

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE NANOSISTEMAS POLIMÉRICOS DE
QUERCETINA

JUAN DIEGO ECHEVERRI ULLOA

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

PROGRAMA DE QUÍMICA CON ÉNFASIS EN BIOQUÍMICA

SANTIAGO DE CALI

2017

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE NANOSISTEMAS POLIMÉRICOS DE
QUERCETINA

JUAN DIEGO ECHEVERRI ULLOA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO Y QUÍMICO

TUTORES

CONSTAÍN SALAMANCA MEJÍA, Ph.D

ÁLVARO ANDRÉS BARRERA OCAMPO, Ph.D

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

PROGRAMA DE QUÍMICA CON ÉNFASIS EN BIOQUÍMICA

SANTIAGO DE CALI

2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera medida a Dios, pues de su mano es que han llegado todas estas bendiciones a mi vida y a mi carrera profesional. Así mismo a la Universidad Icesi, por haberme brindado durante todo este tiempo las herramientas necesarias para llegar hasta esta etapa. Al Dr., tutor, y amigo Constaín Salamanca, por su asesoría en el desarrollo de este proyecto de grado, así como por todas y cada una de las enseñanzas que ha dejado en mí, pues en gran parte gracias a él considero que puedo ser un profesional y una persona íntegra en todos los aspectos de mi vida. Al Dr. Álvaro Andrés Barrera, por su asesoría y su valiosísimo apoyo y atención brindada. También al Dr. Guillermo Montoya, por su apoyo incondicional con el uso de equipos e instrumentos indispensables para el desarrollo de este proyecto. A Duván Castillo, de quien destaco su enorme vocación y voluntad para siempre ayudar, colaborar, y compartir conocimiento a los demás. A mis compañeros del Grupo de Investigación en Físicoquímica Farmacéutica, especialmente a Carlos Rivera y Mario Palacio, personas incondicionales en todo el sentido de la palabra, con quienes sufrí y saqué adelante las dos carreras durante estos 6 años, forjando una hermandad más que una amistad. A mis amigas Carolina, Manuela y Valentina, que han sido indispensables para mí por siempre estar en las buenas y en las malas. A Coco, una compañera de vida que en todo momento me ha ayudado a mantener en pie, sin importar lo adversas que sean las situaciones. Y por último y más importante, a mis papás, las personas que más admiro en el mundo, la luz de mis ojos y el motor de mi vida, gracias por siempre impulsarme, por hacer de mi quien soy ahora, este logro y todos los que vengan son para ustedes, porque hacerlos sentir orgullosos es lo que más me hace feliz.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN DEL PROYECTO	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO	14
2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	14
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DE ARTE	16
2.2.1 Enfermedad de Alzheimer	16
2.2.2 Extractos de flavonoides y quercetina como antioxidantes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	17
2.2.3 Nanopartículas	18
2.2.3.1 Generalidades	18
2.2.3.2 Método de la Nanoprecipitación	18
2.2.3.3 Consideraciones y principales parámetros fisicoquímicos.....	22
2.2.3.4 Factores que afectan los parámetros fisicoquímicos de las nanocápsulas	25
2.3 OBJETIVOS	26
2.3.1 Objetivo general	26
2.3.2 Objetivos específicos	26
2.4 METODOLOGÍA UTILIZADA.....	27
2.4.1 Materiales.....	27
2.4.2 Obtención de nanocápsulas mediante el método de Nanoprecipitación... ..	27
2.4.3 Concentración y purificación de las nanocápsulas.....	28
2.4.4 Caracterización de las nanocápsulas.....	29
2.4.4.1 Efecto del tipo, el peso molecular, y la concentración de polímero.....	29
2.4.4.2 Efecto del tiempo en la estabilidad de las nanocápsulas.....	30
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
2.5.1 Obtención de nanocápsulas mediante el método de Nanoprecipitación... ..	31
2.5.2 Concentración y purificación de las nanocápsulas.....	31
2.5.3 Caracterización de las nanocápsulas.....	32

2.5.3.1	Efecto de la concentración de polímero.....	37
2.5.3.2	Efecto del peso molecular del polímero.....	38
2.5.3.3	Efecto del tiempo en la estabilidad de las nanocápsulas.....	39
2.6	CONCLUSIONES.....	40
2.7	RECOMENDACIONES.....	41
3.	BIBLIOGRAFÍA	42
4.	ANEXOS	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composiciones sugeridas para el método de Nanoprecipitación.	19
Tabla 2. Composición de la fase orgánica para el método de Nanoprecipitación. 27	27
Tabla 3. Composición de la fase acuosa para el método de Nanoprecipitación. ..	27
Tabla 4. Sistemas desarrollados en el proyecto.	30
Tabla 5. Valores de potencial zeta en agua para cada componente de la formulación.	36

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Función de correlación vs. Tiempo. Tomado de (Bhattacharjee, 2016)	23
Gráfica 2. Caracterización de las nanopartículas de PCL. a) Diámetro hidrodinámico, b) Dispersidad, c) Potencial Zeta y d) Eficiencia de Encapsulación.	32
Gráfica 3. Caracterización de las nanopartículas de PVA. a) Diámetro hidrodinámico, b) Dispersidad, c) Potencial Zeta y d) Eficiencia de Encapsulación.	33
Gráfica 4. Distribución de tamaños de partícula para nanocápsulas de a) PCL y b) PVA.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la quercetina.....	17
Figura 2. Efecto Gibbs-Marangoni.	20
Figura 3. Esquema del proceso de preparación de nanocápsulas por el método de Nanoprecipitación.	20
Figura 4. Estructura química del PCL.	21
Figura 5. Estructura química del PVA.	21
Figura 6. Estructura química del Poloxámero 188.	21
Figura 7. Estructura química del Miglyol.	22
Figura 8. Patrones de dispersión de luz en diferentes tamaños de partícula.	23
Figura 9. Modelo de la doble capa eléctrica.....	24
Figura 10. Montaje para la dosificación de la fase orgánica en la acuosa.	28
Figura 11. Cambio en la apariencia de la fase acuosa a) antes de la adición de la fase orgánica y b) después de la adición de la fase orgánica.....	31
Figura 12. Reacción de hidrolisis del Polivinil acetato para producir Polivinil alcohol.	35
Figura 13. Reacción de hidrolisis del PCL.	35
Figura 14. Reacción de hidrolisis del triglicérido componente del Miglyol.....	36
Figura 15. Nanosistema a base de PVA al 0,2% y Mw = 85000 - 124000.....	38

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Datos para la curva de calibración de Quercetina.	45
Anexo 2. Datos de pH para los nanosistemas desarrollados.....	46

RESUMEN DEL PROYECTO

La enfermedad de Alzheimer afecta a millones de personas en el mundo, produciéndoles pérdidas en sus capacidades cognitivas y cerebrales. Es una enfermedad neurodegenerativa y la fisiopatología tiene múltiples consecuencias, entre ellas la generación de estrés oxidativo en las neuronas. Por esta razón, se ha planteado el uso de compuestos flavonoides antioxidantes, como la quercetina, para su tratamiento. Esta posee excelentes propiedades farmacodinámicas, pero presenta problemas de solubilidad en medio acuoso y de absorción por sus características químicas

Para solventar la problemática mencionada, se propuso el desarrollo de nanocápsulas a base de los materiales poliméricos Policaprolactona y Polivinil Alcohol, para así vectorizar la quercetina y mejorar sus propiedades fisicoquímicas. Se empleó la metodología correspondiente a la Nanoprecipitación. Posteriormente se caracterizaron fisicoquímicamente los sistemas, evaluando los cambios en tamaño, dispersidad, potencial zeta, y porcentaje de encapsulación, con respecto al tiempo. Adicionalmente, se varió el peso molecular y la concentración de los polímeros para encontrar la influencia de estos parámetros en las propiedades de las nanopartículas.

Se encontró que los tamaños estaban en la escala nanométrica (entre 100 y 500 nm), y los potenciales zeta fueron negativos, menores a -30 mV en todos los casos, haciendo que los sistemas sean físicamente estables. Además los porcentajes de encapsulación iniciales fueron mayores al 98% en todos los casos. Las nanocápsulas a base del polímero PCL, presentaron mayores tamaños de partícula con respecto a las nanopartículas de PVA, pero así mismo dispersidades más pequeñas.

El desarrollo del proyecto buscó proveer una formulación a escala nanométrica para la quercetina, además de toda la respectiva caracterización fisicoquímica. De esta manera, la información generada puede utilizarse para realizar estudios biológicos en futuras investigaciones con quercetina.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, estrés oxidativo, quercetina, solubilidad, absorción, nanocápsulas.

ABSTRACT

Alzheimer is a neurodegenerative disease that affects millions of people around the world, causing them to lose their cognitive and brain abilities. Pathophysiology has multiple consequences, including the generation of oxidative stress in neurons

For that reason, it has been proposed the use of flavonoid antioxidant compounds, such as quercetin, for its treatment. It has excellent pharmacodynamic properties, but presents problems of solubility in aqueous medium and absorption due to its chemical characteristics To solve this problem, this work proposed the development of nanocapsules based on the polymeric materials Polycaprolactone and Polyvinyl Alcohol, in order to vectorize quercetin and improve its physicochemical properties.

The methodology corresponding to Nanoprecipitation was used. Subsequently the systems were characterized physicochemically, evaluating the changes in size, dispersion, zeta potential, and encapsulation percentage, with respect to time.

Additionally, the molecular weight and concentration of the polymers were varied to find the influence of these parameters on the properties of the nanoparticles.

The sizes were found to be in the nanometer scale (between 100 and 500 nm), and the zeta potentials were negative, less than -30 mV in all cases, making the systems physically stable. Also the initial encapsulation percentage were major than 98% in all cases. The nanocapsules based on the PCL polymer had higher particle sizes than the PVA nanoparticles, but also smaller dispersions.

The development of the project was to provide a nanometric scale formulation for quercetin, in addition to all the respective physicochemical characterization. In this way, the information generated can be used to perform biological studies in future research with quercetin.

Keywords: Alzheimer disease, oxidative stress, quercetin, solubility, absorption, nanocapsules.

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de agentes terapéuticos con la capacidad de tratar ciertas patologías con altos índices epidemiológicos, tales como las enfermedades neurodegenerativas, es una constante en la actualidad. No obstante, los medicamentos deben cumplir con ciertos requisitos adicionales a los terapéuticos, para ser realmente eficaces *in vivo*. Algunos de estos requerimientos abarcan el tener una buena solubilidad en medio acuoso, a la vez que una óptima permeabilidad, parámetros que son condicionados por la naturaleza química del fármaco, y que en numerosas ocasiones representan problemáticas para su utilización como agente terapéutico.

Un ejemplo de las situaciones anteriormente mencionadas se presenta con la quercetina, un antioxidante de tipo flavonoide, el cual posee características terapéuticas favorables para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA). Sin embargo, su capacidad para permear membranas constituye una dificultad en el uso del mismo, la cual hoy en día solo se ha logrado manejar mediante la utilización de altas dosis. Lo anterior hace que la quercetina no sea un medicamento de elección cuando se desea controlar el avance de dicha patología (Bei et al., 2009).

Cuando se presentan dificultades de este tipo, se debe recurrir a la utilización de estrategias de diseño y formulación farmacéutica, que permitan desarrollar vehículos con la capacidad de solventar dichas problemáticas. Estas técnicas han evolucionado con los años, llegando hasta el punto de poder encapsular fármacos a escala nanométrica mediante el uso de matrices poliméricas. De esta manera, se pueden optimizar algunas de sus propiedades, las cuales originalmente no permitían que ejerciera correctamente su acción farmacológica.

La nanotecnología farmacéutica, es una herramienta que se encuentra en constante evolución. Mediante el desarrollo de metodologías muy bien estructuradas y estudiadas, se han generado sistemas con tamaños muy pequeños (entre 100 y 500 nm) y morfologías ventajosas (generalmente circulares). La composición de estas estructuras, tiene generalmente una matriz polimérica, la cual posee la capacidad de crear nanoambientes que funcionan como reservorios de fármacos. De esta manera, se protege el agente terapéutico de ciertos factores de degradación, y se modula la liberación del mismo para controlar parámetros como su solubilidad en medio acuoso y la permeabilidad.

Con base en los anteriores precedentes, el presente proyecto fue desarrollado con el objetivo de proveer información acerca de las características fisicoquímicas de vehículos en escala nanométrica para el agente terapéutico quercetina. Para esto, se utilizó la metodología de Nanoprecipitación, con dos diferentes materiales poliméricos, correspondientes a Policaprolactona y Polivinil Alcohol. Se evaluaron

diferentes concentraciones y pesos moleculares de ambos polímeros, y se estudió la estabilidad física de estos nanosistemas en el tiempo. Con la información generada, se podrán evaluar las características biofarmacéuticas de las nanocápsulas de quercetina en futuros estudios.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

Las patologías neurodegenerativas son aquellas que producen deterioro de las funciones fisiológicas en el sistema nervioso central, originando daños y condiciones anómalas en los dominios cognitivos del cerebro. Una de las patologías mencionadas es la EA, que genera pérdida de la capacidad intelectual en relación con la memoria, la cognición, y la orientación, entre otras. Además, representa la forma más común de demencia (Escobar & Pimienta, 2006).

La fisiopatología celular de la enfermedad se basa en múltiples fallos a nivel neuronal, incluyendo disfunción sináptica por agotamiento de neurotransmisores, inhibición mitocondrial, y estrés oxidativo (Querfurth & LaFerla, 2004). Este último es de especial recurrencia, por lo cual algunas de las investigaciones en EA están actualmente orientadas al descubrimiento de compuestos con efecto antioxidante y neuroprotector. Dentro de este marco, se han encontrado extractos de flavonoides que poseen dicha capacidad, siendo la quercetina uno de los principales componentes activos (Bei et al., 2009).

La quercetina ha demostrado tener un efecto terapéutico frente al estrés oxidativo en la EA, pero sus propiedades farmacocinéticas impiden el éxito total del tratamiento, inclusive cuando se usan dosis altas. El primer factor limitante es su baja solubilidad en medio acuoso debido a su estructura química apolar, lo que conlleva a una baja absorción a nivel del tracto gastrointestinal, y una disminución en la biodisponibilidad del fármaco. Adicionalmente, se han encontrado efectos del metabolismo sobre la quercetina una vez se absorbe, lo cual promueve su eliminación del organismo (Piskula & Terao, 1998). Por las razones anteriormente mencionadas, este proyecto buscó proveer una estrategia de vehiculización adecuada para la quercetina, y caracterizar las respectivas propiedades fisicoquímicas de estos sistemas. Con base en la información obtenida, se podrán establecer las condiciones más adecuadas para optimizar las propiedades farmacocinéticas del fármaco.

La propuesta de formulación consistió en la preparación de nanopartículas (o partículas sólidas coloidales) a base de materiales poliméricos, mediante la metodología de Nanoprecipitación. Estos son sistemas que poseen un núcleo hidrofóbico en el cual se puede encapsular el fármaco, y una membrana polimérica que lo rodea (Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010). Este tipo de vectores suelen tener un tamaño que oscila entre los 100 y los 500 nm (Boehm, Martinon, Zerrouk, Rump, & Fessi, 2003). Gracias a esto y al ambiente apolar del núcleo, se pueden mejorar aspectos de absorción y solubilidad. Adicionalmente, se genera una barrera física que ofrece protección contra el metabolismo.

Es común encontrar en el repertorio farmacológico de cualquier patología, compuestos con buenas propiedades farmacodinámicas para la prevención o la curación de la misma. Sin embargo, suelen aparecer desventajas desde el punto de vista farmacocinético, ya que pueden presentarse características de mala solubilidad en medio acuoso o de absorción, dificultando así el éxito del tratamiento. Por esta razón, el presente proyecto buscó aportar información acerca de la utilidad de la preparación de nanosistemas, en la resolución de las problemáticas anteriormente mencionadas.

2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DE ARTE

2.2.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA es una patología neurodegenerativa, la cual compromete diversos dominios cognitivos del paciente, generando pérdida de la memoria, la orientación, y la capacidad de razonamiento como principales sintomatologías. Epidemiológicamente es padecida por más de 44 millones de personas en el mundo, con un periodo de vida que va de tres a nueve años después de realizado el diagnóstico (Reitz & Mayeux, 2014). Esta condición puede ser causada tanto por circunstancias genéticas como por la edad del paciente, siendo este último el principal factor de riesgo. Por otra parte, a nivel molecular la enfermedad se asocia a un desbalance en el metabolismo de dos macromoléculas presentes en el cerebro: los péptidos β -amiloide (principalmente) y la proteína Tau hiperfosforilada (Querfurth & LaFerla, 2004).

Los β -amiloides o péptidos $A\beta$ son estructuras conformadas por una cantidad de aminoácidos en su estructura que puede variar de 36 hasta 43. Se caracterizan por tener múltiples hojas plegadas β en su estructura secundaria, lo que promueve la formación de agregados proteicos o placas amiloides, las cuales son insolubles (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2011). Estos péptidos son productos normales del metabolismo, pero desbalances entre su producción y aclaramiento pueden provocar EA.

La presencia de estos tipos de polipéptidos genera diversos mecanismos fisiopatológicos, los cuales derivan en las sintomatologías más características de la enfermedad. Entre estos mecanismos se encuentran:

- Fallo sináptico por interrupciones en la liberación de neurotransmisores, y por corrientes anómalas de iones.
- Agotamiento de neurotransmisores por disfunciones en los receptores.
- Disfunción mitocondrial por inhibición de las enzimas.
- Estrés oxidativo. Este se da ya que ciertas especies liberadas por las mitocondrias disfuncionales son susceptibles a convertirse en especies radicales del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species) y del nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés, Reactive Nitrogen Species). Dicho proceso es mediado por los péptidos $A\beta$, los cuales también poseen la capacidad de formar radicales libres (Yan et al., 1996). Las consecuencias son nefastas para las estructuras moleculares presentes en las neuronas, principalmente para las membranas por la peroxidación de los lípidos (Hensley et al., 1994).

- Otros, como la inflamación de estructuras en el sistema nervioso central, daño vascular en arteriolas del cerebro, y pérdida de la regulación de calcio.

El principal grupo farmacológico para el tratamiento del Alzheimer son los inhibidores de la colinesterasa (Rang, Dale, Ritter, Flower, & Henderson, 2012). Estos actúan disminuyendo el mecanismo de agotamiento de neurotransmisores, pues al impedir el funcionamiento de dicha enzima, se asegura mayor disponibilidad de acetilcolina y un correcto funcionamiento neuronal. Sin embargo, para este proyecto es de especial interés el mecanismo del estrés oxidativo.

2.2.2 Extractos de flavonoides y quercetina como antioxidantes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

En los últimos años, se ha investigado acerca de un grupo de extractos herbales de especial interés por sus efectos neuroprotectores. Uno de los que ha presentado mejores propiedades es el extracto NXQ, el cual posee un conjunto de flavonoides, destacándose la quercetina (ver figura 1) (Bei et al., 2009).

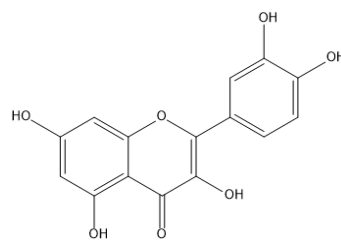


Figura 1. Estructura química de la quercetina

En la estructura química, se puede apreciar un núcleo C6-C3 de un anillo aromático unido a un anillo heterocíclico con un átomo de oxígeno. Este núcleo, se une a su vez a otro C6, correspondiente a un anillo aromático. Distribuidos en la estructura hay 5 grupos OH, haciendo que el compuesto sea polifenólico y, por lo tanto, que tenga capacidad de oxidarse (Afanas'ev, Dcrozhko, Brodskii, Kostyuk, & Potapovitch, 1989). Dicha oxidación se ve favorecida, ya que los radicales formados se pueden estabilizar en el anillo aromático, además de hacerlo en el sistema conjugado del heterociclo. Por esta razón, se puede lograr controlar el estrés oxidativo asociado a la EA, tal como lo han demostrado ciertos estudios de supervivencia neuronal realizados con este compuesto (Bei et al., 2007).

Sin embargo, el núcleo de su estructura química le confiere propiedades apolares. Además, el pKa de su OH más ácido es de 7,03 (Lemańska et al., 2004), por lo cual presenta una baja solubilidad en medio acuoso (principalmente en un medio ácido como el gástrico, en el cual se encuentra en estado neutro).

Como la disolución es la etapa previa a la absorción cuando la vía de administración de un medicamento es oral, también se ve limitado este proceso farmacocinético (Piskula & Terao, 1998). Por esta razón, el proyecto se enfoca en la producción de nanopartículas que ayuden a optimizar las propiedades fisicoquímicas de sistemas a base de quercetina, para que su uso en el tratamiento de la EA pueda ser más efectivo.

2.2.3 Nanopartículas

2.2.3.1 Generalidades

Las nanopartículas son sistemas sólidos coloidales, es decir, con un tamaño que se encuentra regularmente entre 100 y 500 nm. Además, su estructura geométrica les permite contener moléculas en su interior, funcionando así como transportadores o vectores. Dichas particularidades les confieren propiedades de interés a nivel aplicativo, ya que por su tamaño tienen la capacidad de entrar con facilidad a las células (Mosqueira et al., 2001). Además, si su núcleo es apolar, se da la posibilidad de solubilizar fármacos hidrofóbicos. Como valor agregado, se puede optimizar la estabilidad de las sustancias al protegerlas de factores ambientales como el agua, pH o el oxígeno (Mora-Huertas et al., 2010).

Dentro de estos sistemas se destacan las nanoesferas y las nanocápsulas, las cuales requieren de una matriz polimérica. Sin embargo, en las primeras esta se encuentra distribuida en toda el área de la nanopartícula, formando así una red que de una u otra forma desaprovecha espacio para la encapsulación de fármacos (Ato, 1996). Por su parte, las nanocápsulas tienen la matriz solo rodeando la nanopartícula en forma de membrana, por lo cual poseen mucho más espacio libre en su interior para depositar el fármaco (Mora-Huertas et al., 2010).

Cuando se preparan nanocápsulas, se busca que la cavidad sea líquida, conteniendo una sustancia que tenga la capacidad de disolver el fármaco de interés. Sin embargo, se han preparado sistemas en los cuales el fármaco se ubica embebido en la membrana polimérica, o en la superficie por procesos de adsorción.

Uno de los principales procedimientos para la preparación de nanocápsulas corresponde al método de Nanoprecipitación.

2.2.3.2 Método de la Nanoprecipitación

Este método requiere dos fases, una orgánica y una acuosa, las cuales al final van a mezclarse (Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury, & Benita, 1989). Cabe

resaltar que se requiere de un método de dosificación por goteo, el cual permita controlar la velocidad con la que se agrega la fase orgánica en la acuosa.

Cuando el fármaco es hidrofóbico, la fase orgánica se compone de un solvente de tipo apolar, un polímero que rodeará la nanocápsula, y el fármaco disuelto en un aceite (lo cual representa el núcleo de la misma). Por su parte, la fase acuosa solo contiene agua (llamado compuesto no solvente para este caso) y un agente estabilizante de la mezcla final.

Las proporciones aproximadas de cada componente son (Mora-Huertas et al., 2010):

Tabla 1. Composiciones sugeridas para el método de Nanoprecipitación.

Componente	Composición
Solvente	25 mL
Fármaco	10-25 mg
Polímero	0,2-0,5% (en gramos) del solvente
Aceite	1,0-5,0% (en gramos) del solvente
Agua	50 mL
Agente estabilizante	0,2-0,5% (en gramos) del no solvente

A medida que la fase orgánica se va adicionando en la acuosa, el solvente apolar sufre un proceso de desplazamiento hacia la misma. Esto se rige por el efecto de Gibbs-Marangoni, el cual se basa en un gradiente de potencial químico asociado a la diferencia de tensiones superficiales entre dos líquidos (Mcmanamey, Davies, & Coe, 1973). En este caso, el agua tiene una mayor tensión superficial que el solvente, por lo cual su fuerza contráctil es mayor. Por esta razón, cuando el agua entra en contacto con dicho solvente, se mueve como si se estuviera expandiendo en el medio, producto de la fuerza neta resultante (ver figura 2, las esferas blancas representan las moléculas de agua, y la esfera verde es una molécula del solvente apolar), y de las interacciones no favorables entre ambas especies químicas. Este proceso deriva en el desplazamiento del solvente desde la fase orgánica a la acuosa, generando zonas de alta concentración de polímero, y movimientos inducidos en el mismo debido a la turbulencia. Por lo tanto, el polímero tiende a agregarse en la zona de mayor estabilidad termodinámica, es decir, alrededor de las gotículas de aceite en las que el fármaco está disuelto. De esta manera, disminuye la zona de contacto con el resto del sistema, y forma la nanocápsula (Quintanar-Guerrero, Allémann, Fessi, & Doelker, 1998).

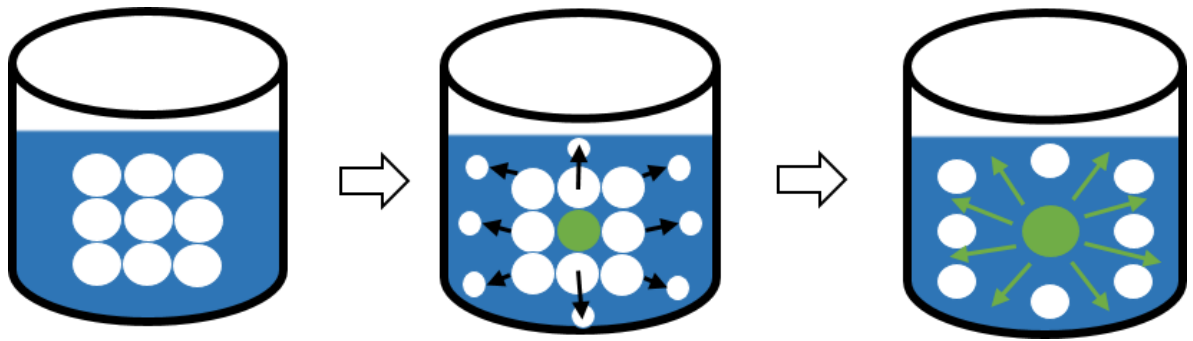


Figura 2. Efecto Gibbs-Marangoni.

Un esquema del proceso de Nanoprecipitación puede encontrarse en la figura 3.

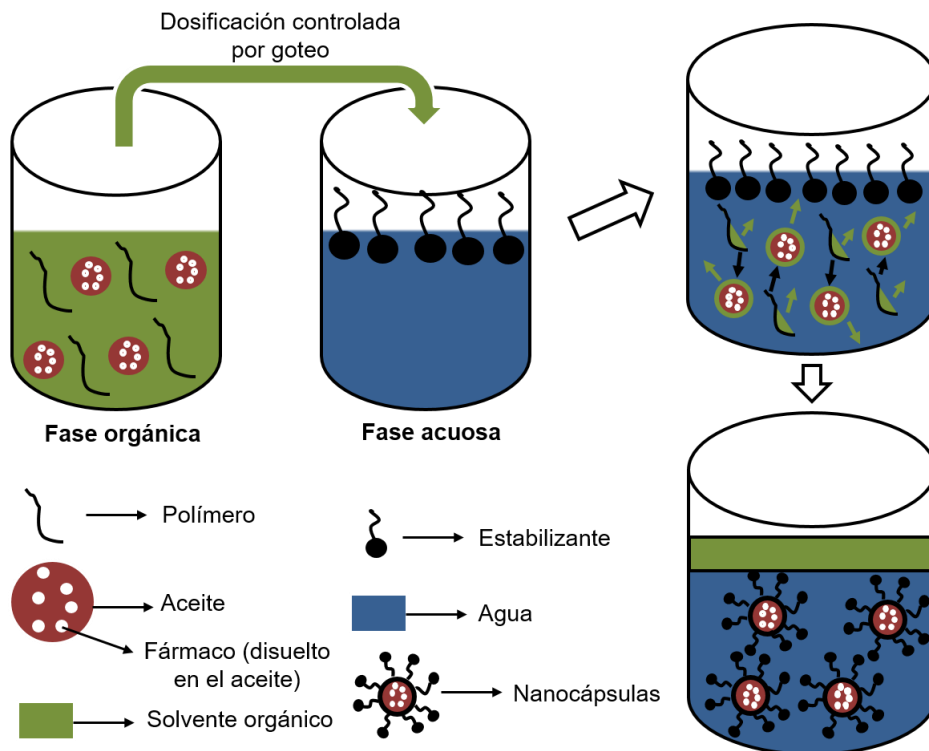


Figura 3. Esquema del proceso de preparación de nanocápsulas por el método de Nanoprecipitación.

De manera general, suelen utilizarse polímeros biodegradables, biocompatibles, y sintéticos, pues han demostrado una mejor reproducibilidad. Poliésteres como la Policaprolactona (PCL), y polialcoholes como el Polivinil Alcohol, son ampliamente

referenciados en la literatura. Sus estructuras químicas se presentan en las figuras 4 y 5, respectivamente (Mora-Huertas et al., 2010).

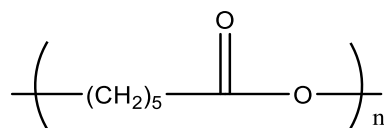


Figura 4. Estructura química del PCL.

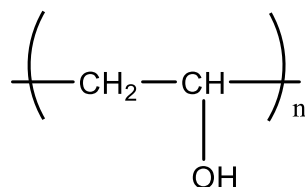


Figura 5. Estructura química del PVA.

En cuanto al estabilizante y el aceite, se busca que no sean tóxicos, y que tampoco permitan la solubilización del polímero, pues no se formaría la nanocápsula por precipitación del mismo. El poloxámero 188 (ver figura 6) es un surfactante neutro, el cual se utiliza por su eficiencia para estabilizar sistemas heterogéneos, y por su biodegradabilidad. Por otra parte, los aceites derivados de los ácidos cáprico y caprílico, tienen la capacidad de disolver una gran cantidad de fármacos no polares. Un ejemplo de estos aceites es el Miglyol, y su estructura química se presenta en la figura 7.

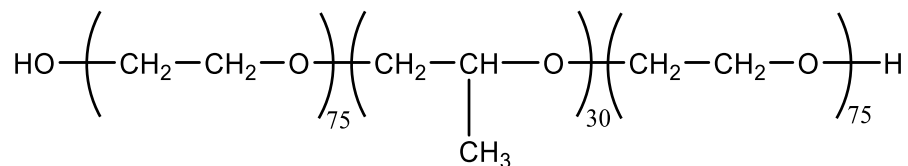


Figura 6. Estructura química del Poloxámero 188.

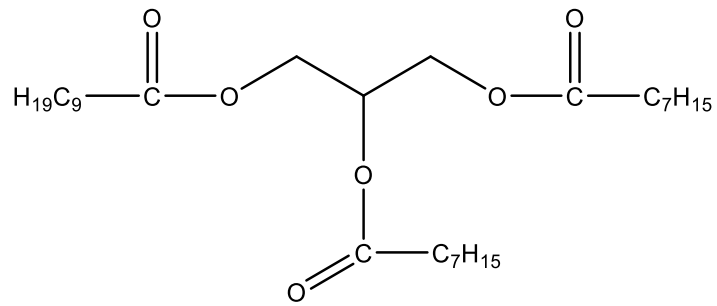


Figura 7. Estructura química del Miglyol.

2.2.3.3 Consideraciones y principales parámetros fisicoquímicos

Los pasos subsiguientes a la formación de las nanopartículas incluyen: la eliminación de los solventes (generalmente realizada mediante procesos como la rotaevaporación, aprovechando la alta presión de vapor de los mismos para aplicar vacío a la muestra), y la purificación del sistema (para lo que se utiliza comúnmente diálisis o ultrafiltración). De esta manera se obtiene una suspensión de las nanocápsulas (Raffin Pohlmann, Weiss, Mertins, Pesce da Silveira, & Stanisçuaski Guterres, 2002). Posteriormente se procede a la caracterización fisicoquímica de los nanosistemas.

Dos de los parámetros más importantes a medir son el tamaño promedio de las nanocápsulas (expresado como el diámetro hidrodinámico), y la dispersidad de las mismas (distribución de los tamaños). Para la respectiva determinación, se usan métodos basados en la dispersión de luz dinámica de las partículas (DLS por sus siglas en inglés, Dynamic Light Scattering) (Moinard-Chécot, Chevalier, Briançon, Beney, & Fessi, 2008).

Las técnicas basadas en DLS, generan una correlación entre el tamaño de la partícula, y el patrón de los ángulos con que dispersan la luz. Dicho patrón es dependiente del diámetro hidrodinámico de la misma, tal y como se observa en la figura 8 (Bhattacharjee, 2016). Factores que se tienen en cuenta al momento de generar la correlación incluyen la viscosidad del medio, y el movimiento Browniano de las partículas.

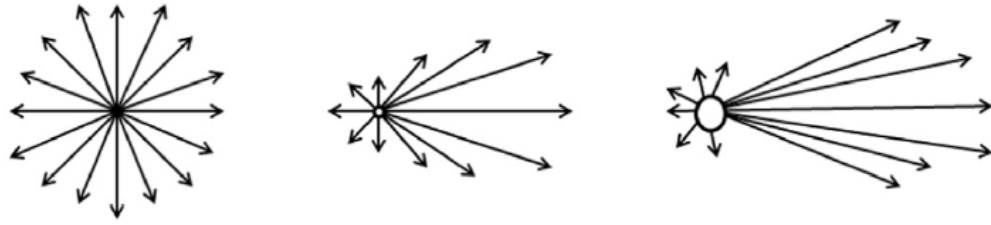
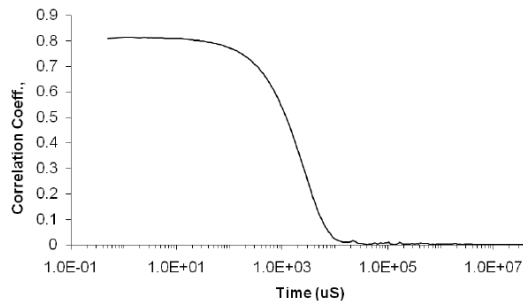


Figura 8. Patrones de dispersión de luz en diferentes tamaños de partícula.

Tomado de (Bhattacharjee, 2016).

La dispersidad es calculada con base en la distribución de todos los tamaños registrados que se encuentran en la muestra. Una dispersidad menor a 0,3, equivale a una población de partículas con rangos de tamaño homogéneos (Gaumet, Vargas, Gurny, & Delie, 2008).

De igual manera, debe tenerse en cuenta la función de correlación para las poblaciones de tamaños. Debido a que la técnica DLS tiene en cuenta el movimiento Browniano de las partículas, se mide el tiempo durante el cual las mismas son detectadas por el láser. Por lo tanto, el comportamiento esperado para esta función es sigmoideo, es decir, que se empiece con una alta intensidad de detección de la población de partículas por el láser, y con el tiempo haya un decaimiento debido al movimiento aleatorio de estas, tal y como se muestra en la gráfica 1.



Gráfica 1. Función de correlación vs. Tiempo. Tomado de (Bhattacharjee, 2016)

La función de correlación es óptima cuando tiene valores iniciales que se encuentran entre 0,8 y 1,0 (Bhattacharjee, 2016).

Otro parámetro de importancia es el potencial zeta (ζ). Este es la medida de que tan cargada se encuentra la interfase de la nanopartícula en estudio, con respecto al medio que la rodea. Para entenderlo, se debe analizar la teoría de la doble capa eléctrica. Cuando la nanopartícula está cargada (por ejemplo negativamente, como puede observarse en la figura 9), alrededor de ella se forma una capa compacta debido a las contracciones del medio, denominada capa de Stern. Posteriormente, se

crea la capa de deslizamiento, en la que iones presentes en la solución se acomodan alrededor de la capa de Stern, mediante interacciones electrostáticas de largo alcance.

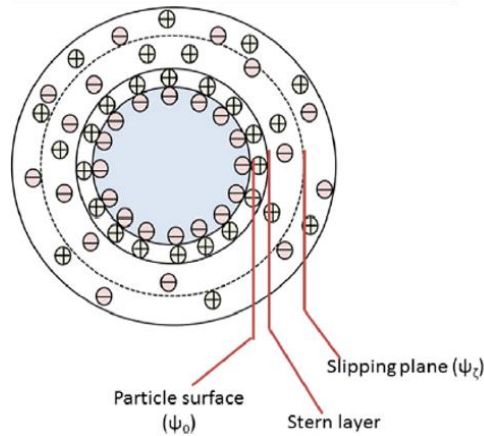


Figura 9. Modelo de la doble capa eléctrica. Tomado de (Bhattacharjee, 2016).

De manera física, se entiende el potencial zeta como la diferencia de potencial entre la superficie, y la capa de deslizamiento (Bhattacharjee, 2016). Brinda principalmente información de la estabilidad de la partícula, y en conjunto con el tamaño, ayuda a caracterizar fisicoquímicamente el tipo de asociación entre el fármaco y la nanocápsula (Mora-Huertas et al., 2010). Este valor puede atribuirse al polímero, al estabilizante, y/o al fármaco si se encuentra adsorbido en la superficie. Valores con magnitudes mayores que ± 10 mV, son deseados para asegurar la estabilidad.

El último factor de interés en la caracterización de nanopartículas es la eficiencia de encapsulación. Esta describe la cantidad de fármaco que se encuentra asociado al nanosistema. Se define matemáticamente como:

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = 100 - \left(\frac{\text{Cantidad de fármaco libre en la muestra}}{\text{Cantidad total de fármaco en la formulación}} \times 100 \right) \quad (1)$$

Para encontrar la cantidad de fármaco libre en la muestra, se puede centrifugar la misma, haciendo que las nanopartículas se sedimenten. Luego, se utiliza un método analítico para cuantificar la concentración de fármaco en el sobrenadante (Mora-Huertas et al., 2010).

2.2.3.4 Factores que afectan los parámetros fisicoquímicos de las nanocápsulas

Múltiples variables operacionales y de los materiales pueden afectar el tamaño, la dispersidad, el potencial zeta, y la eficiencia de encapsulación de las nanopartículas. Entre ellas se encuentran: la velocidad a la cual se agrega la fase orgánica en la acuosa, la velocidad de agitación del sistema, y la solubilidad del polímero en el aceite. Esta última debe ser baja para poder formar un sistema bifásico en la superficie de la nanocápsula (Mora-Huertas et al., 2010).

Además de la solubilidad, otras variables con respecto al polímero pueden afectar las características de los nanosistemas. Por ejemplo el peso molecular, el cual entre más alto, genera mayor restricción para el desplazamiento del solvente orgánico, dificultando el proceso de formación de las nanopartículas. La concentración de polímero puede presentar un efecto similar (Romero-Cano & Vincent, 2002).

El tiempo es otro factor que afecta la estabilidad de las nanopartículas. Es normal que se vaya dando una desorción de cargas en la superficie, y que el potencial zeta disminuya en magnitud con el paso de los días. Esto genera fenómenos de floculación y coagulación, que se traducen principalmente en aumentos en el tamaño (Mora-Huertas et al., 2010).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo general

Elaborar y caracterizar distintos tipos de nanosistemas de quercetina, preparados a partir de dos diferentes materiales poliméricos, e implementados mediante la metodología de Nanoprecipitación.

2.3.2 Objetivos específicos

- Desarrollar nanocápsulas de quercetina mediante el método de Nanoprecipitación, a partir de dos distintos materiales poliméricos, correspondientes a Policaprolactona (PCL) y Polivinil Alcohol (PVA).
- Caracterizar fisicoquímicamente los nanosistemas, midiendo el diámetro hidrodinámico, potencial zeta, la dispersidad, y la eficiencia de encapsulación de los mismos.
- Evaluar el efecto de la concentración y el peso molecular de cada polímero en los parámetros de caracterización fisicoquímica de los nanosistemas.
- Estudiar la estabilidad y el efecto del tiempo en los parámetros de caracterización fisicoquímica de los nanosistemas.

2.4 METODOLOGÍA UTILIZADA

2.4.1 Materiales

La quercetina y los materiales poliméricos PVA y PCL fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, y se usaron como se recibieron. El PCL se adquirió a tres diferentes valores de número molecular (Mn por sus siglas en inglés, molecular number) correspondientes a 10000 Da, 45000 Da, y 80000 Da. Por otra parte, el PVA fue adquirido en tres diferentes rangos de peso molecular (Mw por sus siglas en inglés, molecular weight), los cuales equivalen a 31000-50000 Da, 85000-124000 Da, y 146000-186000 Da. El estabilizante Poloxámero 188, el aceite Miglyol, y el solvente acetona, fueron provistos por el almacén de laboratorios de la Universidad Icesi, y fueron usados como se recibieron. El agua ultra-pura fue producida con un sistema de purificación de agua Millipore Elix Essential, el cual se encuentra en las instalaciones de la Universidad Icesi.

2.4.2 Obtención de nanocápsulas mediante el método de Nanoprecipitación

La obtención de nanosistemas por este método requirió de la formación de dos fases, como se mencionó anteriormente. La metodología se basó en la propuesta por Fessi (Fessi et al., 1989). La fase orgánica contenía los siguientes componentes:

Tabla 2. Composición de la fase orgánica para el método de Nanoprecipitación.

Componente	Material	Cantidad
Fármaco	Quercetina	15 mg
Aceite	Miglyol	0,5 mL
Solvente	Acetona	25 mL
Polímero	PCL (Policaprolactona) o PVA (Polivinil alcohol)	50 mg o 125 mg

Por su parte, esta fue la composición de la fase acuosa:

Tabla 3. Composición de la fase acuosa para el método de Nanoprecipitación.

Componente	Material	Cantidad
No solvente	Agua	50 mL
Estabilizante	Poloxámero 188	250 mg

El procedimiento experimental se llevó a cabo de la siguiente manera:

Para preparar la fase orgánica, la cantidad estipulada de polímero se disolvió en los 25 mL de acetona a una agitación de 500 rpm, en un recipiente A durante 1 hora. En un recipiente B se disolvieron los 15 mg de quercetina en los 0,5 mL Miglyol. Cuando este proceso se completó, se agregó dicho sistema al recipiente A, y se dejó por 30 minutos sin detener la agitación. En un recipiente C se formó la fase acuosa, para lo cual se adicionaron los 250 mg de Poloxámero 188 en 50 mL de agua ultra-pura a una agitación constante de 500 rpm hasta completa disolución.

Posteriormente, se agregó la fase orgánica a la fase acuosa para formar las nanocápsulas. Para esto, el sistema de dosificación por goteo elegido fue mediante el uso de una bureta de 25 mL, en la que se depositó la fase orgánica proveniente del recipiente A (ver montaje en la figura 10). El goteo fue controlado manualmente por el investigador, a una tasa de aproximadamente 2 mL/min, y la agitación del sistema continuó a 500 rpm. Una vez dosificada toda la fase orgánica, la agitación se prolongó por 10 minutos más.

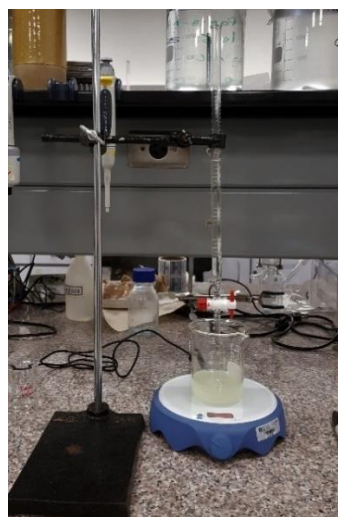


Figura 10. Montaje para la dosificación de la fase orgánica en la acuosa.

2.4.3 Concentración y purificación de las nanocápsulas

La concentración, y la eliminación del solvente orgánico, se llevaron a cabo mediante la aplicación de vacío y temperatura con un rotaevaporador marca Heidolph. Se utilizó un vacío inicial de 400 mbar, y se hicieron disminuciones de 100 mbar cada 10 minutos, hasta llegar a 100 mbar. La temperatura aplicada fue de 55°C y la velocidad de rotación 155 rpm. Posteriormente, el exceso de polímero precipitado se filtró a vacío con papel filtro cuantitativo. Por último, se midió el volumen resultante de la suspensión.

2.4.4 Caracterización de las nanocápsulas

La caracterización se realizó principalmente mediante las medidas de tamaño (o diámetro hidrodinámico, D_H), dispersidad, y potencial zeta. Estas fueron determinadas mediante el equipo Z-sizer nano-ZSP, comercializado por Malvern Instrument, y se hicieron todas por triplicado. En cuanto a la preparación de la muestra, se hizo una dilución de 5:5000 (v/v) de la misma en agua.

El diámetro hidrodinámico y la dispersidad fueron medidos por dispersión de luz dinámica, con un ángulo de detección de 173° , y a 25°C . El potencial zeta (ζ) se midió a través de la movilidad electroforética (μ). Para esto, se lee mediante un detector la frecuencia de la luz dispersada por las partículas cuando se les aplica un potencial. Dicha frecuencia es proporcional a la rapidez con la que se mueven las mismas. Posteriormente, el equipo utiliza la relación de Smoluchwski (Dukhin & Parlia, 2014) para calcular el potencial zeta:

$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\varepsilon} \quad (2)$$

En donde η es la viscosidad y ε la constante dieléctrica del medio (agua para ambos casos).

Adicionalmente, se evaluó la eficiencia de encapsulación de la quercetina mediante la ecuación 1. La centrifugación se llevó a cabo con una microcentrífuga Hettich a una velocidad de 9700 rpm, y la muestra fue puesta en tubos VWR con filtro de $0,2 \mu\text{m}$ para optimizar la separación de las nanocápsulas y el sobrenadante. La cantidad de fármaco libre en el sobrenadante se midió por medio de espectroscopia UV/Vis, con un espectrofotómetro Shimadzu acoplado a una termocupla. Para determinar la longitud de onda de máxima absorción, se realizó un barrido de 200-800 nm de la quercetina en una solución de 300 ppm en etanol-agua 4:1 respectivamente, debido a la baja solubilidad del fármaco en agua. El resultado fue 374 nm. Con este valor de longitud de onda, se realizó la curva de calibración, la cual se muestra en el anexo 1.

Como dato adicional, se midió el pH de todos los sistemas, con el fin de entender posibles procesos de ionización de los componentes de la formulación. Los resultados fueron analizados usando el software Graph Pad Prism 5.

2.4.4.1 Efecto del tipo, el peso molecular, y la concentración de polímero

Para evaluar el efecto del tipo de polímero, se usaron PCL y PVA por separado en cada formulación. Estos se diferencian en que uno tiene una cadena alquílica de seis carbonos en su monómero, mientras que el otro tiene dos, respectivamente.

Además, el PCL presenta un grupo éster susceptible a hidrólisis, mientras que el PVA tiene un grupo hidroxilo estable.

El efecto del peso (o el número) molecular, Mw o Mn respectivamente, se estudió mediante la utilización de tres diferentes valores de este parámetro para cada polímero, los cuales pueden observarse en la sección de materiales.

Para analizar la influencia de la concentración de polímero, se utilizaron el valor máximo y el valor mínimo que se proponen en la tabla 1. Estos corresponden al 0,2% y 0,5% de polímero en gramos, con respecto al volumen usado del solvente (25 mL en este caso). Por lo tanto, las cantidades a utilizar corresponden a 50 mg y 125 mg respectivamente para cada polímero, como se observa en la tabla 2.

En total se evaluaron 12 sistemas, como se observa en la tabla 4:

Tabla 4. Sistemas desarrollados en el proyecto.

Sistema	Polímero	Mw o Mn (Da)	Cantidad en la formulación (mg)
1	PCL	10000	50
2	PCL	10000	125
3	PCL	45000	50
4	PCL	45000	125
5	PCL	80000	50
6	PCL	80000	125
7	PVA	31000 - 50000	50
8	PVA	31000 - 50000	125
9	PVA	85000 -124000	50
10	PVA	85000 -124000	125
11	PVA	146000 - 186000	50
12	PVA	146000 - 186000	125

Todos estos sistemas fueron caracterizados.

2.4.4.2 Efecto del tiempo en la estabilidad de las nanocápsulas

Para encontrar la influencia del tiempo, los 12 sistemas anteriores fueron caracterizados en los días 0 (día en que se sintetizaron), 1, 2 y 3.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Obtención de nanocápsulas mediante el método de Nanoprecipitación

Como se mencionó anteriormente en la metodología, las nanopartículas se forman al adicionar la fase orgánica en la acuosa. El cambio en la apariencia de la fase acuosa, se muestra en la figura 11.

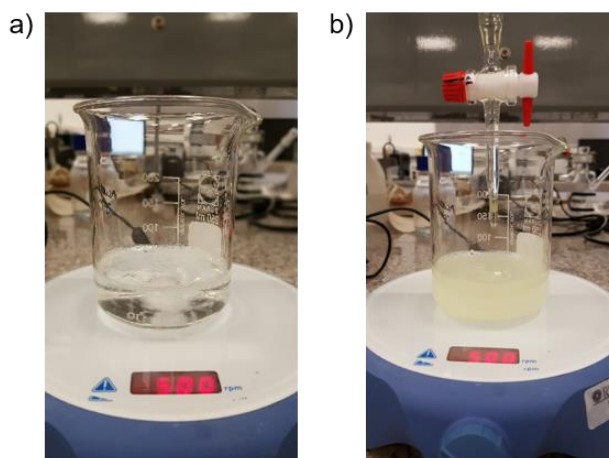


Figura 11. Cambio en la apariencia de la fase acuosa **a)** antes de la adición de la fase orgánica y **b)** después de la adición de la fase orgánica.

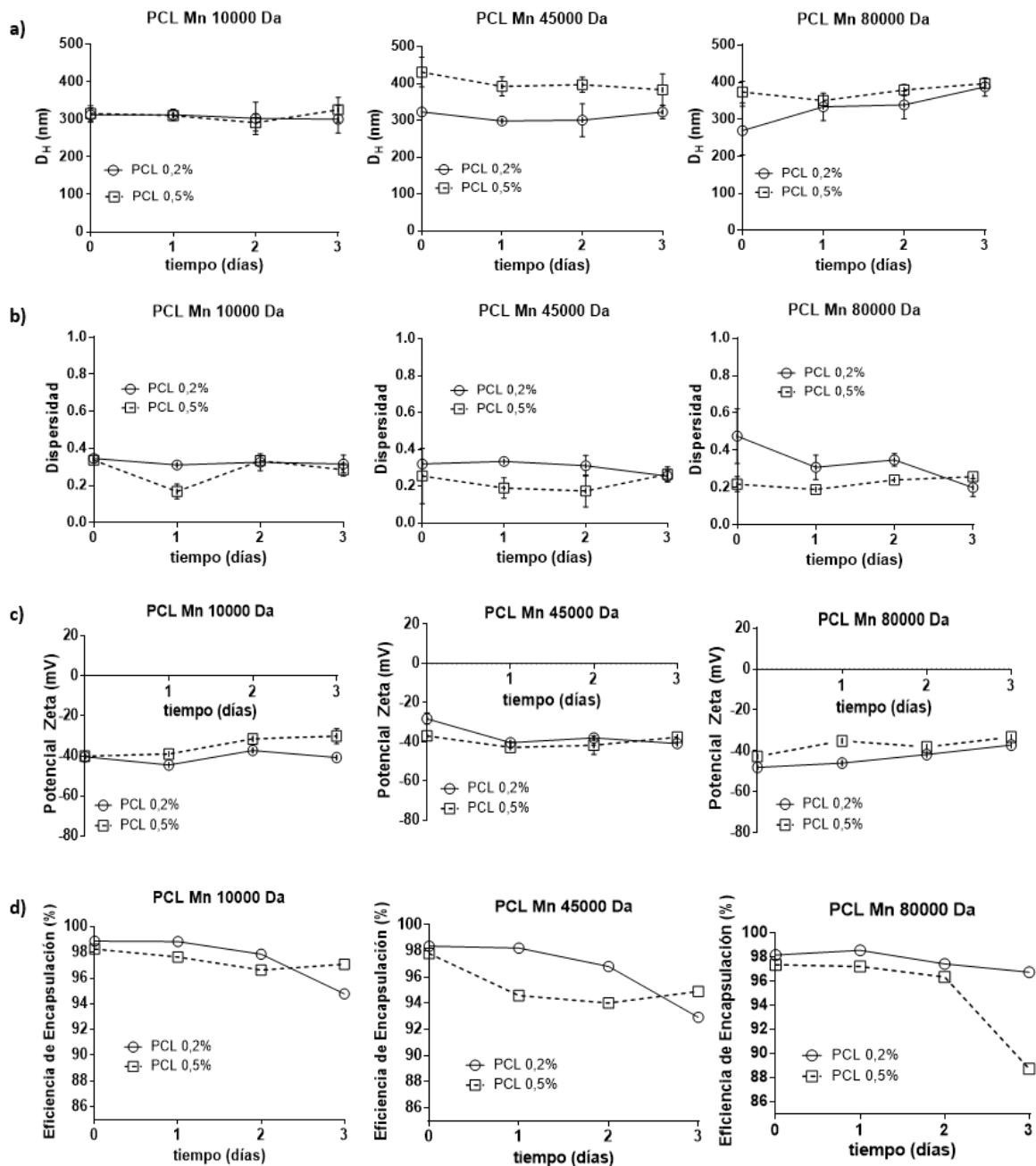
El cambio en el aspecto del sistema, se debe a la formación de las nanocápsulas, las cuales son consideradas partículas que se encuentran en un rango coloidal de tamaño (entre 1 nm y 1 μ m). Por lo tanto, el medio se torna opalescente por el efecto Tyndall, en el cual dichas partículas dispersan la luz al tener un diámetro mayor que el que tendrían si estuvieran en una solución homogénea.

2.5.2 Concentración y purificación de las nanocápsulas

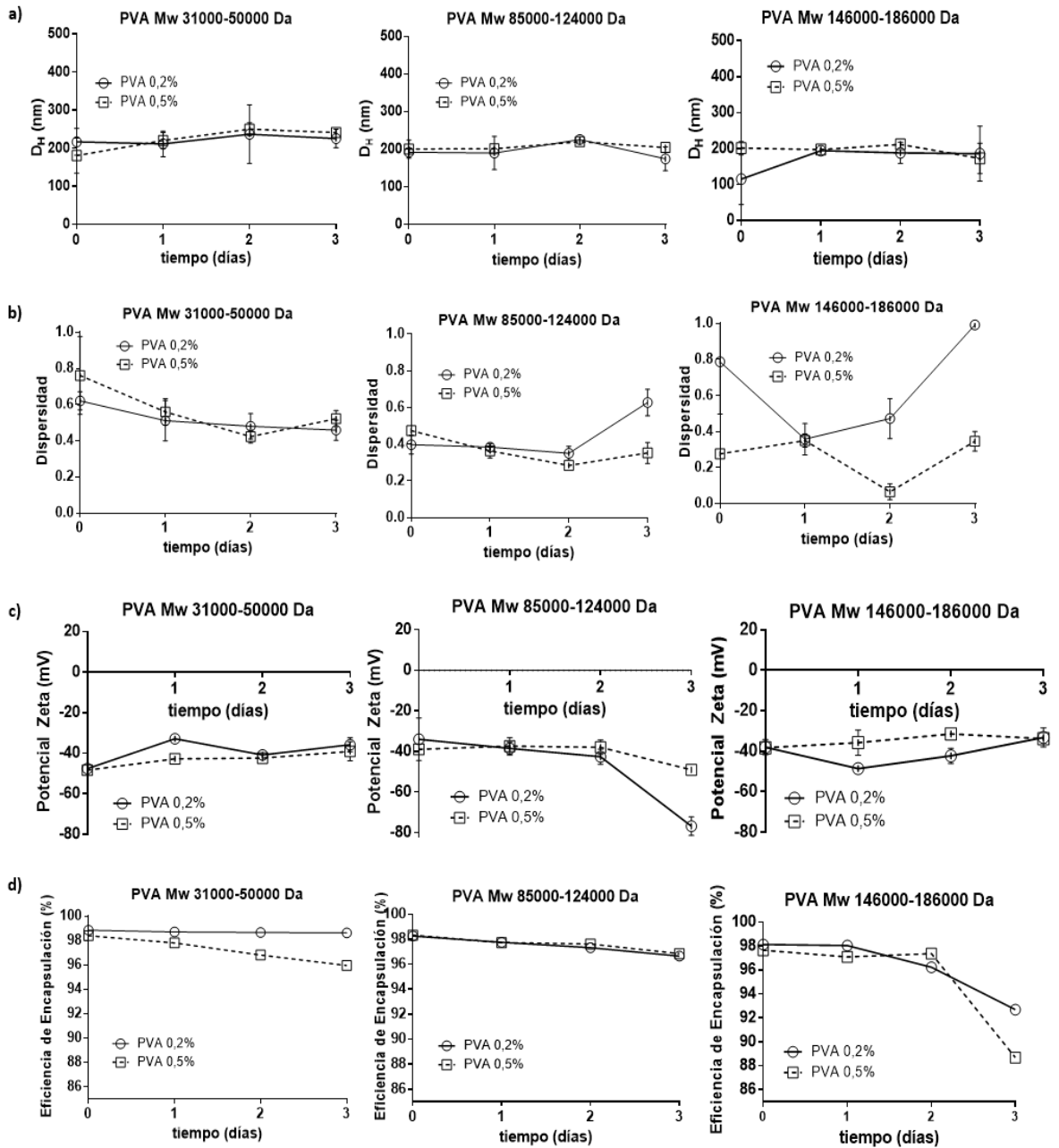
La suspensión fue rotaevaporada hasta llevarse a un volumen menor de 40 mL, para asegurar la completa eliminación del solvente orgánico. Esto debido a que el volumen total del sistema era de aproximadamente 75 mL (25 mL de fase orgánica y 50 mL de fase acuosa). También se tuvo en cuenta que desapareciera completamente el olor a acetona.

2.5.3 Caracterización de las nanocápsulas

Los resultados de la caracterización se muestran en las gráficas 2 y 3.

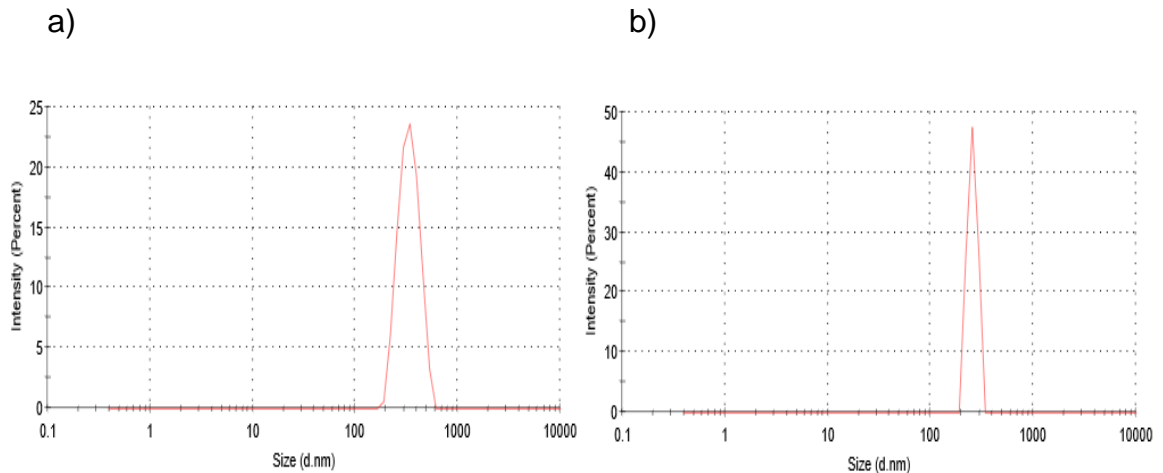


Gráfica 2. Caracterización de las nanopartículas de PCL. a) Diámetro hidrodinámico, b) Dispersidad, c) Potencial Zeta y d) Eficiencia de Encapsulación.



Gráfica 3. Caracterización de las nanopartículas de PVA. a) Diámetro hidrodinámico, b) Dispersidad, c) Potencial Zeta y d) Eficiencia de Encapsulación.

De manera general, se observaron funciones de correlación inicialmente cercanas a 1 en todos los casos. El PCL presentó diámetros hidrodinámicos en un rango entre aproximadamente 250 nm y 450 nm, mientras que para el PVA, D_H oscila entre 150 nm y 200 nm. Ambos rangos son coherentes con los presentados en la literatura para el método de Nanoprecipitación, y el comportamiento es monomodal (Mora-Huertas et al., 2010). En la gráfica 4, se muestran ejemplos de tamaños de partícula para ambos polímeros, para observar que se distribuyen principalmente como una sola población.



Gráfica 4. Distribución de tamaños de partícula para nanocápsulas de a) PCL y b) PVA.

Sin embargo, se encuentra una diferencia del orden de 100 nm. Esta puede deberse a que el PVA tiene un monómero más polar que el PCL, por la cadena alquílica más pequeña, razón por la que posee la capacidad de disolverse más fácil en un medio acuoso. En este orden de ideas, cuando la fase orgánica que contiene PVA entra en contacto con la acuosa, el polímero tiene interacciones más favorables con el medio que el PCL. Así, el desplazamiento del solvente (efecto Gibbs-Marangoni) es más efectivo, pues el sistema se encuentra más homogéneo. Como consecuencia, las nanocápsulas que se forman son más pequeñas, ya que no se da tiempo para que el polímero se agregue.

La dispersidad de los tamaños del PCL llega a mantenerse constante, con valores que oscilan entre 0,2 y 0,4. Esto indica una buena homogeneidad en el D_H . Sin embargo, para el PVA se encuentran dispersidades más altas, casi del orden de 0,8. Se debe tener en cuenta que el PVA es un polímero que se obtiene a partir de la hidrólisis de un polímero precursor, correspondiente al acetato de polivinilo (ver reacción en la figura 12) (Helvenston & Stewart, 1970).

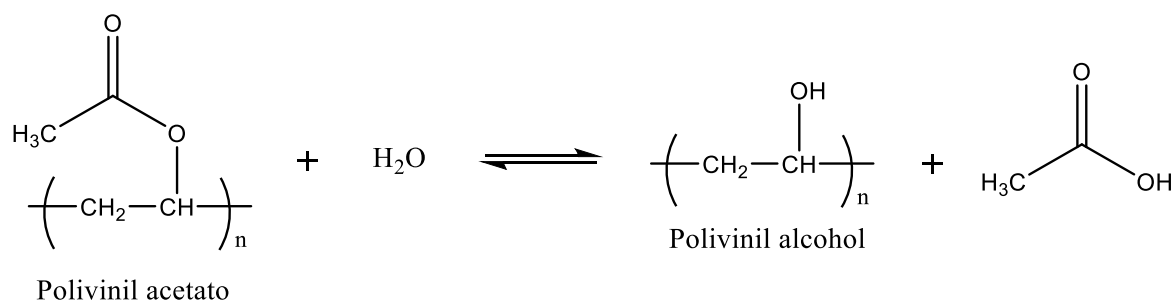


Figura 12. Reacción de hidrolisis del Polivinil acetato para producir Polivinil alcohol.

La anterior reacción no es homogénea en todos los monómeros del polímero precursor, y por lo tanto, se generan fragmentos de distintos pesos moleculares para el PVA. Es por esta razón que el mismo es comercializado con un rango de pesos moleculares, más no con un valor específico (ver sección 2.4.1, correspondiente a los materiales). Dicha dispersidad en los tamaños de los fragmentos del polímero, se traduce en dispersidad en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas que forma.

Los valores de potencial zeta para ambos polímeros se encuentran entre -30 mV y -50 mV. Por lo tanto, todos los sistemas se consideran termodinámicamente estables. El valor negativo para las nanopartículas de PCL, puede atribuirse principalmente a la formación de grupos ácidos carboxílicos ionizables, producto de la hidrolisis de los monómeros, como se observa en la figura 13. Dicha reacción genera moléculas de ácido hexanóico, que tienen un pKa de 4,88. Como el polímero rodea la nanocápsula, la superficie se carga negativamente a valores de pH por encima del pKa. El pH osciló entre 5,9 y 7,0 para la mayoría de los sistemas, desde el día 0 en adelante (ver anexo 2).

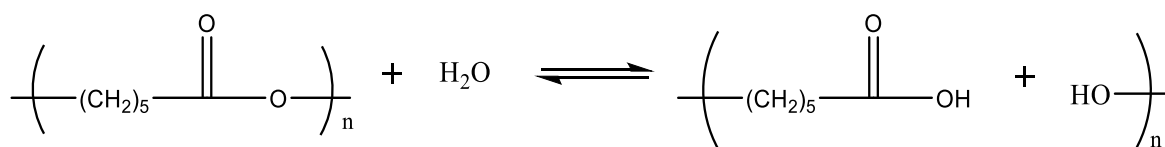


Figura 13. Reacción de hidrolisis del PCL.

Sin embargo, llama la atención que los sistemas con PVA, el cual tiene un grupo hidroxilo no ionizable, presenten de igual manera valores de potencial zeta negativos, cuando se esperarían que fueran neutros. Se sugirió entonces que otros componentes de la formulación, como el Poloxámero 188, o el Miglyol, podrían estar polarizando la superficie. Para comprobarlo, se realizaron mezclas binarias entre cada una de estas materias primas por individual, y agua. Posteriormente, se hicieron medidas de potencial zeta por triplicado para cada mezcla, y el promedio de estos valores se muestra en la tabla 5.

Las eficiencias de encapsulación oscilan entre 96 y 99% para ambos polímeros. Los patrones de liberación se ven más afectados por el peso molecular, la concentración, y el tiempo, que por los tipos de polímero. Por esta razón, son discutidos en los apartados posteriores.

2.5.3.1 Efecto de la concentración de polímero

Como se discutió en el apartado anterior, el PCL genera diámetros hidrodinámicos más grandes que el PVA, posiblemente por una menor solubilidad en medio acuoso, la cual no permite un correcto desplazamiento de solvente. Este efecto se ve incrementado con la concentración de 0,5%, como se observa en la gráfica 1 a), pues el medio se encuentra más saturado. Dicha tendencia no se presenta para el caso del PVA.

Sin embargo, estas concentraciones altas generan dispersidades menores en los tamaños de las nanopartículas formuladas con PCL. Aunque la migración del solvente se ve disminuida y por eso se generan partículas más grandes, son menos los movimientos aleatorios de las moléculas de polímero. Por esta razón, pueden organizarse con un patrón definido que produce menor número de poblaciones de nanocápsulas con diferentes tamaños de partículas. En el caso del PVA, no se observan tendencias de dispersión dependientes de la concentración del mismo, debido a que este parámetro varía por su ruta sintética, como se explicó en el apartado anterior.

El PCL tiene valores de potencial zeta negativos debido a la hidrólisis del polímero. Concentraciones bajas de polímero se hidrolizan más rápido, pues representan un menor número de moléculas para reaccionar. Esto hace que se alcancen valores un poco más negativos de carga superficial con concentraciones equivalentes al 0,2%, aunque no es una tendencia que se presente de manera muy significativa. Por su parte, el PVA presenta los mismos comportamientos con concentraciones bajas, aunque de una manera más marcada. Se sugiere que, debido al rápido desplazamiento de solvente en estos sistemas, aunque se generan nanocápsulas pequeñas, no se alcanza a encapsular toda la cantidad de aceite. Una posible prueba de esta hipótesis se muestra en la figura 15, en la cual se observan gotículas de aceite en la superficie de la suspensión de nanopartículas a base de PVA.



Figura 15. Nanosistema a base de PVA al 0,2% y Mw = 85000 - 124000.

El remanente de aceite afuera de las nanocápsulas, tiende a generar valores de potencial zeta negativos.

En cuanto a la eficiencia de encapsulación en los nanosistemas de PCL, se observa una tendencia de menores porcentajes de quercetina dentro de las nanocápsulas para las concentraciones más altas de polímero. Este patrón es inversamente proporcional a los diámetros hidrodinámicos, pues estos son mayores para la concentración de 0,5%. Los tamaños más grandes, se relacionan con un mayor espacio para la liberación del fármaco. Además, como se discutió anteriormente, los sistemas con porcentaje de polímero igual a 0,2%, se hidrolizan más rápido, generando un sistema de membrana ionizado que impide la permeación del activo. En el caso del PVA, no se observaron cambios muy significativos en el porcentaje de encapsulación.

2.5.3.2 Efecto del peso molecular del polímero

Los cambios en los tamaños para los nanosistemas a base de PCL, muestran estar más en función de la concentración que del peso molecular. Sin embargo, se observa que los mayores D_H se presentan a mayores pesos moleculares, pues las cadenas grandes de polímero impiden en mayor proporción el desplazamiento de solvente, con respecto a las cadenas pequeñas. Esto debido a la menor solubilidad y a la disminución en los movimientos aleatorios del polímero. Dicha tendencia no se presenta para el caso del PVA.

La dispersidad de los tamaños de los sistemas, aparentemente no se ve afectada por el peso molecular. Para las nanopartículas de PCL se observan en todos los casos las mismas tendencias. Por su parte, para el PVA las dispersidades son

aleatorias, en función principalmente de la polidispersidad del propio polímero, como se discutió anteriormente.

Los valores de carga superficial tampoco demuestran verse afectados por el cambio de peso molecular, ni en el caso de las nanocápsulas de PCL, ni de las nanocápsulas de PVA.

Por su parte, el aumento del peso molecular aumenta el patrón de liberación de la quercetina para el caso de ambos polímeros. Esto quiere decir que disminuye la eficiencia de encapsulación. En el caso del PCL, el Mn de 10000 Da presenta tamaños más pequeños, y por lo tanto, menor espacio de liberación. En cambio, el sistema con Mn de 80000 Da libera mayor cantidad por el tamaño. Sin embargo, el cambio significativo en la eficiencia de liberación se observa después del día 2. Para explicar esto, se sugiere que después de este tiempo, el sistema hidrolizado empieza a hincharse por las interacciones favorables con el agua, permitiendo la permeación de manera más fácil. Esta hipótesis también podría explicar la leve tendencia a aumentar el diámetro hidrodinámico en este sistema.

Para el caso del PVA, el único parámetro que puede explicar el mayor patrón de liberación a pesos moleculares más grandes, es que cuando los valores de Mw van de 146000 hasta 186000, hay una dispersidad muy marcada. La variación tan significativa en los tamaños de partícula, se traduce en variación en el espacio efectivo que tiene el fármaco para liberarse.

2.5.3.3 Efecto del tiempo en la estabilidad de las nanocápsulas

De manera general, los parámetros de tamaño y potencial zeta son estables con el paso de los días. Esto se debe a que partículas cargadas presentan inestabilidad cinética al repelerse entre ellas, haciendo que las mismas no tiendan a agregarse.

La dispersidad es estable en el caso del PCL, pero no para PVA, pues este parámetro depende de la polidispersidad propia del polímero, como fue discutido anteriormente.

La eficiencia de encapsulación varía conforme pasan los días para la mayoría de los sistemas, pero esto ocurre en función del peso molecular y la concentración de ambos polímeros, como fue explicado anteriormente.

2.6 CONCLUSIONES

Se llevó a cabo el desarrollo de nanocápsulas de quercetina, con dos diferentes polímeros (PVA y PCL), mediante el método de Nanoprecipitación. Esto se comprobó con las medidas de diámetro hidrodinámico, las cuales siempre estuvieron en un rango coloidal, oscilando entre 100 y 500 nm. Además, se aseguró la estabilidad del sistema, al encontrar valores de potencial menores a -30 mV para todos los casos, durante más de 3 días, impidiendo así la agregación de las nanopartículas. Adicionalmente, se encontró que todos los sistemas son capaces de encapsular el fármaco quercetina, con eficiencias iniciales de aproximadamente 98%.

Los tamaños de los nanosistemas de PCL dependen tanto de la concentración utilizada del mismo, como de su número molecular, encontrando diámetros hidrodinámicos más grandes a mayores proporciones y pesos moleculares. Estos D_H son mayores que los de PVA, polímero que presenta tamaños que no están en función de la concentración, ni del peso molecular, sino de la solubilidad en el medio acuoso.

Se encontró que la dispersidad de los tamaños en los nanosistemas de PCL, dependen de la concentración, más no del peso molecular. Para el caso del PVA, la dispersidad no puede ser controlada, pues es un factor intrínseco a la polidispersidad propia del polímero.

Adicionalmente, se explicó el valor de potencial zeta negativo para todos los nanosistemas, en función de la hidrólisis del triglicérido componente del aceite, la hidrólisis del polímero PCL (para su respectivo caso), y la ruta sintética del estabilizante Poloxámero 188. Se pudo analizar que las concentraciones bajas de polímero, generan potenciales zeta más negativos que las proporciones altas.

Por último, los polímeros de alto peso molecular, tienen mayores patrones de liberación que los de bajo peso, los cuales encapsulan el fármaco por más tiempo.

2.7 RECOMENDACIONES

En primera medida, se recomienda llevar a cabo ensayos de permeabilidad de las nanocápsulas en matrices no biológicas, ya sea con celdas de Franz o con otro tipo de instrumentación especializada. Esto con el fin de complementar los estudios y encontrar las nanocápsulas con mejores propiedades.

Basándose en que el objetivo primordial del estudio era generar unas nanocápsulas con la capacidad de mejorar la permeabilidad de la quercetina, se recomienda utilizar polímeros de alto peso molecular para los ensayos biológicos. Esto debido a que, al igual que los otros sistemas, presentan tamaños en la escala nanométrica, y potenciales zeta muy negativos que demuestran estabilidad. Sin embargo, con un peso molecular elevado se encontraron mejores patrones de liberación.

Se recomienda hacer estudios de microscopia electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés, Scanning Electron Microscope), o de microscopia de transmisión electrónica (TEM por sus siglas en inglés, Transmission Electron Microscopy), para comprobar la morfología esférica de las nanocápsulas.

Por último, para complementar los estudios fisicoquímicos, se pueden hacer nanocápsulas con todos los componentes de la formulación, exceptuando el fármaco. Así se puede observar si hay o no patrones en el tamaño y el potencial zeta de los sistemas, que se deban a la presencia de la quercetina en la superficie o en el interior de los mismos. Esto sería un inicio para la caracterización del tipo de interacción fármaco-nanocápsula.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Afanas'ev, I. B., Dcrozsko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. a., & Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38(11), 1763–1769. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90410-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90410-3)
- Ato, Ä. L. V. I. L. A. (1996). Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems , Nanoparticles , Nanocapsules , and Nanoemulsions , as Ocular Drug Carriers, 85(5).
- Bei, W., Peng, W., Zang, L., Xie, Z., Hu, D., & Xu, A. (2007). Neuroprotective effects of a standardized extract of Diospyros kaki leaves on MCAO transient focal cerebral ischemic rats and cultured neurons injured by glutamate or hypoxia. *Planta Medica*, 73(7), 636–643. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981532>
- Bei, W., Zang, L., Guo, J., Peng, W., Xu, A., Good, D. a., ... Li, C. (2009). Neuroprotective effects of a standardized flavonoid extract from Diospyros kaki leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(1), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.07.034>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2011). *Bioquímica* (6th ed.). Barcelona, España.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Boehm, a L., Martinon, I., Zerrouk, R., Rump, E., & Fessi, H. (2003). Nanoprecipitation technique for the encapsulation of agrochemical active ingredients. *Journal of Microencapsulation*, 20(4), 433–441. <https://doi.org/10.1080/0265204021000058410>
- Dukhin, a S., & Parlia, S. (2014). Measuring zeta potential of protein nano-particles using electroacoustics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.048>
- Escobar, M. I., & Pimienta, H. J. (2006). *Sistema Nervioso* (2nd ed.). Cali, Colombia.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>
- Hassanzadeh, S., Feng, Z., Pettersson, T., & Hakkarainen, M. (2015). A proof-of-concept for folate-conjugated and quercetin-anchored pluronic mixed micelles

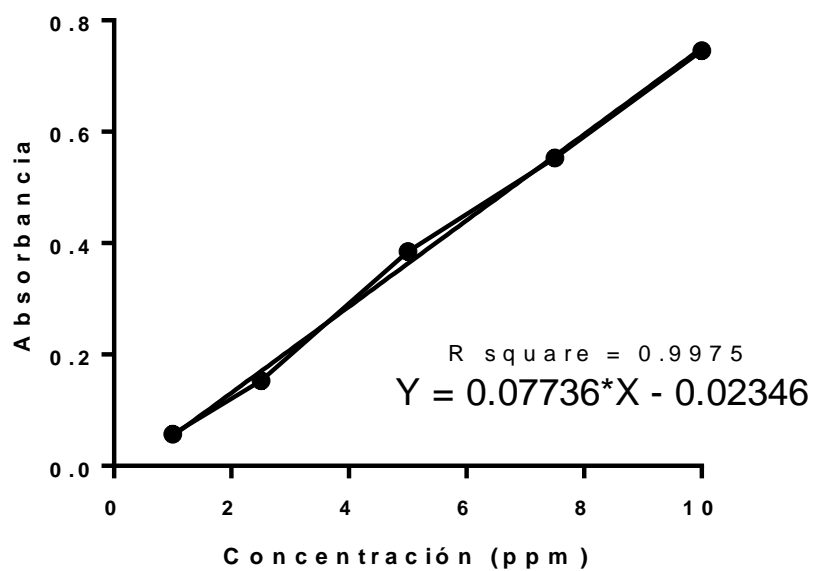
- as molecularly modulated polymeric carriers for doxorubicin. *Polymer (United Kingdom)*, 74, 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.08.005>
- Helvenston, E. P., & Stewart, D. A. (1970). United States Patent 0 ", 3–4.
- Hensley, K., Carney, J. M., Mattson, M. P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J. F., ... Butterfield, D. a. (1994). A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(April), 3270–3274. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3270>
- Lemańska, K., van der Woude, H., Szymusiak, H., Boersma, M. G., Gliszczyńska-Swigoł, A., Rietjens, I. M. C. M., & Tyrakowska, B. (2004). The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin--a mechanistic insight. *Free Radical Research*, 38(792024350), 639–647. <https://doi.org/10.1080/10715760410001694062>
- Mcmanamey, W. J., Davies, J. T., & Coe, J. R. (1973). The influence of molecular diffusion on mass transfer between turbulent liquids, 28, 1061–1069.
- Moffat, A. C. (1968). The influence of alkyl substitution in acids on their performance in the buccal absorption test, 239–247.
- Moinard-Chécot, D., Chevalier, Y., Briançon, S., Beney, L., & Fessi, H. (2008). Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science*, 317(2), 458–468. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.09.081>
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, a. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1–2), 113–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
- Mosqueira, V. C. F., Legrand, P., Gulik, A., Bourdon, O., Gref, R., Labarre, D., & Barratt, G. (2001). Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, 22(22), 2967–2979. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00043-6)
- Piskula, M. K., & Terao, J. (1998). Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4313–4317. <https://doi.org/10.1021/jf980117v>
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2004). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 329–344.
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1998). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(12), 1113–1128. <https://doi.org/10.3109/03639049809108571>
- Raffin Pohlmann, A., Weiss, V., Mertins, O., Pesce da Silveira, N., & Stanisçuaski Guterres, S. (2002). Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules

- and nanospheres: Development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(4–5), 305–312. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00127-6](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00127-6)
- Rang, H., Dale, M., Ritter, M., Flower, R., & Henderson, G. . (2012). *Hyde, M. Rang and Dale's Pharmacology. Rang and Dale's Pharmacology.* <https://doi.org/0443069115>
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>
- Romero-Cano, M. ., & Vincent, B. (2002). Controlled release of 4-nitroanisole from poly(lactic acid) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 82, 127–135. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00130-X)
- Yan, S. D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, a, ... Schmidt, a M. (1996). RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/382685a0>

4. ANEXOS

Absorbancia	Concentración (ppm)
0,057	1
0,153	2,5
0,385	5
0,553	7,5
0,746	10

Curva de Calibración de Quercetina



Anexo 1. Datos para la curva de calibración de Quercetina.

Sistema	Polímero	Mw o Mn (Da)	Concentración (%)	pH día 0	pH día 1	pH día 2	pH día 3
1	PCL	10000	0,2	7,08	6,4	6,1	5,9
2	PCL	10000	0,5	6,08	6,11	6,2	5,96
3	PCL	45000	0,2	6,3	6,19	6,2	6,23
4	PCL	45000	0,5	6,1	6,18	6,37	6,24
5	PCL	80000	0,2	6,43	6,38	5,9	5,89
6	PCL	80000	0,5	6,15	6,39	6,51	6,46
7	PVA	31000 - 50000	0,2	6,94	6,5	5,99	5,88
8	PVA	31000 - 50000	0,5	7,54	7,01	6,71	7,2
9	PVA	85000 - 124000	0,2	6,8	6,3	5,92	5,7
10	PVA	85000 - 124000	0,5	6,63	6,61	6,62	6,83
11	PVA	146000 - 186000	0,2	6,83	5,91	5,9	5,5
12	PVA	146000 - 186000	0,5	6,64	6,52	6,47	6,75

Anexo 2. Datos de pH para los nanosistemas desarrollados.