N. Azmi, A.A.M. Elgharbawy, S.R. Motlagh, N. Samsudin, H.M. Salleh, "Nanoemulsions: Factory for Food, Pharmaceutical and Cosmetics", *Processes*, vol. 7, no. 9, pp. 617, 2019.
- [3] T. Sheth, S. Seshadri, T. Prileszky, M. E. Helgeson, "Multiple nanoemulsions", *Nature Reviews Materials*, vol. 5, pp. 214-228, 2020.
- [4] S.N. Kale, S.L. D, "Emulsion Micro emulsion and Nano Emulsion: A Review", *Systematic Reviews in Pharmacy*, vol. 8, no. 1, pp. 39-47, 2017.
- [5] N. Anton, T.F. Vandamme, "The universality of low-energy nano-emulsification", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 377, no.1-2, pp.142-147, 2009.
- [6] N. Anton, T.F. Vandamme, "Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences", *Pharmaceutical Research*, vol. 28, no. 5, pp.978-985, 2010.
- [7] P. Karthik, C. Anandharamkrishnan, "Fabrication of a nutrient delivery system of docosahexaenoic acid nanoemulsions via high energy techniques", vol. 6, no. 5, pp.3501-3513, 2016.
- [8] I. Dammak, R. A. de Carvalho, C. S. F. Trindade, R. V. Lourenço, P. J. do Amaral, "Properties of active gelatin films incorporated with rutin-loaded nanoemulsions", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 98, pp.39-49, 2017.
- [9] G. Lefebvre, J. Riou, G. Bastiat, E. Roger, K. Frombach, J. C. Gimel, P. Saulnier, B. Calvignac, "Spontaneous nano-emulsification: Process optimization and modeling for the prediction of the nanoemulsion's size and polydispersity", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 534, no. 1-2, 2017.
- [10] T. Mehmood, A. Ahmed, A. Ahmad, M. S. Ahmad, M. A. S, "Optimization of mixed surfactants-based β -carotene nanoemulsions using response surface methodology: An ultrasonic homogenization approach", *Food Chemistry*, vol. 253, pp. 179-184, 2018.
- [11] D. J. McClements, "Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities", *Soft Matter*, vol. 8, no. 6, pp.1719-1729, 2012.
- [12] R. J. Hunter. *Foundations of colloid science, vol II*. 1st ed. Oxford: Oxford University Press, 1989.
- [13] T. F. Tadros. "Emulsion Formation, Stability and Rheology" in *Emulsion Formation and Stability*, T. F. Tadros, 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2013, pp.1-75.
- [14] G. G. Láng, "Basic interfacial thermodynamics and related mathematical background", *ChemTexts*, vol. 1, no.16, pp.1-17, 2015.
- [15] S. Rawal, M. Patel, "Lipid nanoparticulate systems: Modern versatile drug carriers" in *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*, 1st ed. Elsevier William Andrew, 2018, pp.49-138.
- [16] S. Obravić, M. Poša, "Th influence of the structure of selected Brij and Tween homologues on the thermodynamic stability of their binary mixed micelles", *Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 110, pp.41-50, 2017.
- [17] S. Slomkowski, J. Alemán, J. Gilbert, G. Hess, K. Horie, R. Jones, "Terminology of polymers and polymerization process in dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011)", *Pure and Applied Chemistry*, vol.83, no.12, pp.2229-2259, 2011.
- [18] C. Solans, I. Solé, "Nano-emulsions: Formation by low-energy methods", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol.17, no.5, pp.246-254, 2012.
- [19] C. Lovelyn, A. Attama, "Current state of Nanoemulsion in Drug Delivery", *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, vol. 2, no.5, pp.629-639, 2011.
- [20] S. Nemichand, S. Laxman, "Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review", *Systemic Reviews in Pharmacy*, vol.8, no.1, pp.39-47, 2017.
- [21] E. Acosta, E. Szekeres, J. Harwell, B. Grady, D. Sabatini, "Morphology of ionic microemulsions: comparison of SANS studies and the net-average curvature (NAC) model", *Soft Matter*, vol.5, no.3, pp.551-561, 2008.
- [22] S. Kiran, E. Acosta, "Predicting the morphology and viscosity of Microemulsions Using the HLD-NAC Model", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol.49, no.7, pp.3424-3432, 2010.
- [23] B. Lukanov, A. Firoozabadi, "Molecular Thermodynamic Modeling of Reverse Micelles and Water-in-oil Miroemulsions", *Langmuir*, vol.32, no.13, pp.3100-3109, 2016.
- [24] M. Turchi, Q. Cai, G. Lian, "In silico Prediction of the Thermodynamic Equilibrium of Solute Partition in Multiphase Complex Fluids: A Case Study of Oil-Water Microemulsion", *Langmuir*, vol.35, pp.10855-10865, 2019.
- [25] K. Motomura, J. Baret, "Thermodynamic Consideration of Microemulsions", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol.91, no.2, pp.391-399, 1982.
- [26] G. Tartaro, H. Mateos, D. Schirone, R. Angelico, G. Palazzo, "Microemulsion Microstructure(s): A Tutorial Review", *Nanomaterials*, vol.10, no.9, pp.1657, 2020.
- [27] E. Ruckenstein, "Phase Inversion Temperatures of Macro- and Microemulsions", *Langmuir*, vol.13, no.9, pp.2494-2497, 1997.
- [28] G. Kaptay, "Partial Surface Tension of Components of a Solution", *Langmuir*, vol.31, no.21, pp.5796-5804, 2015.
- [29] G. Kaptay, "On the Negative Surface Tension of Solutions and on Spontaneous Emulsification", *Langmuir*, vol.33, no.40, pp.10550-10560, 2017.
- [30] S. Ding, N. Anton, S. Akram, M. Rafik, H. Anton, A. Klymchenko, W. Yu, T. Vandamme, C. Serra, "A new method for the formulation of double nanoemulsions", *Soft Matter*, vol.13, pp.1660-1669, 2017.
- [31] A. Håkansson, M. Rayner, "General Principles of Nanoemulsion Formation by High-Energy Mechanical Methods" in *Nanoemulsions: Formulation, Applications and Characterization*, S. Mahdi, D. McClements, 1 ed., Elsevier, pp.103-139, 2018.
- [32] A. Gupta, H. Burak, T. Hatton, P. Doyle, "Controlling and predicting droplet size of nanoemulsions: scaling relating with experimental validation", *Soft Matter*, vol.12, pp.1452-1458, 2016.
- [33] A. Håkansson, "Fabrication of Nanoemulsions by High-Pressure Valve Homogenization" in *Nanoemulsions: Formulation, Applications and Characterization*, S. Mahdi, D. McClements, 1 ed., Elsevier, pp.175-206, 2018.
- [34] J. Davies, "A physical interpretation of Drop Sizes In Homogenizers and Agitated Tanks, Including the Dispersion of Viscous Oils", *Chemical Engineering Science*, vol.42, no.5, pp.1683-1692, 2010.
- [35] M. Kanouni, H. Rosano, N. Naouli, "Preparation of a stable double emulsion (W1/O/W2): role of the interfacial films on the stability of the system", *Advances in Colloid and Interface Science*, vol.99, no.3, pp.339-354, 2002.
- [36] P. Gharehbeiglou, S. Jafari, A. Homayouni, H. Hamishekar, H. Mirzaei, "Fabrication of double W1/O/W2 nano-emulsions loaded with oleuropein in the internal phase (W1) and evaluation of their release rate", *Food Hydrocolloids*, vol.89, pp.44-55, 2019.
- [37] J. Hanson, C. Chang, S. Graves, Z. Li, T. Mason, T. Deming, "Nanoscale double emulsions stabilized by single-component block copolypeptides", *Nature Letters*, vol.455, pp.85-88, 2008.
- [38] S. Kim, K. Kim, S. Choi, "Controllable one-step double emulsion formation via phase inversion", *Soft Matter*, vol.14, no.7, pp.1094-1099, 2018.
- [39] Y. Zhao, J. Zhang, Q. Wang, J. Li, B. Han, "Water-in-oil-in-water double nanoemulsion induced by CO₂", *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol.13, pp.684-689, 2010.
- [40] R. Zhang, J. Liu, J. He, B. Han, Z. Liu, T. Jiang, W. Wu, L. Rong, H. Zhao, B. Dong, G. Hu, "Compressed Ethylene-Assisted Formation of the Reverse Micelle of PEO-PPO-PEO Copolymer", *Macromolecules*, vol.36, pp.1289-1294, 2003.
- [41] R. P. M. Taurozzi, C. Bregni, "Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system", *International Journal of Pharmaceutics*, vol.356, pp.44-51, 2008.
- [42] Y. Yamashita, K. Sakamoto, "Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) Classical Indexation and Novel Indexation of Surfactant" in *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science, 2 Volume Set*, H. Ohshima, 1st ed., Jhon Wiley & Sons, 2016, pp-570-574.
- [43] K. Corin, C. O'Connor, "A proposal use excess Gibbs energy rather than HLB number as an indicator of the hydrophilic-lipophilic as an

- indicator of the hydrophilic-lipophilic behavior of surfactants”, *Mineral Engineering*, vol.58, pp.17-21, 2014.
- [44] T. Nguyen, C. Morgan, L. Poindexter, J. Fernandez, “Application of the Hydrophilic-Lipophilic Deviation Concept to Surfactant characterization and Surfactant Selection for Enhanced Oil Recovery”, *Journal of Surfactants and Detergents*, vol. 22, no.5, pp.983-999, 2019.
- [45] J. Wu, Y. Dabros, H. Hamza, “Development of a method for measurement of relative solubility of nonionic surfactants”, *Colloid and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, vol.232, pp.229-237, 2004.
- [46] W. Lu, D. Huang, C. Wang, C. Yeh, J. Tsai, Y. Huang, P. Li, “Preparation, characterization and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil”, *Journal of Food and Drug Analysis*, vol.26, no.1, pp.82-89, 2018.
- [47] W. Chong, C. Tan, Y. Cheah, A. Lajis, M. Habi, S. Kanagaratnam, O. Lai, “Optimization of process parameters in preparation of tocotrienol-rich palm oil-based nanoemulsions stabilized by Tween80-Span80 using response surface methodology”, *PLoS One*, vol.13, no.8, e0202771, 2018.
- [48] C. Juárez, J. García, “Structures similar to lipid emulsions and liposomes Dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol, Tween20-Span20 or Tween80-Span80 in aqueous media”, *Journal of Liposome Research*, vol.27, no.2, pp.139-150, 2017.
- [49] N. Leister, H. Karbstein, “Evaluating the stability of Double emulsions- A review of the Measurement Techniques for the Systemic Investigation of Instability Mechanisms”, vol.4, no.8, pp.1-18, 2020.
- [50] M. Koroleva, T. Nagovitsina, E. Yurtov, “Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanism”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol.20, no.15, pp.10369-1037, 2018.
- [51] T. Delmas, H. Piraux, A. Couffin, I. Texier, F. Vinet, P. Poulin, M. Cates, J. Bibette, “How to Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions”, *Langmuir*, vol.27, no.5, pp.1683-1692, 2011.
- [52] S. Uluata, E. Decker, D. McClements, “Optimization of Nanoemulsion Fabricating Using Microfluidization: Role of Surfactant concentration and Stability”, *Food Biophysics*, vol.11, no.1, pp.52-59, 2015.
- [53] S. Tang, M. Sivakumar, “Design and evaluation of aspirin-loaded water-in-oil-in-water submicron multiple emulsions generated using two-stage ultrasonic cavitation emulsification technique”, *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, vol.7, pp.145-156, 2012.
- [54] B. Bamba, J. Shi, C. Tranchant, S. Xue, C. Forney, L. Lim, W. X. G. Xu, “Co-encapsulation of Polyphenols and Anthocyanins from Blueberry Pomace by Double emulsion Stabilized by Whey Proteins: Effect of Homogenization Parameters”, *Molecules*, vol.23, no.10, pp.2525, 2018.
- [55] J. Carpenter, V. Saharan, “Ultrasonic assisted formation and stability of mustard ion in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization”, *Ultrasonic Sonochemistry*, vol.35, pp.422-430, 2017.
- [56] I. Solè, C. Pey, A. Maestro, C. González, M. Porras, C. Solans, J. Gutiérrez, “Nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method: Preparation variables and scale up”, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol.344, pp.417-423, 2010.
- [57] A. Archard, M. Marouche, H. Boisson, “Hydrodynamics and Metzner-Otto correlation in stirred vessels for yield stress fluids”, *Chemical Engineering Journal*, vol.125, no.1, pp.15-24, 2006.
- [58] J. James, M. Cooke, L. Trinh, R. Hou, P. Martin, T. Kowalski, T. Rodgers, “Scale-up of batch rotor stator mixers. Part 1-power constants”, *Chemical Engineering Research and Design*, vol.124, pp.313-320, 2017.
- [59] A. Peshkoysky, S. Peshkoysky, S. Bystryak, “Scalable high-power ultrasonic technology for the production of translucent nanoemulsions”, *Chemical Engineering and Processing*, vol.69, pp.77-82, 2013.
- [60] F. Teng, M. He, J. Xu, F. Chen, C. Wu, Z. Wang, Y. Li, “Effect of ultrasonication on the stability and storage of soy protein isolate-phosphatidylcholine nanoemulsions”, *Scientific Reports*, vol.10, no.1, pp.14010, 2020.
- [61] B. Khadem, N. Sheibat, “Theoretical and experimental investigations of double emulsion preparation by ultrasonication”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol.58, pp.8220-8230, 2019.
- [62] S. Ding, C. Serra, T. Vandamme, W. Yu, N. Anton, “Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective”, *Journal of Controlled Release*, vol.295, pp.31-49, 2019.
- [63] Y. Singh, J. Meher, K. Raval, F. Khan, A. Chaurasia, N. Jain, M. Chourasia, “Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery”, *Journal of Controlled Release*, vol.252, pp.28-49, 2017.
- [64] P. Eslami, L. Davarpanah, F. Vahabzadeh, “Encapsulating role of β -cyclodextrin in formation of Pickering water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing *Lactobacillus delbrueckii*”, *Food Hydrocolloids*, vol.64, pp.133-148, 2017.
- [65] N. Mohammad, H. Saberian, S. Jafari, “Encapsulation of food ingredients by double nanoemulsions” in *Lipid-Based Nanostructures for Food Encapsulation Purposes: Volume 2*, S. Jafari, 1st ed., Academic Press, pp.89-128, 2019.
- [66] A. Araiza, M. Akhtar, A. Sarkar, “Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility”, *Trends in Food Science & Technology*, vol.71, pp.155-169, 2018.
- [67] N. Aditya, S. Aditya, H. Yang, H. Kim, S. Park, S. Ko, “Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion”, *Food Chemistry*, vol.173, pp.7-13, 2015.
- [68] T. Chuacharoen, S. Prasongsuk, C. Sabliov, “Effect of Surfactant Concentrations on Physicochemical Properties and Functionality of Curcumin Nanoemulsions Under Conditions Relevant to Commercial Utilization”, *Molecules*, vol.24, no.15, pp.2744, 2019.
- [69] M. Mehrnia, S. Jafari, B. Makhmal, Y. Maghsoudlou, “Rheological and release properties of double nano-emulsions containing crocin prepared with Angum gum, Arabic gum and whey protein”, *Food Hydrocolloids*, vol.66, pp.259-267, 2017.
- [70] F. González, L. Bravo, “History and present of skin care products, cosmetics and fragrances. Especially those derived from plants”, *Ars Pharmaceutica*, vol.58, no.1, pp.5-12, 2017.
- [71] Business Insider, “Beauty has blown up to be a 532 billion industry analysts say that these 4 trends will make it even bigger”, August 2020. [Online]. Available: <https://www.businessinsider.com/beauty-multibillion-industry-trends-future-2019-7>
- [72] Statista, “Value of the cosmetics market worldwide from 2018 to 2025”, August 2020. [Online]. Available: <https://www.statista.com/statistics/585522/global-value-cosmetics-market/>
- [73] Beauty Packaging, “Top 20 Global Beauty Companies”, August 2020. [Online]. Available: <https://www.beautypackaging.com/heaps/view/6459/1>
- [74] S. Kaul, N. Gulati, D. Verma, S. Mukherjee, U. Nagaich, “Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances”, *Journal of Pharmaceutics*, vol.2018, pp.1-19, 2018.
- [75] L’Oreal, “Beauty Research & Innovation”, August 2020. [Online]. Available: <https://www.loreal.com/en/beauty-science-and-technology/beauty-research-and-innovation>
- [76] R. Patel, M. Patel, S. Thakore, B. Patel, “Nanoemulsion as a valuable nanostructure platform for pharmaceutical drug delivery” in *Nano-and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication*, A. Grumescu, Cambridge, 2017, pp.321-341.
- [77] P. Rocha, M. Ferrari, M. Maruno, O. Souza, “In vitro and In vivo Evaluation of Nanoemulsion Containing Vegetable Extracts”, *Cosmetics*, vol.4, no.32, pp.1-13, 2017.
- [78] S. Nunes, P. Quatrin, M. Rorato, K. Nascimento, R. Wagner, B. Klein, R. Vianna, O. Ferreira, “Evaluation of Stability and In vitro security of Nanoemulsions Containing *Eucalyptus globulus* Oil”, *BioMed Research International*, vol.2017, pp.1-10, 2017.
- [79] S. Lamaisakul, A. Tantituvanont, V. Lipipun, G. Ritthidej, “Development of novel cationic microemulsion as parenteral adjuvant for influenza vaccine”, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.15, no.5, pp.591-604, 2020.
- [80] National Toxicology Program, “Alternative Methods Accepted by US Agencies”, August 2020. [Online]. Available: <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/accept-methods/index.html>
- [81] Food And Drug Administration, “Nanotechnology Programs at FDA”, August 2020. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/science-research/science-and-research-special-topics/nanotechnology-programs-fda>
- [82] M. Maidel Da Luz, R. Vecchi, R. Knapik, “Concentrated composition for cosmetic and/or dermatological treatment for facial application with anti-aging activity”, BRP11105152A2, June 13, 2017.
- [83] D. Brossard, S. Crauste, S. Muhamad, P. Odou, M. Blanco, A. Hermoso, “Method for making a formulation and use thereof for administering polar drugs”, WO20100667035A1, June 17, 2010.
- [84] E. Belser, C. Liechti, F. Suter, F. Züllli, “Zubereitung Bestehend aus mindestens zwei Nanoemulsionen”, EP1516662A1, March 03, 2005.

- [85] S. Gunzburg, "Methods to create a double nanoemulsion for transdermal delivery of hydrophilic and hydrophobic phytochemical active ingredients", AU2018101231A4, September 27, 2018.
- [86] M. Helgeson, S. Mitragotri, M. Zhang, M. Nowak, P. Malo de Molina, "Nanoscale multiple emulsions and nanoparticles", April 04, 2019.
- [87] 黄健花, 陈焱, 王兴国, "Preparation method of catalase solid lipid nanoparticles preparation", December 14, 2011.
- [88] Y. Lee, Y. Lin, "Anti-EGFR Indocyanine Green-Mitomycin C-Loaded Perfluorocarbon double Nanoemulsion: A novel Nanostructure for Targeted Photochemotherapy of Bladder Cancer Cells", *Nanomaterials*, vol.8, no.283, pp.1-18, 2018.
- [89] J. Schwarz, V. Klang, S. Karall, D. Mahrhauser, G. Resch, C. Valenta, "Optimisation of multiple W/O/W nanoemulsions for dermal delivery of acyclovir", *International Journal of Pharmaceutics*, vol.435, pp.69-75, 2012.
- [90] F. Shakeel, N. Haq, A. Al-Dhfyhan, F. Alanazi, I. Alsarra, "Double W/O/W nanoemulsion of 5-fluorouracil for self-nanoemulsifying drug delivery system", *Journal of Molecular Liquids*, vol.200, pp.183-190, 2014.
- [91] E. Sigward, Y. Corvis, B. Doan, K. Kindsiko, J. Seguin, D. Scherman, D. Brossard, N. Mignet, P. Espeau, S. Manciet, "Preparation and Evaluation of Multiple Nanoemulsions Containing Gadolinium (III) Chelate as a Potential Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agent", *Pharmaceutical Research*, vol.32, no.9, pp.2983-2994, 2014.
- [92] X. Li, J. Qi, Y. Xie, X. Zhang, S. Hu, Y. Xu, Y. Lu, W. Wu, "Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization, and hypoglycemic effect in rats", *International Journal of Nanomedicine*, vol.8, pp.23-32, 2012.
- [93] S. Patel, Y. Zhang, J. Pollock, J. Janjic, "Cyclooxygenase-2 Inhibiting Perfluoropoly (Ethylene glycol) Ether Theranostic Nanoemulsions-*In vitro* study", *PLoS One*, vol.8, no.2, e55802, 2013.
- [94] U. Bazylinska, J. Kulbacka, G. Chodaczek, "Nanoemulsion Structural Design in Co-Encapsulation of Hybrid Multifunctional Agents: Influence of the Smart PLGA Polymers on the Nanosystem-Enhanced Delivery and Electro-Photodynamic Treatment", *Pharmaceutics*, vol.11, no.405, pp.1-15, 2019.



Felipe Andrés Silva Jerez. Ingeniero Civil en Biotecnología (Universidad San Sebastián, Chile. 2010-2017). Candidato a Máster en Innovación en Biociencias y BioIngeniería (Universidad San Sebastián, Chile. 2018-2021). Actualmente realiza su proyecto de tesis "Nanoemulsión con propiedades biomédicas a base de los compuestos bioactivos curcumina y micosporina para aplicaciones en el ámbito cosmético y del cuidado de la piel". Sus intereses se centran en el desarrollo de nanoemulsiones y sistemas coloidales.



Patricio Alejandro Oyarzún Cayo. Ph.D en Biotecnología (University of Queensland, Australia. 2009-2012). Máster en Ciencias de la Ingeniería con Mención en Ingeniería Bioquímica (Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 1998-2001). Bioquímico (Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 1990-1996). Director de Investigación de la Universidad San Sebastián sede Tres Pascualas, Concepción (Chile). Sus intereses se centran en los ámbitos de la Inmunoinformática y Nanobiotecnología.

