

DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA LA ENCAPSULACIÓN, PROTECCIÓN Y LIBERACIÓN DIRIGIDA DE QUERCETINA, UN POTENTE ANTIOXIDANTE

DEVELOPMENT OF POLYMERIC NANOPARTICLES TO ENCAPSULATE, PROTECT AND CONTROL DELIVER QUERCETIN, A POTENT ANTIOXIDANT.

*Héctor Reyes Pool,
Sandra Mendoza Díaz,
Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña,
Departamento de Investigación y
Posgrado en Alimentos, Facultad de
Química, Universidad Autónoma
de Querétaro.*

*David Quintanar Guerrero,
Laboratorio de Posgrado en
Tecnología Farmacéutica, UNAM.*

*Juan de Dios Figueroa Cardénas,
Centro de Investigación y Estudios
Avanzados, IPN.*

*Luis Arturo Godínez Mora Tovar y
Centro de Investigación y
Desarrollo en Electroquímica, S.C.*

*David Julian McClements,
Biopolymers and Colloids Research
Laboratory, Department of Food
Science, University of
Massachusetts.*

*Autor para correspondencia:
smendoza@uaq.mx*

Fecha de recepción: 20/08/2012
Fecha de aceptación: 24/01/2013

Resumen

Actualmente, la incorporación de compuestos bioactivos para la formulación de productos benéficos e innovadores para la salud humana es un tema de gran interés en las industrias farmacéutica, alimentaria y de cosméticos. La aplicación de sistemas novedosos que ayuden a mantener estables los compuestos bioactivos dentro de estos productos y que garanticen el efecto biológico dentro de un sistema específico, como el del cuerpo humano, es un gran reto para las industrias queretanas hoy en día. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de sistemas innovadores de liberación basados en nanopartículas (NPs) para la encapsulación y administración controlada de flavonoides como la quercetina (QC), un potente antioxidante con propiedades biológicas importantes para el mejoramiento de la salud humana. En este contexto, se encapsuló QC en NPs poliméricas de Eudragit L30-D55 (Eudragit), presentando tamaños submicrométricos y una carga superficial negativa que les provee estabilidad en

dispersiones acuosas. Además, las NPs otorgaron protección y mejoraron la bioaccesibilidad y actividad antioxidante de este flavonoide dentro del tracto gastrointestinal simulado, en comparación con el flavonoide no encapsulado. El conocimiento obtenido de este estudio, facilitará el desarrollo racional y fabricación de sistemas de liberación para la encapsulación, protección y administración de compuestos bioactivos, como los antioxidantes, generando así, una avenida para la investigación y desarrollo de sistemas de liberación que traerán consigo, un gran beneficio de aplicación para consumidores y para industrias farmacéuticas o alimentarias del estado de Querétaro.

Palabras clave: quercetina, liberación controlada, capacidad antioxidante, digestión in vitro, bioaccesibilidad.

Abstract

Currently, the use of bioactive compounds to formulate novel products to enhance human

health and wellness, has gained a great interest in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. The design of novel delivery systems that keep stable the bioactive compounds in a specific system, such as the human body, constitute a great challenge for the industries in Queretaro. It is in this context that the aim of this work is the development of delivery systems based in polymeric nanoparticles (NPs) for the encapsulation and controlled release of flavonoids, such as quercetin (QC), which is an excellent antioxidant with remarkable biological properties to be used for the improvement of human health. We successfully incorporated QC into Eudragit L30-D55 (Eudragit) NPs, with submicron diameters and negative electrical charge that provided stability in aqueous dispersion. In addition, the developed nanoparticles provided protection and improved the release, bioaccessibility and antioxidant capacity of quercetin within the gastrointestinal tract, when compared to the non-encapsulated flavonoid. The knowledge obtained from this study will facilitate the rational design and fabrication of polymeric nanoparticles as delivery systems for the encapsulation, protection, and release of bioactive compounds, such as antioxidants. The development of novel delivery systems will therefore result in potential benefits to the consumers and to the pharmaceutical and food industries of the state of Queretaro.

Keywords: quercetin, controlled delivery, antioxidant capacity, in vitro digestion, bioaccessibility.

Introducción

Recientemente, debido a las excelentes propiedades biológicas que presentan algunos compuestos bioactivos, se ha incrementado el interés por el estudio e incorporación de estos componentes para la formulación de productos alimentarios o farmacéuticos (Almeida y col. 2010; Darvesh y col. 2010; Roedig-Penman y Gordon, 1997). La quercetina (**Figura 1A**) es un flavonoide que ha demostrado tener propiedades anti-cancerígenas, antimutagénicas, apoptóticas, anti-ateroescleróticas, antidiabéticas, anti-inflamatorias, anti-bacterianas y anti-virales, entre otras (Tsuchiya, 1999; Narayana y col. 2001; Murase y col. 2002; Koo y Cho, 2004). Debido a estas propiedades, la quercetina (QC) ha sido objeto de estudio para la formulación de productos orientados a promover la salud humana (Roedig-Penman y col. 1997; Balasundram y col. 2006). Sin embargo, su uso se ha limitado por factores como su baja solubilidad en agua, inestabilidad en condiciones encontradas durante el procesamiento de productos y baja bioaccesibilidad o biodisponibilidad (Patel y col. 2010). Además, algunos estudios han mostrado que la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de QC disminuye durante su paso por el tracto gastrointestinal (TGI), debido a los cambios de pH e interacciones con enzimas (Record y Lane, 2001; Zhang y Kosaraju, 2007). Todos estos factores limitan la actividad biológica y los potenciales beneficios a la salud de este flavonoide (Borghetti y col. 2009). En los últimos años, diversos sistemas de liberación han sido diseñados para la administración dirigida de diferentes compuestos bioactivos dentro del TGI y colon (Janovská y col. 2006; Luppi y col. 2008; Patel y col. 2010). Aunque se han obtenido resultados prometedores con sistemas de liberación desarrollados a base de polisacáridos y proteínas, el uso de estos materiales de pared requiere de pasos previos para la formación de micro o nanopartículas. Por ejemplo, las reacciones de entrecruzamiento (asistidas por pH o temperatura) o modificaciones químicas en el material de pared

necesarias para resistir las condiciones ácidas del estómago, pueden generar degradación del compuesto a encapsular (Yang y col. 2002; Zhang y Kosaraju, 2007; Luppi y col. 2008; Oosegi y col. 2008). El uso de materiales biocompatibles que no requieran de reacciones previas puede reducir tiempos de formulación, elevar eficiencias de encapsulamiento y mantener estables las propiedades de las moléculas a encapsular. En el presente trabajo se utilizó el polímero sintético biocompatible Eudragit L30-D55 (Eudragit) (**Figura 1B**) para la formulación de nanopartículas (NPs) cargadas con QC. Este polímero es estable a valores de pH ácidos (< 5.5), lo que sugiere que podría ser usado para encapsular, proteger y retener componentes en ambientes ácidos, como alimentos o estómago, y después liberarlos a valores de pH neutros ó básicos, como las condiciones del intestino delgado o el colon. El conocimiento obtenido de este trabajo de investigación, será útil para facilitar el desarrollo de sistemas de liberación efectivos para mejorar la protección y estabilidad de diversos compuestos bioactivos, así como para incrementar su bioaccesibilidad y por lo tanto su actividad biológica en el organismo humano.

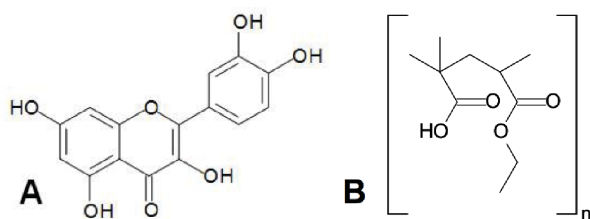


Figura 1. Estructura química de quercetina (A) y de Eudragit L30-D55 (B).

Material y Métodos

Obtención de nanopartículas (NPs).

Las NPs de Eudragit se obtuvieron mediante el método de desplazamiento de solvente con modificaciones menores al procedimiento descrito por Pool y col., 2012a,b. Brevemente, 100 mg de Eudragit fueron disueltos en 10 mL de acetona usando agitación magnética durante

30 min a 25°C. La solución resultante se adicionó a una solución acuosa 5% de PVA (20 mL) y se homogenizaron usando un mezclador Ultraturrax IKA T25 (IKA/Works, Inc. USA) a 19,000 RPM durante 5 min. Después, la solución orgánica y agua fueron eliminadas utilizando un rotaevaporador a 35°C. El remanente fue lavado tres veces con agua destilada y las soluciones de lavado se centrifugaron a 25,000 RPM por 20 min a 10°C en una ultracentrífuga Optima XL-80K (Beckman coulter, Inc, USA). El pellet obtenido fue resuspendido en agua destilada, congelado a -20°C y liofilizado a -70°C (10^{-3} Torr) usando una liofilizadora Labconco Freezone 6 (labconco Corp. USA). Las NPs liofilizadas, fueron almacenadas en desecadores bajo condiciones de vacío y oscuridad. Para preparar las NPs de Eudragit cargadas con QC, se disolvieron 2.5 mg del flavonoide previamente en la solución de acetona.

Caracterización fisicoquímica

a) Tamaño de partícula y carga eléctrica.

El tamaño promedio de partícula y el índice de polidispersidad (IP) de las NPs formadas, fueron determinados mediante la difracción de luz láser (DLL) utilizando un Nanosizer N4 Plus (Beckman coulter, USA). Las mediciones de la carga superficial o potencial zeta (ζ) de las NPs obtenidas, se determinaron mediante electroforesis de partícula utilizando un equipo Zetasizer Zen Systems 3600 (Malvern Instruments, UK), después de haber sido diluidas con H₂O desionizada, para evitar los efectos de difracción múltiple.

b) Morfología.

La morfología de las NPs obtenidas, se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), utilizando un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) Phillips XL30, FEI Company, USA.

c) Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El comportamiento de fase de las muestras obtenidas se analizó mediante DSC usando un

DSC Q10 (TA Instruments, USA), de acuerdo a reportes para este tipo de compuestos (Borghetti y col. 2009). Las muestras se analizaron en una rampa de temperatura de 25 a 350 °C, con una velocidad de cambio de temperatura de 10°C/min bajo atmósfera de nitrógeno con una velocidad de flujo de 50 mL/min.

d) Espectroscopía de infrarrojo con reflectancia difusa (DRIFT).

Los espectros de absorción infrarroja de las muestras fueron determinados mediante DRIFT utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo Spectrum GX (Perkin-Elmer, USA) con un accesorio de reflectancia difusa (modelo Pike Technology). El espectro IR a una resolución de 4 cm⁻¹ con frecuencia de infrarrojo cercano (400-4000 cm⁻¹), fue colectado después de 16 barridos del equipo.

e) Determinación de la eficiencia de encapsulamiento (EE).

La EE de las NPs cargadas con QC, se determinó mediante la técnica de voltamperometría diferencial de pulso (VDP), tomando como base lo descrito por Mora y col. 2009 y utilizando un potenciostato/galvanostato BAS-Epsilon, acoplado a una estación C3-BAS Cell Stand. NPs cargadas con QC, fueron resuspendidas en dimetil sulfóxido (DMSO) con agitación magnética durante 48 h en viales ámbar bajo atmósfera de nitrógeno. Los parámetros utilizados en la VDP fueron 70 mV de amplitud de pulso y 5 mV/s de velocidad de barrido. El contenido de QC, fue calculado mediante la ecuación 1. Los experimentos se realizaron por duplicado en cada lote, y los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar.

$$EE (\%) = \frac{[QC]_{\text{encapsulado}} - [QC]_{\text{solución de lavado}}}{[QC]_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (1)$$

Perfiles de liberación *in vitro* de quercetina

Los perfiles de liberación *in vitro* de QC desde las NPs poliméricas se evaluaron mediante la técnica de VDP, realizando el procedimiento descri-

to en la sección de EE. El sistema se mantuvo en agitación en la celda electroquímica durante 32 h, para provocar la difusión de las moléculas de flavonoide hacia el medio de dispersión. En determinados tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 26 and 32 h) se evaluó la cantidad de QC liberada mediante sus reacciones de transferencia electrónica. El estudio de liberación se realizó en una solución amortiguadora Britton-Robinson a tres pH diferentes simulando las condiciones de acidez del estómago (2, 4.5) y del intestino delgado y/o colon (6-7). Los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados se expresan como el promedio ± error estándar.

Capacidad anti-radical.

a) Ensayo de secuestro de radicales anión superóxido (O₂⁻).

Se evaluó la capacidad de QC tanto libre como encapsulada para inhibir la acción de radicales anión superóxido. En una celda de cuarzo, se agregaron PBS (1.2 mL), solución β-nicotamina adenin dinucleótido (NADH, forma reducida, 0.7 mM)/ nitroazul de tetrazolio (NBT, 17mM) (800 μL), QC libre o encapsulada en diferentes concentraciones (7, 21 y 35 μM, ajustada a la concentración final de NBT) y se mantuvo en agitación magnética durante 2 h. Después de la incubación, 200 μL de fenazina metasulfato (PMS) (diluido en PBS, pH 8, 4 μM) fue adicionado para comenzar la reacción de reducción de NBT. La inhibición por parte de la QC libre o encapsulada, se monitoreo durante 2 minutos a 560 nm, usando un espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50-Bio (Agilent Technologies, Brasil) a 37°C. PBS y Eudragit disueltos en PBS, pH 8, se utilizaron como controles negativos. La inhibición de la reducción del NBT se calculó mediante la ecuación 2:

$$I(\%) = 100 - \frac{K_1}{K_0} \times 100 \quad (2)$$

Donde I es el porcentaje de la inhibición de la reducción de NBT, K₁ es la variación de la pendiente provocada por la muestra y K₀ corresponde a la

variación de la pendiente asociada al blanco. Los experimentos fueron realizados por triplicado en los diferentes lotes de muestras y los resultados se reportaron como el promedio \pm error estándar.

b) Ensayo de actividad quelante.

La capacidad para quelar Fe^{2+} fue determinada de acuerdo al método descrito por Hinneburg y col., 2006, con algunas modificaciones. Brevemente, 5 mL de una solución acuosa 20 y 100 μM de quercetina libre y encapsulada fue agitada por 32 h. Se tomaron alícuotas de 500 μL a 0, 4, 12, 24 y 32 h y fueron centrifugadas a 12000 RPM/5 min, 4 °C. Luego, 30 μL de sobrenadante fueron agregados a 150 μL de FeCl_2 , 2 mM. Después de 5 min, 60 μL de ferrozina 5 mM fueron agregados. La absorbancia se registro a 562 nm después de 10 min. Las actividades de quelación de hierro fueron calculadas mediante la ecuación y expresadas como % de quelación de Fe^{2+}

$$I(\%) = \frac{A_o - A_s}{A_o} \times 100 \quad (3)$$

Donde A_o = Absorbancia de control y A_s = absorbancia de la muestra ó estándares.

Modelo de digestión *in vitro* (pH stat).

Un modelo dinámico gastrointestinal *in vitro* fue usado para estudiar la influencia de la composición de la conformación de las NPs poliméricas en la liberación y bioaccesibilidad de QC, en el TGI simulado (Mun y col. 2006; Dinnella y col. 2007; Lesmes y col. 2010, Pool y col. 2012b). Los experimentos se realizaron a 37 °C para imitar la temperatura del cuerpo humano.

a) Fase oral: Se preparo saliva artificial con una concentración de mucina de 0.5% (5 g/L) para simular la viscosidad de la saliva humana. Las muestras (NPs con QC a 1 mM) fueron colocadas en saliva artificial (pH 6.8) (20 mL) y agitadas a 95 RPM por 15 minutos usando una incubadora con agitación, Innova 4080 (Innova, USA).

b) Fase gástrica: la muestra de bolo, fue colectada después de la fase oral y fue mezclada con fluidos gástricos simulados (FGS) en una relación de masa 2:1 (p/p, muestra:FGS). Esta mezcla fue agitada durante 2 h a 95 RPM a 37 °C, en una incubadora con agitación.

c) Fase de intestino delgado: El quimo formado de las digestiones oral y gástrica fue mezclado con fluidos intestinales simulados, imitando las condiciones del intestino delgado. Inicialmente, 30 mL de las muestras del quimo, se ajustaron a valores de pH de 7.0 usando soluciones de NaOH ó HCl. Esta muestra fue mezclada con 5.0 mL de una solución de CaCl_2 (188 mM, en agua doble destilada, 37 °C) y 1.0 mL de una solución de NaCl (5.625 M en PBS, pH 7.0, 37 °C) bajo agitación constante. El pH de la mezcla fue ajustado a 7.0. Luego 1.5 mL de una suspensión fresca de lipasa (60 mg en PBS, pH 7.0, 37 °C) fue adicionada a la mezcla. Una unidad de titulación automática pH-stat (Metrohm, USA) fue usada para monitorear automáticamente el pH y mantenerlo a un valor de 7.0, titulando con concentraciones apropiadas de una solución de NaOH durante 2 h.

Bioaccesibilidad de quercetina.

La bioaccesibilidad (BA) de QC fue evaluada después de que las muestras fueron pasadas por todas las fases de digestión del TGI simulado. Las muestras después de la digestión de intestino delgado, fueron ultracentrifugadas a 25,000 RPM por 30 min a 10 °C usando una ultracentrífuga Sorval WX (Thermo Scientific, USA). Alícuotas de 5 mL del sobrenadante fueron colectadas (fase micelar) y fueron diluidas con DMSO (1:25) y agitadas con vortex, para luego ser filtradas por medio de filtros de jeringas con poros de 0.22 μm . Después de la filtración, las muestras fueron centrifugadas a 4,000 RPM a temperatura ambiente por 10 minutos. La concentración de QC fue evaluada mediante UV-Vis usando la ecuación 3:

$$BA(\%) = \frac{QC_M}{QC_I} \times 100 \quad (4)$$

Donde QC_M es la concentración de QC en la fase micelar y QC_i es la concentración inicial de QC en cada sistema, MCT o agua.

Resultados y discusiones.

Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas.

Existe evidencia que indica que las propiedades fisicoquímicas de las NPs como el tamaño de partícula, morfología, carga superficial (ζ) y estado físico, se encuentran íntimamente relacionadas con la funcionalidad de estos sistemas con respecto a la liberación controlada (Ahsan y col. 2002; Galindo-Rodriguez y col. 2004). Los tamaños promedio, PI, ζ y Eficiencia de encapsulación (EE) de las partículas formadas con Eudragit libres o cargadas con QC, se muestran en el **Cuadro 1**. Los resultados demuestran que se obtuvieron

de manera general tamaños promedio de partícula relativamente pequeños, con diámetros entre los 397 y 419 nm, con distribuciones muy reducidas (PI entre 0.19 a 0.39), lo cual indicó que se obtuvieron tamaños de partícula muy similares, confirmando de nuevo la reproducibilidad del método usado. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido por otro lado (**Figura 2**), confirman los resultados obtenidos en cuanto a la dispersión y tamaño de partícula.

Los valores promedio de ζ obtenidos para las NPs de Eudragit libres y cargadas con QC (**Cuadro 3**) fueron negativos y se encontraron en un intervalo de -30 a -46 mV a pH \approx 7. Esto indica que el ζ de las NPs formadas en este estudio, se encuentra relacionado con los grupos funcionales (carboxilos, metacrílatos) en la estructura de

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas (tamaño, IP, ζ y EE) de NPs de Eudragit libres o cargadas con QC obtenidas por el proceso de desplazamiento de solvente.

NPs Eud	Diámetro (nm)	Índice de polidispersidad	Potencial ζ (mV)	E.E. (%)
Placebo	397.5 \pm 15.1 ^a	0.42 \pm 0.3 ^a	-30.1 \pm 1.9 ^a	-----
QC	419.5 \pm 10.6 ^a	0.37 \pm 0.3 ^a	-46.2 \pm 1.0 ^a	68.2 \pm 1.9

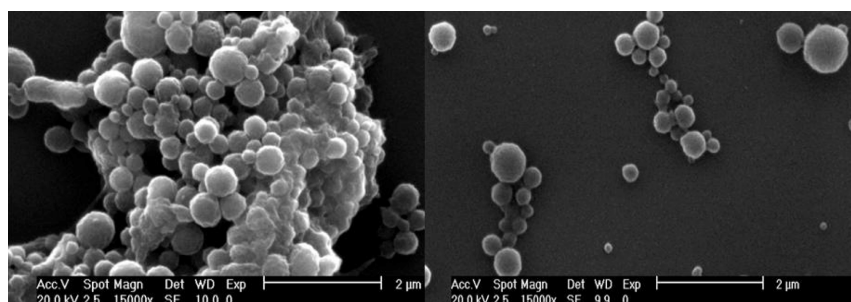
los polímeros usados en la formación de las NPs. También, estos valores de ζ , indicaron que las NPs, son estables en dispersiones acuosas, evitándose la agregación de las mismas.

El porcentaje de EE de QC en las partículas fue de alrededor del 68 %. Los bajos porcentajes de EE pueden relacionarse con la concentración de PVA usada en este trabajo. La solubilidad en agua de QC fue mejorada, incrementando la transferencia a la fase acuosa durante el proceso de emulsificación, y disminuyendo su retención en las NPs

(Mainardes y col. 2006; Song y col. 2008; Holzer y col. 2009). Los resultados obtenidos indican que los parámetros de tamaño de partícula y carga neta superficial no se ven fuertemente afectados por la presencia de QC lo cual se puede deber a su baja concentración dentro de las NPs.

Los resultados son expresados como el promedio \pm E.S. de tres réplicas con tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre filas comparadas con los valores de las nanopartículas placebo de cada polímero.

Figura 2. Micrografías (SEM) de nanopartículas de Eudragit sin carga (A) y con carga de QC (B).



Caracterización de las propiedades de matriz de las nanopartículas.

La organización estructural de las moléculas de flavonoide y la matriz polimérica en las NPs, fue corroborada mediante los métodos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier y Reflectancia difusa (DRIFT).

Una de las principales aplicaciones de métodos como DSC es el análisis del estado físico de los sistemas formados; es decir, en qué forma se encuentra disperso un activo dentro de las NPs poliméricas. Esta información es de suma importancia para tener una idea de la estabilidad y del proceso de liberación de los activos encapsulados desde las partículas formadas (Panyam y col. 2004; Pinto Reis y col. 2006). Las curvas de DSC para QC (Figura 3) denotaron dos cambios endotérmicos de fase alrededor de 120 y 326 °C, los cuales se refieren a la pérdida de moléculas de agua (ya que el estándar de QC es hidratado) y al punto de fusión (Zhou y col. 2001). En cuanto a las NPs de Eudragit libres, se observó que el polímero presentó dos transiciones de fase cerca de los 90 y 190 °C, lo cual según otros autores corresponden a la T_g y a la disociación de los puentes de hidrógeno del polímero (Yüksel y col. 1996; Eerikäinen y col. 2004). En las mezclas físicas, se observó que las transiciones de fase de cada molécula se encuentran visibles, pero con cambios en los valores de temperatura, lo que indica la presencia de interacciones menores entre Eudragit y QC. En las NPs cargadas con QC, el comportamiento térmico sugiere que el flavonoide se encuentra disperso en la matriz polimérica en estado amorfo, y el cambio observado en la T_g del polímero, se debe a las interacciones entre polímero y el flavonoide (Corrigan y Li, 2009; Joshi y col. 2010).

DRIFT es una técnica de análisis para diferentes tipos de muestras (polvos, líquidos) y es utilizada para analizar e identificar la estructura de alguna muestra en particular y determinar posibles cambios e interacciones en la estructura cuando se combinan dos o más moléculas por diferentes métodos (Calabrò y col. 2004). El espectro infra-

rojo (IR) para QC (Figura 4) mostró las bandas de absorción características de estiramiento de los grupos OH (3700-3000 cm^{-1}), grupo C=O (1662 cm^{-1}), de enlaces C-C (1618 cm^{-1}), bandas de flexión de C-H (1456, 1383 y 866 cm^{-1}), bandas atribuidas al estiramiento del enlace entre el oxígeno y el anillo C (1272 cm^{-1}) y el estiramiento de C-O (1070-1150 cm^{-1}) (Dias y col. 2008; Kumari y col. 2011). Por otra parte, el espectro IR de Eudragit, mostró bandas características de los estiramientos C=O y C-O-C (~ 1750 y ~ 1100 cm^{-1}), C-H (1450 y 1403 cm^{-1}), OH (3100-3000 cm^{-1}), y el estiramiento de los grupos OH unidos al anillo (3500-3650 cm^{-1}), los cuales han sido reportados por otros autores para otros tipos de Eudragit con estructuras químicas similares a Eudragit L30-D55 (Eerikäinen y col. 2003; Eerikäinen y col. 2004). En el caso de las NPs de Eudragit cargadas con QC, se observó un aumento en la energía absorbida en la banda característica de los grupos OH (3500-3000 cm^{-1}), indicando que existen interacciones de puentes de hidrógeno entre las moléculas de QC con Eudragit. Se observó también un pequeño ensanchamiento en la banda correspondiente a los grupos C=O, indicando interacciones entre grupos carbonilos de las moléculas de flavonoide y Eudragit. También se observaron bandas características del polímero (3000-2500 cm^{-1}) y de QC (alrededor de 1700-1500 cm^{-1}). Estos resultados confirman la presencia de las moléculas de QC dentro de las nanopartículas poliméricas y las interacciones que provoca la encapsulación de QC en las NPs (Wu y col. 2008).

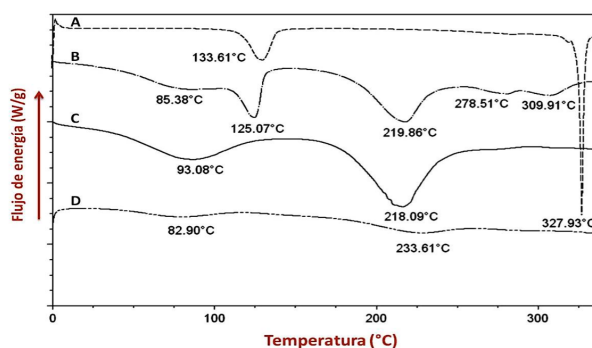


Figura 3. Termogramas para QC (A), mezcla física QC/Eudragit (B), nanopartículas de Eudragit (C) y nanopartículas de Eudragit cargadas con QC (D).

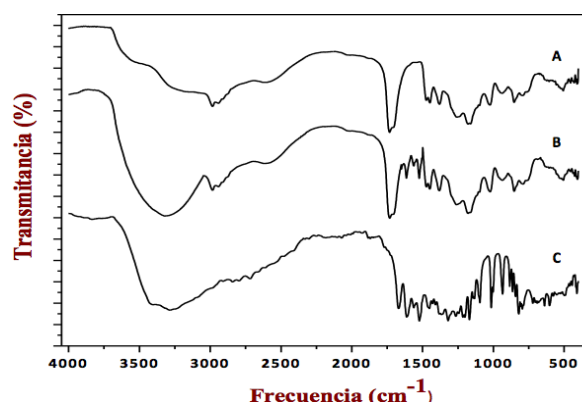


Figura 4. Espectros de DRIFT para Eudragit (A), nanopartículas de Eudragit cargadas con QC (B) y QC (C). Los espectros mostrados se presentan como el promedio de 16 escaneos realizados por el espectroscopio de DRIFT.

Perfiles de liberación in vitro de quercetina.

Se evaluaron las cinéticas de liberación del flavonoide encapsulado en las NPs de Eudragit, utilizando un protocolo electroquímico basado en la técnica de VDP. Las señales de oxidación de QC se monitorearon durante 32 hrs. Conforme el activo era liberado de las NPs, la corriente de las señales de oxidación de la quercetina se incrementaba (Figura 5), indicativo de que la concentración del flavonoide encapsulado aumentaba conforme pasaba el tiempo de experimentación. Al máximo tiempo de evaluación se obtuvieron porcentajes de liberación de 93.3 ± 3.03 , 15.8 ± 3.6 y 6.1 ± 1.9 a pH de 7.2, 4.5 y 2, respectivamente. Como se había observado previamente, la liberación de QC se encuentra influenciada por el pH del medio. A valores de pH de 2 y 4.5, la liberación es muy baja, ya que el polímero de Eudragit está diseñado para degradarse a valores de pH mayores de 5.5. Luego entonces la liberación observada se debe al efecto de la agitación sobre las moléculas de flavonoide que se encontraron más cercanas a la superficie de las NPs. A pH 7.2, se observó una liberación rápida seguida de una liberación lenta y sostenida hasta el término del experimento. Este comportamiento se debe a que a valores de pH ≥ 5.5 los grupos carboxílicos del Eudragit se encuentran ionizados, provocando que las cadenas del polímero se rechacen, que la partícula se hinche ligeramente, y que líquido del medio ingrese

a la partícula y libere a la molécula de QC (Bajpai y Singh, 2006). Estos resultados sugieren que las NPs de Eudragit, son propicias para el encapsulamiento, protección y liberación de compuestos en ambientes como el del TGI, llevando al incremento de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos encapsulados.

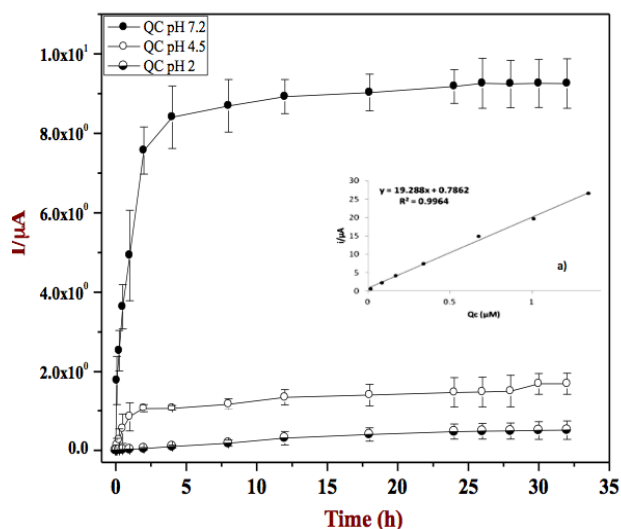


Figura 5. Corrientes de las señales de oxidación de Quercetina liberada desde nanopartículas de Eudragit en solución amortiguadora Britton-Robinson a 3 diferentes pH's (7.2, 4.5 y 2) durante el tiempo de experimentación (32 h). El inserto "a)" muestra la curva de calibración de quercetina usada para determinar la concentración de quercetina liberada. Resultados expresados como el promedio \pm EE de dos réplicas con tres repeticiones.

Capacidad antioxidante.

a) Actividad de secuestro de radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

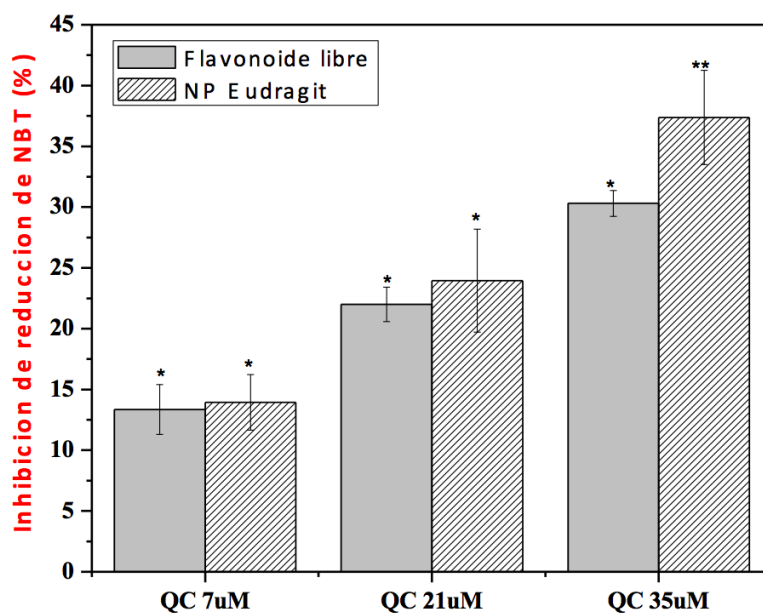
Se analizó la capacidad de inhibir la reducción provocada por el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por parte de QC libre y encapsulada a diferentes concentraciones (7, 21 y 35 μ M) (Figura 6). Se observó que la acción de este radical libre disminuía conforme se aumentaba la concentración del flavonoide, ya fuera libre o encapsulado, confirmando la capacidad anti-radical de QC y la dependencia con la concentración. La inhibición del radical fue mejorada ligeramente cuando la QC se encontraba encapsulada en comparación con el flavonoide libre; esto puede deberse a que las NPs protegieron a la molécula de QC durante las

dos horas de agitación previas al experimento, donde el oxígeno molecular pudo haber degradado alguna cantidad de QC, provocando una menor actividad antirradical. Estos resultados sugieren que las NPs de Eudragit, ayudarían a mantener estables más tiempo a moléculas antioxidantes, para coadyuvar a evitar la oxidación de diferentes productos alimentarios o farmacéuticos durante el almacenamiento.

b) Actividad quelante de nanopartículas cargadas con quercetina

Se ha reportado que el atrapamiento o quelación de metales de transición (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{1+}), constituye un importante factor de las propiedades antioxidantes que puede tener un compuesto. La formación de complejos con estos metales de transición, evita la formación de radicales libres por medio de la inhibición de las reacciones de

Figura 6. Inhibición de reducción de NBT por QC libre y encapsulada (7, 21 y 35 μM). Los resultados son expresados como promedios \pm ES de tres réplicas con tres repeticiones. **denota diferencia significativa ($P < 0.05$) entre tratamientos a la misma concentración.



Fenton. La formación del radical hidroxilo puede llevar al daño celular en el organismo humano o a la peroxidación lipídica en alimentos ricos en ácidos grasos (Pietta, 2000b; Shahidi y col., 1992). En este estudio, se evaluó la capacidad para quelar metales de transición (Fe^{2+}) por parte de QC libre y encapsulada en medio acuoso (Figura 7). El experimento se siguió durante 32 hrs, tiempo utilizado para la determinación de la liberación de los flavonoides en las NPs de Eud. Se observó que a medida que la concentración de flavonoide fue incrementando, la capacidad para inhibir la formación del complejo Fe^{2+} -ferrozina se elevó, lo cual indica una actividad quelante importante por parte de QC. Es importante señalar, que esta actividad para las NPs se incrementó conforme pasaba el tiempo de experimentación, indicando que la matriz de Eud ofreció una acción protectora

sobre la oxidación del flavonoide por el oxígeno molecular que pudiera estar presente en el medio de reacción. La actividad quelante pudo haberse visto influenciada también por el método de ultracentrifugación al que fueron sometidas las muestras. Este procedimiento provoca la difusión rápida de los compuestos encapsulados al medio de difusión, por lo cual las moléculas del flavonoide se encontraban más disponibles para quelar al Fe^{2+} , al compararlo con el flavonoide libre (Astete y col., 2006). Los resultados presentados con anterioridad, sugieren que las NPs de Eud, por sus características fisicoquímicas, estabilidad y capacidad antioxidante, serían excelentes acarreadores de compuestos antioxidantes para la protección de alimentos ricos en lípidos o para la formulación de novedosos alimentos funcionales que tengan el principal objetivo de incrementar la protección y bioacce

	Boca	Estómago	Intestino delgado
QC libre	43.3 ± 3.0	17.0 ± 2.6	7.4 ± 0.3
QC encapsulada	5.2 ± 1.5	3.4 ± 0.8	22.4 ± 1.9

Los resultados son expresados como el promedio ± ES de tres experimentos hechos individualmente.

sibilidad de compuestos antioxidantes que ayuden a evitar/prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, donde las reacciones de Fenton catalizadas por iones metálicos como Fe²⁺ cumplen un papel crucial.

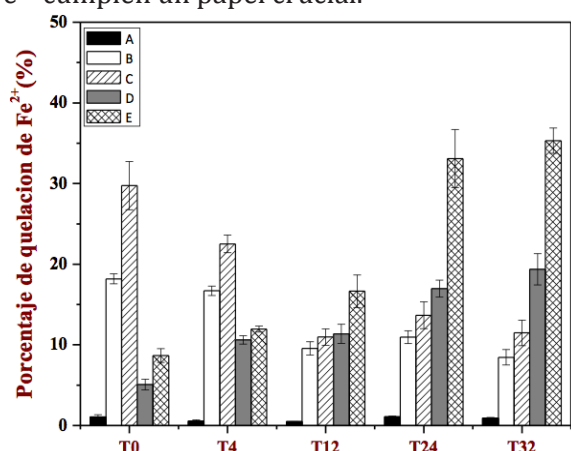


Figura 7. Porcentaje de quelación de Fe²⁺ de quercetina libre en concentraciones de 20 μM (B) y 100 μM (C) y quercetina encapsulada en nanopartículas de Eudragit en concentraciones de 20 μM y 100 μM (D y E, respectivamente). Nanopartículas de Eudragit (A) fueron usadas como controles negativos. Resultados son el promedio de dos repeticiones con tres réplicas y son expresados como el promedio ± SE.

Modelo de digestión dinámica in vitro.

Se monitoreó el comportamiento de las NPs libres y cargadas con QC bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI) *in vitro*, para determinar el potencial uso de estos sistemas de liberación dentro del cuerpo humano (Pool y col., 2012b). El modelo simulado de TGI abarca el estudio de estos sistemas en condiciones de pH y enzimáticas desde boca hasta intestino delgado, ya que en este último se ha reportado la mayor absorción de compuestos fenólicos (Saura-Calixto y col. 2007).

En el Cuadro 2, se muestran las cantidades encontradas de QC después de la digestión en cada etapa. La cantidad de QC disuelta en agua y liberada en boca, estómago e intestino delgado fue de ≈ 43%, 17% y 7%, mientras que la QC dispersada

en las NPs fue liberada en un ≈ 5%, 3% y 22% en boca, estómago e intestino, respectivamente.

Cuadro 2. Concentración remanente de quercetina dispersada en agua y en nanopartículas de Eudragit encontradas en cada etapa de digestión del modelo gastrointestinal simulado usado.

Estos resultados sugieren que las NPs de Eudragit actúan como protectores de quercetina durante su paso por el TGI simulado, promoviendo su liberación en intestino delgado. Esto confirma que el polímero de Eudragit está desarrollado como un polímero entérico, ya que su degradación se da exclusivamente en valores de pH arriba de 5.5, protegiendo a los activos encapsulados en condiciones de pH más ácidas. Esto presenta una amplia ventaja en comparación con el flavonoide o compuestos bioactivos disueltos en agua, los cuales claramente al no estar protegidos, se encuentran a merced de los cambios de pH e interacciones con los componentes del TGI, disminuyendo sus niveles de bioaccesibilidad. Cabe destacar que los valores reportados como liberación en intestino delgado, son tomados como el porcentaje de bioaccesibilidad (BA) en intestino delgado. La muestra que se analizó para evaluar la liberación de QC en intestino delgado, fue la parte acuosa micelar, obtenida después de una ultracentrifugación de las muestras provenientes de la digestión *in vitro* en la etapa de intestino delgado. Esta fase micelar, es la que se transporta a través de las células del epitelio del intestino delgado, rompiéndose y liberando los activos que se encuentren atrapados en las micelas una vez atravesada la pared epitelial del intestino, por lo que la cantidad de flavonoide encontrado en esta fase, se considera como parámetro de bioaccesibilidad de QC. De acuerdo a esto, la BA de QC es mayor cuando se encuentra encapsulada que dis-

persa en agua. Esto puede atribuirse a la QC dispersa en agua debido a su baja solubilidad tiende a formar cristales, los cuales precipitan y por lo tanto disminuyen la incorporación de QC en las micelas (Day y col. 2010; McClements, 2012).

CONCLUSIONES.

Se logró determinar los parámetros específicos para la obtención de sistemas de liberación controlada basados en nanopartículas poliméricas de Eudragit L30-D55 para la encapsulación, protección y administración dirigida de quercetina, flavonoide con propiedades biológicas importantes como anti-cancerígenas, antimutagénicas, apoptóticas, anti-ateroescleróticas, antidiabéticas, anti-inflamatorias, anti-bacterianas y anti-virales. Se demostró que las propiedades antioxidantes como el secuestro del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y la quelación del ión Fe^{2+} de la quercetina se mantienen aún después del proceso de encapsulación en las nanopartículas poliméricas. Se mostró también que las nanopartículas poliméricas desarrolladas, resultaron ser exitosos sistemas de protección de quercetina en condiciones que simulan su tránsito por el sistema gastrointestinal, incrementando así su bioaccesibilidad en intestino delgado. Los resultados sugieren que estos sistemas de liberación controlada pueden ser adecuados para la encapsulación de compuestos bioactivos dentro de productos alimentarios o farmacéuticos, y para su liberación en el intestino delgado donde pueden ser absorbidos. Sin embargo, aún cuando estos sistemas de liberación han sido desarrollados para la encapsulación y liberación dirigida de compuestos antioxidantes en el tracto gastrointestinal, numerosas aplicaciones prometedoras dentro de la industria de los alimentos pueden visualizarse. Entre estas, la encapsulación de diversos compuestos bioactivos (vitaminas, carotenoides, ácidos grasos poli-insaturados, etc.), la formulación de novedosos alimentos funcionales (productos sólidos o líquidos), el desarrollo de envases inteligentes y su uso para alargar la vida de anaquel de productos alimentarios durante prolongados tiempos de almacenamiento, destacan por su potencial. Sin

duda alguna los estudios *in vivo* de las actividades biológicas ejercidas por las NPs cargadas con quercetina así como estudios toxicológicos son de suma importancia para validar la efectividad de los sistemas.

Referencias Bibliográficas.

- Ahsan F., Rivas I.P., Khan M.A., and Torres Suárez A.I. (2002). Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers—liposomes and microspheres—on the phagocytosis by macrophages. *Journal of Controlled Release* 79(1-3):29-40.
- Almeida J., Lima F., Ros S.D., Bulhoes L.O., de Carvalho L., and Beck R.C. (2010). Nanostructured systems containing rutin: In vitro antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Research Letters* 5(10):1603 - 1610.
- Bajpai S.K., and Singh S. (2006). Analysis of swelling behavior of poly(methacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels and effect of synthesis conditions on water uptake. *Reactive and Functional Polymers* 66(4):431-440.
- Balasundram N., Sundram K., and Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99(1):191-203.
- Borghetti G., Lula I., Sinisterra R., and Bassani V. (2009). Quercetin/ β -cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture. *AAPS PharmSciTech* 10(1):235-242.
- Calabrò M.L., Tommasini S., Donato P., Raneri D., Stancanelli R., Ficarra P., Ficarra R., Costa C., Catania S., Rustichelli C., and Gamberini G. (2004). Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35(2):365-377.
- Corrigan O.I., and Li X. (2009). Quantifying drug release from PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 37(3-4):477-485.
- Darvesh A.S., Carroll R.T., Bishayee A., Geldenhuys W.J., and Van der Schyf C.J. (2010). Oxidative stress and Alzheimers disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert Review of Neurotherapeutics* 10(5):729-745.
- Day J.P.R., Rago G., Domke K.F., Velikov K.P. and Bonn M. (2010). Label-free imaging of lipophilic bioactive molecules during lipid digestion by multiplex coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Journal of the American Chemical Society* 132(24):8433-8439.
- Dias K., Nikolaou S., and De Giovani W.F. (2008). Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/ β -cyclodextrin and Al(III) quercetin/ β -cyclodextrin inclusion compounds. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 70(1):154-161.
- Erikainen H., and Kauppinen E.I. (2003). Preparation of polymeric

- nanoparticles containing corticosteroid by a novel aerosol flow reactor method. *International Journal of Pharmaceutics* 263(1-2):69-83.
- Erikäinen H., Peltonen L., Raula J., Hirvonen J., and Kauppinen E. (2004). Nanoparticles containing ketoprofen and acrylic polymers prepared by an aerosol flow reactor method. *AAPS Pharm-SciTech* 5(4):129-137.
- Galindo-Rodriguez S., Allémann E., Fessi H., and Doelker E. (2004). Physicochemical parameters Associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research* 21(8):1428-1439.
- Holzer Mm., Vogel Vm., Mäntele Wm., Schwartz Dm., Haase Wm., and Langer K. (2009). Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72(2):428-437.
- Janovská L., Vetchý D., Rabisková M. New systems for colonic drug targeting. *Ceská a Slovenská farmacie: casopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti.* (2006);55(5):203.
- Joshi S.A., Chavhan S.S., and Sawant KK. (2010). Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: Preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 76(2):189-199.
- Koo M.W.L. and Cho C.H. (2004). Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *European Journal of Pharmacology* 500(1-3):177-185.
- Kumari A., Yadav S.K., Pakade Y.B., Kumar V., Singh B., Chaudhary A., and Yadav S.C. (2011). Nanoencapsulation and characterization of *Albizia chinensis* isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82(1):224-232.
- Luppi B., Bigucci F., Cerchiara T., Mandrioli R., Pietra A.M.D., and Zecchi V. (2008). New environmental sensitive system for colon-specific delivery of peptidic drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 358(1):44-49.
- Mainardes R.M., Gremião M.P.D., and Evangelista R.C. (2006). Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 42(4):523-530.
- McClements D.J. (2012). Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science* 174(0):1-30.
- Mora-Huertas C.E., Fessi H., and Elaissari A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385(1-2):113-142.
- Murase T., Nagasawa A., Suzuki J., Hase T., and Tokimitsu I. (2002). Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *International Journal of Obesity* 26(11):1459-1464.
- Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M., and Krishna D. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* 33(1):2-16.
- Oosegi T., Onishi H., and Machida Y. (2008). Novel preparation of enteric-coated chitosan-prednisolone conjugate microspheres and in vitro evaluation of their potential as a colonic delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68(2):260-266.
- Panyam J., Williams D., Dash A., Leslie-Pelecky D., and Labhasetwar V. (2004). Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93(7):1804-1814.
- Patel M.P., Patel R.R., and Patel J.K. (2010). Chitosan mediated targeted drug delivery system: A review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 13(4):536-557.
- Pinto R. C., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., and Veiga F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2(1):8-21.
- Pietta P-G. (2000a). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7):1035-1042.
- Pool H., Quintanar D., Figueroa J. de D., Marinho C., Bechara J.E.H., Godínez L. A., Mendoza S. (2012a). Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials* DOI:10.1155/2012/145380.
- Pool H., Quintanar D., Figueroa J. de D., Bechara J. E. H., McClements D.J., Mendoza S. (2012b). Polymeric nanoparticles as oral delivery systems for encapsulation and release of polyphenolic compounds: Impact on quercetin antioxidant activity & bioaccessibility. *Food Biophysics* 7(1):276-288.
- Record I.R., and Lane J.M. (2001). Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chemistry* 73(4):481-486.
- Roedig-Penman A., and Gordon M.H. (1997). Antioxidant properties of catechins and green tea extracts in model food emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(11):4267-4270.
- Saura-Calixto F., Serrano J., and Goñi I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry* 101(2):492-501.
- Shahidi F., Janitha P y Wanasundara P. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 32(1):67-103.
- Song X., Zhao Y., Hou S., Xu F., Zhao R., He J., Cai Z., Li Y., and Chen Q. (2008). Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69(2):445-453.
- Tsuchiya H. (1999). Effects of green tea catechins on membrane fluidity. *Pharmacology* 59(1):34-44.
- Wu T.-H., Yen F.-L., Lin L.-T., Tsai T.-R., Lin C.-C., and Cham T.-M. (2008). Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 346(1-2):160-168.
- Yang L., Chu J.S., and Fix J.A. (2002). Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 235(1):1-15.
- Yüksel N., Tinçer T., and Baykara T. (1996). Interaction between nifedipine hydrochloride and polymeric microspheres for a controlled release system. *International Journal of Pharmaceutics* 140(2):145-154.
- Zhang L., and Kosaraju S.L. (2007). Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *European Poly-*