

FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF OIL-IN-WATER MICROEMULSIONS FOR ENHANCED SOLUBILITY AND STABILITY OF CURCUMIN

Laura Eugenia Romero Robles¹, Margarita Sánchez Domínguez² y Fernando García Escobar¹

¹Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey, Departamento de Química y Nanotecnología

²Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C., Unidad Monterrey

Abstract -- Curcumin is a natural pigment found in turmeric, a perennial member of the Zingiberaceae family cultivated in southeast Asia, where it has been used since ancient times in natural therapies. Turmeric's rhizome, contains a group of natural pigments called curcuminoids, which make up from 2 - 6% of the stem and are responsible its characteristic yellow - orange coloration. The three pigments contained in turmeric are curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, with curcumin being the most abundant of the three at 77% of the overall average amount of the curcuminoids present in turmeric. These compounds have demonstrated antioxidant, antiinflammatory and anticarcinogenic properties with potential therapeutic applications, but their low solubility in water and rapid metabolism has limited their incorporation in pharmaceutical and nutraceutical formulations.

There are three main alternatives proposed to increase curcumin's solubility in water: its administration with adjuvants or compounds that will help increase curcumin's uptake, like piperine or turmeric oil; incorporation in polymeric nanoparticles that can be easily degraded by the body or its incorporation in liquid dispersions where, under the right conditions, preparation costs can be limited only to the dispersion's components. Microemulsions in particular are liquid dispersions with high solubilization potential and are composed of water, oil and a surfactant. They have an average droplet size of 2-50 nm and are thermodynamically stable, meaning they will remain dispersed if the remains under the correct conditions.

This study contemplates proposing and researching a new pseudoternary system employing an oil and nonionic surfactant already used in nutraceutical or pharmaceutical formulations in order to formulate oil-in-water microemulsions with potential anticarcinogenic activity. The solubility limit of curcumin on those dilution lines was determined first, then viscosity and electric conductivity measurements yielded information regarding the compositions where microstructure transitions occur, whereas studying the dispersions' mean droplet size on a set period proved the stability of the system even with curcumin dissolved.

Finally, the mixtures were evaluated on their capacity to remain stable on the presence of cell culture medium and their cytotoxic activity on a carcinogenic cell line, with the curcumin-loaded microemulsions inhibiting cell growth completely at curcumin concentrations up to 9 µg/mL.

Summarizing, curcumin-loaded microemulsions were formulated with the ternary system comprised of Water:Butyl (-) lactate:Brij® O10. The pseudoternary system was characterized by studying curcumin's solubility in the microemulsions, their viscosity, electric conductivity, mean droplet size, stability and cytotoxic activity on carcinogenic cells in order to incorporate the formulations into future nutraceutical and pharmaceutical therapies that may better harness curcumin's beneficial properties.

Keywords-- Curcumin, microemulsion, phasic behavior, solubility, stability.

Digital Object Identifier (DOI):

<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2019.1.1.224>

ISBN: 978-0-9993443-6-1 ISSN: 2414-6390

Formulación y caracterización de microemulsiones aceite-en-agua para incrementar la solubilidad y estabilidad de curcumina.

Laura Eugenia Romero Robles¹, Margarita Sánchez Domínguez² y Fernando García Escobar¹

¹Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey, Departamento de Química y Nanotecnología

²Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C., Unidad Monterrey

Resumen: La curcumina es un compuesto natural que ha demostrado tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Sin embargo, su baja solubilidad en agua y baja biodisponibilidad han limitado sus aplicaciones potenciales, por lo que su incorporación en microemulsiones es una propuesta para incrementar su solubilidad y estabilidad en medio acuoso. En la presente investigación se estudió el sistema compuesto por Agua:(-) Lactato de butilo:Brij R O10 (Polioxietileno 10 oleil éter) con el objetivo de formular microemulsiones aceite-en-agua de curcumina con potencial actividad anticancerígena. El sistema se caracterizó mediante el estudio de su comportamiento físico, su capacidad para disolver curcumina y sus propiedades de viscosidad, conductividad eléctrica y tamaño de gota en función de su composición, así como la estabilidad coloidal de la dispersión en presencia de medio biológico.

Palabras clave: Curcumina, microemulsión, comportamiento físico, solubilidad, estabilidad

INTRODUCCIÓN

La curcumina es el principal pigmento natural en el rizoma de la cúrcuma y ha demostrado tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas [1–3]. Sin embargo, su baja solubilidad en agua y absorción en el organismo ha limitado su aplicación en terapias farmacológicas o nutraceuticas.

Estudios previos de biodisponibilidad de curcumina que se han realizado en pacientes humanos han reportado que su concentración detectada en el organismo es menor al 99.99 % de la dosis administrada debido a su baja solubilidad en medio acuoso y a una rápida metabolización [4]. Dichos resultados se presentan en la Tabla 1, en donde el porcentaje de curcumina detectado está en el orden de la diezmilésima parte de la cantidad administrada inicialmente.

Es por ello que se han propuesto alternativas para incrementar su solubilidad en agua y su absorción en el organismo, como lo son su administración con adyuvantes, su incorporación en nanopartículas poliméricas y su incorporación en dispersiones líquidas como lo son las microemulsiones [4, 5].

Digital Object Identifier (DOI):

<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2019.1.1.224>

ISBN: 978-0-9993443-6-1 ISSN: 2414-6390

17th LACCEI International Multi-Conference for Engineering, Education, and Technology: “Industry, Innovation, And Infrastructure for Sustainable Cities and Communities”, 24-26 July 2019, Jamaica.

Tabla 1: Niveles de curcumina medidos en humanos posterior a la administración de curcumina vía oral.

Dosis	Muestra	Cur. disuelta (%)	Ref.
2000 ppm	Suero	0.0003	[6]
3.6 g	Plasma	0.0001	[7]
3.6 g	Colon	0.0001	[8]

Las microemulsiones son dispersiones líquidas transparentes y ópticamente isotrópicas de dos líquidos inmiscibles, las cuales son estabilizadas termodinámicamente por una monocapa de surfactante con propiedades hidrofílicas y lipofílicas balanceadas [9]. Éste tipo de dispersiones son de especial interés, puesto que pueden aumentar de manera considerable la solubilidad de componentes tanto lipofílicos como hidrofílicos.

Dependiendo del balance hidrofílico - lipofílico del sistema y de la relación aceite/agua, se pueden formar microemulsiones aceite-en-agua (O/W), agua-en-aceite (W/O) o bicontínuas con canales de ambas fases interconectados en una estructura semejante a la de una esponja [10], como puede observarse en la Figura 1.

Dentro de estudios previos en los que se incorpora curcumina en microemulsiones aceite-en-agua, se han empleado aceites vegetales o tensoactivos de grado nutraceutico con el fin de aplicar dichos sistemas en estudios con aplicación biológica, como lo son la entrega transdérmica de curcumina [11], la verificación citotóxica en una línea celular cancerígena [12],

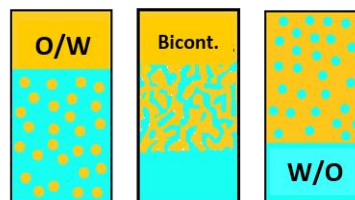


Figura 1: Estructuras de microemulsión agua-en-aceite (W/O, izquierda), aceite-en-agua (O/W, derecha) y una bicontínua (Bicont.) en el centro. Se trata de sistemas Winsor, en los cuales las microemulsiones se encuentran en equilibrio con una fase en exceso.

mejorar la absorción oral de curcumina [13] o el tratamiento de psoriasis [14].

Es por ello que el objetivo principal del presente trabajo fue estudiar un nuevo sistema pseudoternario para formular microemulsiones aceite-en-agua de curcumina utilizando aceites y surfactantes no - iónicos de grado nutracéutico con potencial actividad anticancerígena. Y de manera más específica, caracterizar el sistema a través de su comportamiento fásico, su capacidad de disolver curcumina y sus propiedades físicas de viscosidad, conductividad eléctrica, tamaño de gota y su estabilidad en presencia de medio biológico.

EXPERIMENTACIÓN

2.1. Reactivos

Se utilizó extracto de curcumina en polvo de *Curcuma longa* (76 % - 77 %) adquirida de Sigma Aldrich, agua desionizada con una resistividad de $18.1 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ en toda instancia y medio biológico RPMI de Sigma Aldrich en sustitución de agua en las pruebas de estabilidad coloidal. Para las mediciones de UV - Vis, etanol absoluto (99.95 %) de VWR Chemicals fue utilizado como solvente.

En el estudio de los sistemas ternarios se se utilizó (-) Lactato de butilo (97.6 %) adquirido de Sigma Aldrich como aceite, muestras comerciales de Polioxietileno 10 oleíl éter (®Brij O10) recibidas de Croda México, S.A. de C.V. como surfactante, mientras que para las mediciones de conductividad se utilizó Brij R O10 de Sigma Aldrich.

2.2. Instrumentación

Para la determinación del límite de solubilidad de curcumina en cada solvente por separado mediante espectroscopia UV - Vis se utilizó una centrífuga (Modelo 5810 R) de Eppendorf y un espectrofotómetro UV - Vis Optizen POP de Mecasys.

En el estudio del comportamiento fásico de las muestras a distintas temperaturas se utilizó una incubadora digital MyTemp Mini de Benchmark Scientific.

En la caracterización de propiedades físicas se utilizó un reómetro AR - G2 de TA Instruments para viscosidad, un conductímetro Orion Star A212 de Thermo Scientific para conductividad eléctrica y un Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments para tamaño de gota y potencial zeta.

2.3. Metodología experimental

2.3.1. Preparación de microemulsiones

Los componentes se añadieron en orden de surfactante, aceite y agua para todas las muestras preparadas. Posteriormente se agregó curcumina y se agitó con vórtex y se sonicó hasta presentar una apariencia homogénea y libre de turbidez.

2.3.2. Estudio de comportamiento fásico

Se prepararon muestras de distinta composición con una masa total de 2g. Las muestras se incubaron a 25°C y 37°C por una noche para cada temperatura estudiada; y se examinaron visualmente para clasificarlas conforme su apariencia física. Las muestras fluídas con apariencia transparente y homogénea se clasificaron como microemulsiones.

2.3.3. Análisis UV - Vis

La curva de calibración para la cuantificación de curcumina por esta técnica se construyó partiendo de una solución de 1 mg/mL de curcumina en etanol, la cuál se diluyó (1:10 volumen) para obtener una solución de $100 \mu\text{g/mL}$. De ésta solución se tomaron alícuotas para obtener soluciones de concentración 1, 5, 10, 20, 30, 50 y $70 \mu\text{g/mL}$ [14].

La solubilidad de la curcumina en los solventes por separado se midió añadiendo curcumina hasta sobresaturación de una muestra de 2g de solvente.

La muestra fue centrifugada a 4000 rpm y el sobrenadante resultante fue diluido 1:1000 (volumen) con etanol.

Todas las muestras se analizaron a una longitud de onda de 422 nm correspondiente al máximo de absorción de curcumina en etanol previamente determinado.

2.3.4. Mediciones de viscosidad

Se prepararon muestras de 15g de cantidad variable de agua de 10 a 90 % sin curcumina. Se siguió un procedimiento en flujo en el cual la muestra se acondicionó a 25°C y se midió su viscosidad siguiendo una rampa de calentamiento hasta 40°C a una razón de 1°C/s con una tasa de cizallamiento de 10 s^{-1} en una geometría de cilindros concéntricos de doble pared.

2.3.5. Mediciones de conductividad eléctrica

Se prepararon dos muestras de 10g de una mezcla binaria de (-) Lactato de butilo:Brij R O10 de proporciones máxicas 1:1 y 3:7, a las cuales se les agregó el 90 % de la cantidad máxima de curcumina de acuerdo con las Ecuaciones 5 y 6.

Se midió la conductividad eléctrica de las muestras a través de diluciones seriadas con intervalos de 5 % (P/P) de agua hasta una mezcla 95 % agua [15]. Las mediciones se realizaron a 25°C y 37°C .

2.3.6. Mediciones de DLS

Se prepararon muestras de 5g de cantidad variable de agua de 10 a 90 % en intervalos de 10 % para las líneas de dilución con agua de mezclas binarias (-) Lactato de butilo:Brij R O10 de proporción 1:1 y 3:7 en peso. A estas muestras se les agregó el 90 % de la cantidad máxima de curcumina de acuerdo con las Ecuaciones 5 y 6.

Las muestras se midieron por triplicado con un detector a 173° con respecto al láser incidente a una temperatura de 37°C.

2.3.7. Estabilidad coloidal

Se partió de muestras de 3 g de composición másica 1:1 y 3:7 (relación (-) Lactato de butilo:Brij R O10), las cuales se diluyeron con medio biológico en vez de agua hasta alcanzar una composición 85 % medio. De ésta muestra posteriormente se tomó una alícuota de 5g, la cual se diluyó hasta alcanzar un porcentaje de 95 % medio. Las muestras se incubaron a 25°C y 37°C para determinar su comportamiento fásico y se analizó su tamaño de gota a 37°C habiendo transcurrido 11 días desde su preparación.

RESULTADOS Y DISCUSION.

En la Figura 2 se muestra la curva de calibración utilizada en la cuantificación de curcumina en etanol por espectroscopia UV - Vis a 422 nm, en donde el coeficiente de correlación del ajuste es de 0.99985. Los límites de solubilidad de la curcumina en los componentes individuales de los sistemas estudiados se reportan en la Tabla 2 a partir del ajuste obtenido de la curva de calibración.

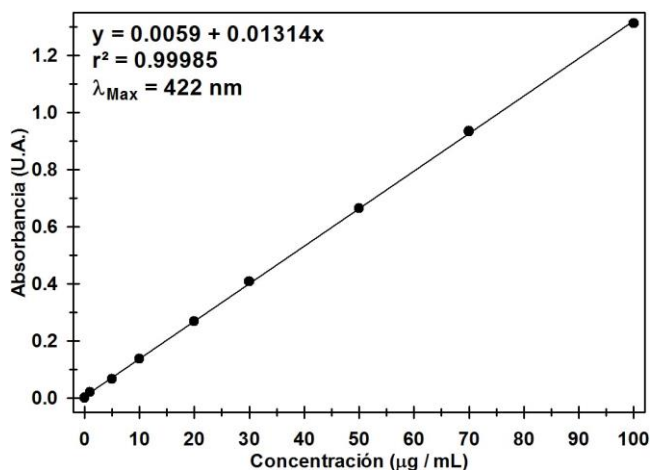


Figura 2: Curva de calibración utilizada para determinar la concentración de curcumina en etanol por espectroscopia UV - Vis.

Tabla 2: Límites de solubilidad determinados de curcumina en los componentes del sistema ternario por separado mediante espectroscopia UV - Vis.

Componente	mg/mL	mg/g	%P/P
(-) Lactato de butilo	14.467	15.01	1.48
Brij ® O10	51.758	57.51	5.44

Una vez determinado el límite de solubilidad en el aceite y surfactante se estudió el comportamiento fásico en la región acuosa del diagrama de fases. La cantidad de curcumina máxima a agregar por muestra se determinó mediante la Ecuación 1, en donde L indica el límite de solubilidad en el solvente y M la cantidad en masa de dicho componente. Los subíndices S y O representan surfactante y aceite, respectivamente.

$$C = L_S M_S + L_O M_O \quad (1)$$

El resultado se muestra en la Figura 3, en donde el comportamiento fásico observado se asemeja al delimitado por las líneas rojas [16] al presentar fases de cristal líquido, microemulsión y multifase en los dominios del diagrama. A 37°C la región de multifase incrementa su área y la región de microemulsión se vuelve más estrecha.

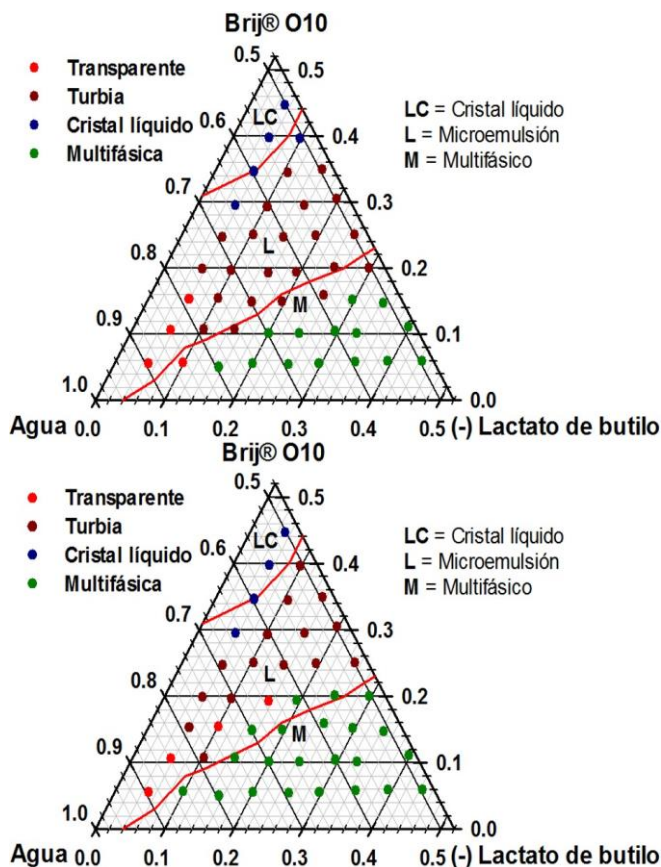


Figura 3: Comportamiento fásico observado del sistema Agua:(-)Lactato de butilo:Brij R O10 a 25°C (arriba) y 37°C (abajo). Se muestra únicamente la región acuosa del diagrama de fases [16].

Las muestras con apariencia turbia revelaron curcumina precipitada una vez que las fases se separaron y una fase de microemulsión transparente y homogénea, por lo que se buscó determinar el límite de solubilidad en las microemulsiones. Adicionalmente se estudiaron dos líneas de dilución que abarcan la región de microemulsión en el diagrama con proporciones másicas de 1:1 y 3:7 de aceite:surfactante, respectivamente. Estas líneas parten de la mezcla binaria aceite:surfactante y pueden ser diluidas infinitamente con agua como se muestra en la Figura 4. Debido a que precipitó curcumina en las muestras preparadas para estudiar el comportamiento fásico (Figura 3), se introdujo un término que involucra la

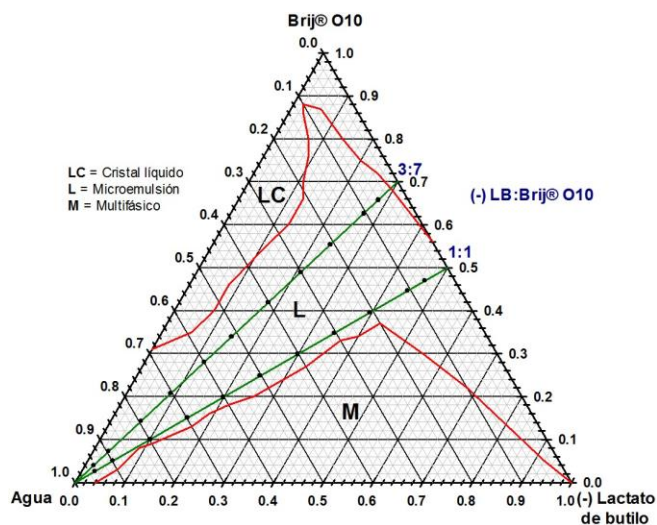


Figura 4: Líneas de dilución estudiadas del sistema Agua:(-) Lactato de butilo:Brij R O10 de proporciones másicas (aceite:surfactante) 1:1 y 3:7.

fracción de agua en la muestra (ϕ), como se muestra en la Ecuación 2.

$$C = (L_S M_S + L_O M_O)(1 - \phi) \quad (2)$$

Asumiendo 1g de muestra, la cantidad de cada componente se puede expresar como se muestra en las Ecuaciones 3 y 4.

$$C_{1:1} : M_O = 0,5(1 - \phi); M_S = 0,5(1 - \phi) \quad (3)$$

$$C_{3:7} : M_O = 0,3(1 - \phi); M_S = 0,7(1 - \phi) \quad (4)$$

Al insertar estas sustituciones en la Ecuación 2, el término $(1 - \phi)$ puede factorizarse y dar como resultado las Ecuaciones 5 y 6, en donde la variable M ajusta la cantidad de curcumina para cualquier cantidad de muestra.

$$C_{1:1} = 0,5M(L_S + L_O)(1 - \phi)^2 \quad (5)$$

$$C_{3:7} = M(0,7L_S + 0,3L_O)(1 - \phi)^2 \quad (6)$$

La Figura 5 presenta el comportamiento de las Ecuaciones 5 y 6 en porcentaje en peso para generalizar las expresiones a cualquier cantidad de muestra, y puede observarse que los valores determinados experimentalmente de la máxima cantidad de curcumina solubilizada en las muestras hasta precipitación obedecen la tendencia del comportamiento de las curvas.

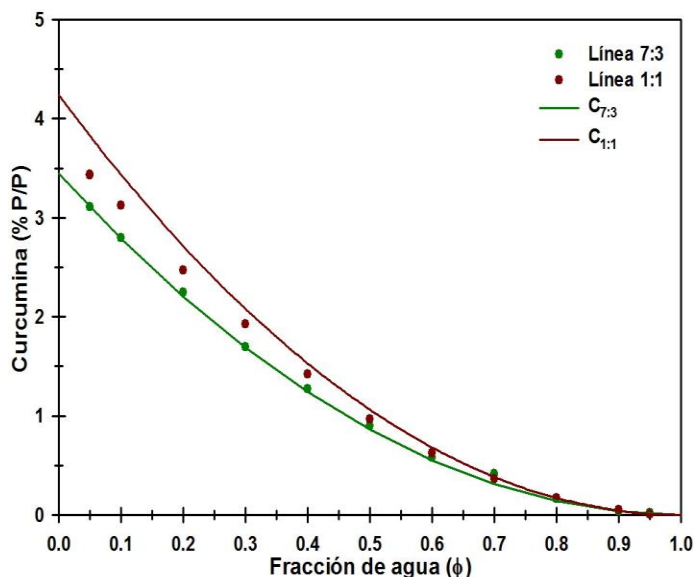


Figura 5: Máxima solubilidad observada (puntos) de curcumina en las líneas de dilución estudiadas 7:3 y 1:1 (surfactante:aceite) del sistema Agua:(-) Lactato de butilo:Brij®O10. Las líneas continuas verde y roja representan las Ecuaciones 5 y 6, respectivamente O10.

La viscosidad de las líneas de dilución en función de la cantidad de agua se reporta en la Figura 6, en donde los puntos de interés se encuentran en las composiciones alrededor de las áreas rojas. Se propone que dichas composiciones representan regiones de percolación de las dispersiones para dar lugar a una estructura bicontinua [15]. Para complementar esta medición, se estudió el comportamiento de la conductividad eléctrica de las líneas en función de la composición.

Las mediciones de conductividad a 25°C y 37°C de las líneas de dilución reportadas en la Figura 4 se muestran en la Figura 7, en donde se incrementa el porcentaje de agua en el sistema en 5 %. Iniciando en un sistema agua - en - aceite, alrededor de 15 - 25 % agua se observa un incremento en la conductividad debido la percolación de gotas de agua en el sistema [15, 17]. Posteriormente se observa un incremento en la conductividad en un sistema bicontinuo, y se llega a un máximo alrededor de 60 % agua correspondiente a un sistema aceite-en agua. El incremento a la conductividad debido a la temperatura se debe a que aumenta la movilidad de los acarreadores [17].

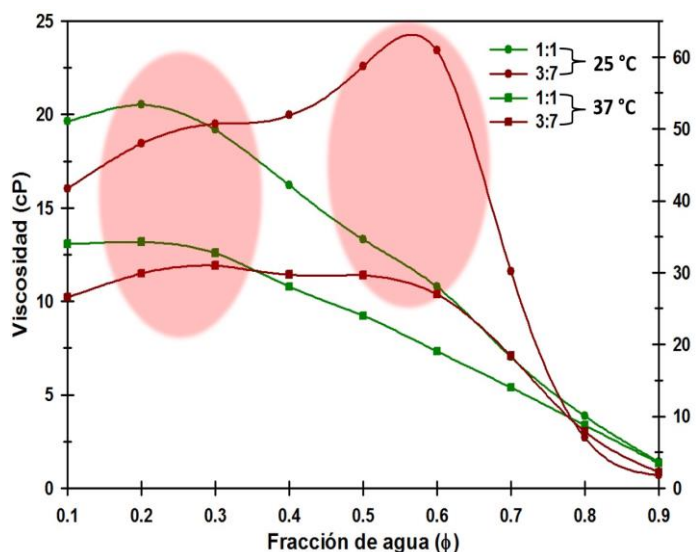


Figura 6: Mediciones de viscosidad en función de la cantidad de agua de las líneas de dilución estudiadas del sistema ternario Agua:(-) Lactato de butilo:Brij R O10 a 25 °C y 37°C. Las áreas rojas indican las regiones de interés.

El umbral de percolación se reporta en la Tabla 3, e indica la composición a partir de la cual ocurre una transición a estructura bicontinua conforme se incrementa la fracción de agua en la línea de dilución presentada como la región roja alrededor de 30 % agua en la Figura 7.

Tabla 3: Fracciones de agua las líneas de dilución estudiadas a las cuales se presentan los umbrales de percolación a 25°C y 37°C.

Temperatura (°C)	Línea ϕ (Fracción)	
25	1:1	0.3
	3:7	0.25
37	1:1	0.3
	3:7	0.2

El tamaño de gota de muestras en la línea de dilución se reporta en la Figura 8, el cual en ninguna condición sobrepasa los 50 nm [18]. Además, en la Tabla 4 se reportan los tamaños de gota de las muestras diluidas con medio biológico en vez de

agua, los cuales de igual forma no presentan un tamaño mayor a 50 nm aún y a 11 días posteriores a su preparación. Por lo cual se puede afirmar que las microemulsiones estudiadas presentan una adecuada estabilidad al interactuar con medio de cultivo y por lo tanto es posible realizar ensayos biológicos de interacción con células.

A través del estudio del comportamiento físico del sistema, se logró determinar las composiciones en las que ocurren las transiciones estructurales de las microemulsiones mediante mediciones de viscosidad y conductividad eléctrica, las cuales se encuentran alrededor del 25 % y 60 % de agua para ambas líneas de dilución.

Finalmente, el comportamiento del tamaño de gota en función de la cantidad de agua en el sistema nunca sobrepasó los 50 nm aún y en presencia de medio biológico a 11 días después de haber formulado las muestras, lo que demuestra la estabilidad coloidal de las microemulsiones con curcumina en presencia de medio de cultivo y la posibilidad de realizar ensayos biológicos.

Tabla 4: Tamaño de gota de las muestras diluidas con medio biológico a 11 días después de su formulación.

Línea	ϕ (Fracción)	d (nm)
1:1	0.85	-
	0.95	16.79
3:7	0.85	14.44
	0.95	44.26

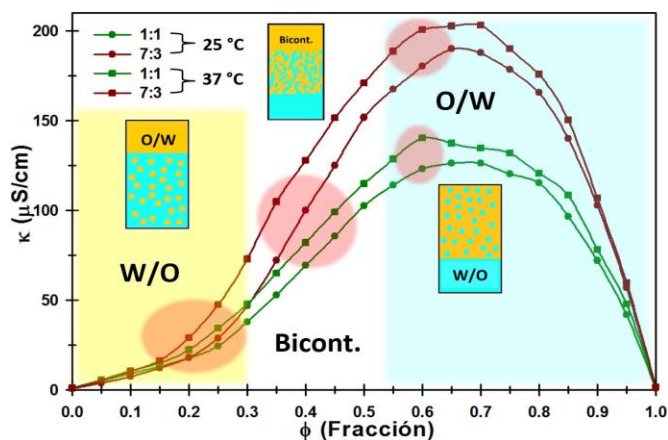


Figura 7 Mediciones de conductividad en función de la cantidad de agua de las líneas de dilución estudiadas del sistema ternario Agua:(-) Lactato de butilo:Brij R O10 a 25°C y 37°C. Las marcas rojas indican las regiones de interés.

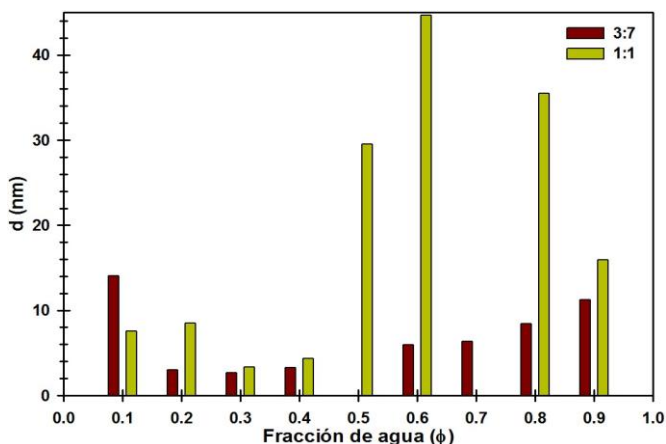


Figura 8 Tamaño de gota calculado a 37°C para las dos líneas de dilución estudiadas.

CONCLUSIONES

Se logró formular microemulsiones con el sistema ternario compuesto por Agua:(-) Lactato de butilo:Brij®O10 a las cuales se les pudo incorporar curcumina llegando a límites de solubilidad de 3.11 % y 3.43 % (%P/P) para las dos líneas de dilución estudiadas.

TRABAJO A FUTURO

Como trabajo a futuro, se propone determinar el límite de solubilidad de curcumina en las líneas de dilución mediante espectroscopia UV - Vis, así como mediciones de conductividad en función de la temperatura en las líneas de dilución para complementar los estudios realizados a las temperaturas reportadas, la cuantificación de curcumina en

función del tiempo para estudiar su posible degradación en la dispersión y la determinación del LD₅₀ mediante pruebas de inhibición de crecimiento celular.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de la M.C. Lilia Bautista y la M.C. Patricia Cerda en la realización de los análisis de DLS y viscosidad, respectivamente; así como a la Dra. Celia Nohemí Sánchez Domínguez por proporcionarnos el medio biológico utilizado en el estudio del sistema.

REFERENCIAS

- [1] G. Jayaprakasha, L. J. Rao, and K. Sakariah, "Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin," *Food Chemistry*, vol. 98, no. 4, pp. 720 – 724, 2006.
- [2] S. Ghosh, S. Banerjee, and P. C. Sil, "The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 83, pp. 111 – 124, 2015.
- [3] S. Yodkeeree, W. Chaiwangyen, S. Garbisa, and P. Limtrakul, "Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin differentially inhibit cancer cell invasion through the down-regulation of {MMPs} and upa," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 20, no. 2, pp. 87 – 95, 2009.
- [4] P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman, and B. B. Aggarwal, "Bioavailability of curcumin: Problems and promises," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 4, no. 6, pp. 807–818, 2007. PMID: 17999464.
- [5] S. Rivera-Mancía, M. C. Lozada-García, and J. Pedraza-Chaverri, "Experimental evidence for curcumin and its analogs for management of diabetes mellitus and its associated complications," *European Journal of Pharmacology*, vol. 756, pp. 30 – 37, 2015.
- [6] G. Shoba, D. Joy, T. Joseph, M. Majeed, R. Rajendran, and P. S. S. R. Srinivas, "Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers," *Planta Med*, vol. 64, no. 04, pp. 353–356, 1998.
- [7] R. A. Sharma, S. A. Euden, S. L. Platton, D. N. Cooke, A. Shafayat, H. R. Hewitt, T. H. Marczylo, B. Morgan, D. Hemingway, S. M. Plummer, M. Pirmohamed, A. J. Gescher, and W. P. Steward, "Phase i clinical trial of oral curcumin: Biomarkers of systemic activity and compliance," *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 20, pp. 6847–6854, 2004.
- [8] G. Garcea, D. P. Berry, D. J. Jones, R. Singh, A. R. Dennison, P. B. Farmer, R. A. Sharma, W. P. Steward, and A. J. Gescher, "Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: Assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 14, no. 1, pp. 120–125, 2005.
- [9] I. Danielsson and B. Lindman, "The definition of microemulsion," *Colloids and Surfaces*, vol. 3, no. 4 , pp. 391–392, 1981.
- [10] B. K. Paul and S. P. Moulik, "Uses and applications of microemulsions," *CURRENT SCIENCEBANGALORE-*, vol. 80, no. 8, pp. 990–1001, 2001.
- [11] A. C. Sintov, "Transdermal delivery of curcumin via microemulsion," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 481, no. 1–2, pp. 97 – 103, 2015.
- [12] C.-C. Lin, H.-Y. Lin, M.-H. Chi, C.-M. Shen, H.W. Chen, W.-J. Yang, and M.-H. Lee, "Preparation of curcumin microemulsions with food-grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the hepg2 cell line," *Food Chemistry*, vol. 154, pp. 282 – 290, 2014.
- [13] L. Hu, Y. Jia, F. Niu, Z. Jia, X. Yang, and K. Jiao, "Preparation and enhancement of oral bioavailability of curcumin using microemulsions vehicle," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60 , no. 29, pp. 7137–7141, 2012. PMID: 22587560.
- [14] P. Viral, M. Sneha, B. Patel, and S. Parmar, "Formulation and characterization of microemulsion based gel of curcumin for the management of plaque psoriasis.," *Original research article*.
- [15] R. Cretu, C. Dima, G. Bahrim, and S. Dima, "Improved solubilization of curcumin with a microemulsification formulation," *The Annals of the University of Dunarea de Jos of Galati.Fascicle VI.Food Technology*, vol. 35, no. 2, pp. 46–55, 2011.

-
- [16] M. Sanchez-Dominguez, H. Koleilat, M. Boutonnet, and C. Solans, "Synthesis of pt nanoparticles in oil-in-water microemulsions: Phase behavior and effect of formulation parameters on nanoparticle characteristics," *Journal of Dispersion Science and Technology*, vol. 32, no. 12, pp. 1765–1770, 2011.
- [17] G. Kaur, L. Chiappisi, S. Prévost, R. Schweins, M. Gradzielski, and S. K. Mehta, "Probing the microstructure of nonionic microemulsions with ethyl oleate by viscosity, roesy, dls, sans, and cyclic voltammetry," *Langmuir*, vol. 28, no. 29, pp. 10640 – 10652, 2012. PMID: 22720716.
- [18] H.-Y. Lin, J. Thomas, H.-W. Chen, C.-M. Shen, W.-J. Yang, and M.-H. Lee, "In vitro suppression of oral squamous cell carcinoma growth by ultrasound-mediated delivery of curcumin microemulsions," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 7, p. 941–951, 2012.