

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ÓPTIMOS PARA EL ENCAPSULADO DE FITOFÁRMACOS POR LOS MÉTODOS DE SONICACIÓN Y ANTISOLVENTE

Ramos Linares, C. Mariel¹, Cepeda Garza, Jesús A.³, Enríquez Medrano, Francisco J.², Martínez Mora, Eder.¹, Fabela - Sánchez Omar^{4,2}

1. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila; 2. Depto. Química Macromolecular y Nanomateriales, 3 Laboratorio Central de Instrumentación Analítica y 4 Investigador por México CONAHCyT, Centro de Investigación en Química Aplicada.

Resumen: La capacidad terapéutica de fármacos y fitofármacos se ve limitada por la biodisponibilidad de estos debido a sus propiedades fisicoquímicas intrínsecas. Una alternativa para solventar estas barreras biológicas ha sido mediante el encapsulamiento de estos y así proporcionar vías alternas para su posterior aprovechamiento biológico. Existe una gran variedad de métodos para tal fin, como en este caso la microemulsión por ultrasonido y el método de anti-solvente. En este trabajo se estudiaron las condiciones de encapsulamiento de resveratrol (RSV) y curcumina (CUR) utilizando al alcohol polivinílico (PVA) como agente de emulsificación y encapsulado. Mediante un diseño estadístico de experimentos (DoE) por metodología de superficie de respuesta (SRM), se analizó la influencia de la concentración de ambos fitofármacos (mg/mL), así como el porcentaje de potencia (Pot. %) del ultrasonido como factores responsables del tamaño de partículas (nm) y potencial zeta ($p\zeta$) obtenidos posteriormente a la microencapsulación de estos. Los sistemas obtenidos fueron caracterizados fisicoquímicamente mediante SEM, H^1 -NMR, DLS y $p\zeta$, con los datos obtenidos se encontró que las condiciones óptimas de encapsulado para este estudio corresponden a una concentración de 70 y 63 mg/mL de RSV y CUR respectivamente. Aplicando una potencia al 72 % se obtuvieron partículas con un $D_p = 1,074$ nm y un $p\zeta = -61.3$ mV.

Introducción

Los compuestos polifenólicos, como el resveratrol (RSV) y la curcumina (CUR), destacan por su origen natural y su actividad antioxidante, la cual está estrechamente relacionada con su capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos y proteínas, mediante la neutralización de especies reactivas de oxígeno. Estas especies están involucradas en la fisiopatología del envejecimiento y en numerosas enfermedades relacionadas con el estilo de vida¹.

Tanto el RSV como la CUR son considerados moléculas bioactivas o fitofármacos de gran interés para el tratamiento de diversas afecciones incluyendo trastornos neurodegenerativos (TND) como el Alzheimer, Parkinson y lesión de médula espinal²⁻⁵. Además, poseen potencial terapéutico contra el cáncer y de diversas enfermedades cardiovasculares^{6,7}. Sin embargo, su aplicación clínica se encuentra limitada debido a factores como la baja

absorción y el transporte ineficiente a nivel biológico.

Una estrategia eficaz para proteger los compuestos bioactivos de condiciones ambientales adversas consiste en el encapsulamiento de estos, con el objetivo de incrementar su vida media en sistemas *in vivo* e *in vitro* y, por ende, mejorar su biodisponibilidad⁸.

El método de anti-solvente funciona gracias a que el RSV y la CUR son solubles en un disolvente poco polar miscible en agua como lo es la acetona. Esta solución se adiciona a una solución acuosa que contenga un agente estabilizador y con la ayuda de agitación magnética la emulsión se formará instantáneamente por rápida difusión del disolvente. Para ayudar a disminuir el tamaño de partícula, la emulsión se expone a una fuente de alta energía como dispositivos ultrasónicos. Después de eliminar el solvente

utilizado se esperaría obtener la formación de una fina dispersión acuosa de nanoesferas⁹.

En este contexto, mediante la combinación de los métodos de sonicación y anti-solvente, es posible realizar la microemulsión de fitofármacos, aprovechando las características como agente emulsionante que algunos polímeros poseen. Tal es el caso del alcohol polivinílico (PVA), el cual, es soluble en agua y esta reportado su uso como agente de encapsulamiento¹⁰. Por otro lado, debido a sus características fisicoquímicas tanto del RSV como de la CUR, es posible disolverlos en solventes poco polares, permitiendo realizar una emulsión tipo aceite en agua y con ello el encapsulado de esos fitofármacos.

Hasta el momento, no se ha encontrado en la literatura la encapsulación simultánea de RSV y CUR para la obtención de un sistema de liberación prolongada que pudiera ser empleado para el tratamiento de TND. La innovación del presente trabajo se enfocó, en una primera etapa, en el desarrollo, caracterización y optimización del encapsulamiento de RSV y CUR en PVA mediante un diseño estadístico de experimentos (DoE) por metodología de superficie de respuesta (SRM) con lo cual fue posible encontrar condiciones en las que se obtuvieron partícula con el menor tamaño posible y un potencial zeta que le diera estabilidad a la emulsión obtenida.

Desarrollo experimental

Materiales. Alcohol polivinílico (PVA, J.T.Baker™), resveratrol (RES, Alfadelta S.A. de C.V.); curcumina (CUR), dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d6) y acetona (Sigma-Aldrich). Agua desionizada.

Diseño experimental (DoE). La Tabla 1 muestra el diseño obtenido mediante el software DESIGN EXPERT versión 13. Se seleccionó un diseño central compuesto tomando por factores experimentales la concentración de RSV y CUR (mg/mL), así como el porcentaje de potencia del sonicador. Se consideraron como variables de respuesta el tamaño (Dp, nm) y potencial zeta (pζ, mV) de las partículas obtenidas. El análisis

estadístico y optimización se realizó en el mismo software.

Tabla 1. Condiciones experimentales

RSV	CUR	Pot.	Dp (nm)	pζ (mV)
X ₁	X ₂	X ₃	Dp ₁	ζ ₁
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
X ₁₋₁₇	X ₂₋₁₇	X ₃₋₁₇	Dp ₁₇	ζ ₁₇
X ₁ y X ₂ = 34.7 – 75.3 mg/mL; X ₃ = 56 – 84 %				

Microemulsión. Siguiendo las condiciones establecidas en la Tabla 1, se disolvieron RSV y/o CUR en acetona las cuales se añadieron por goteo a una velocidad constante a una solución de PVA al 1.5 % (p/p). Al mismo tiempo se aplicó al sistema mediante la punta de un homogeneizador ultrasónico (CGOLDENWALL) la potencia requerida para cada experimento de acuerdo con el DoE (Fig. 1a). Finalizada la adición, se dejó evaporar la acetona remanente mediante agitación magnética a temperatura ambiente y protección de la luz. Pasadas unas horas la emulsión fue refrigerada hasta su posterior análisis.

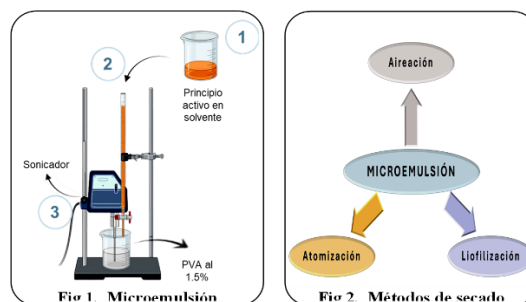


Fig. 1. Diagrama de la metodología seguida para el (a) encapsulado y (b) secado de las muestras producto de la micro emulsión.

Difracción de luz dinámica (DLS). El tamaño de partícula (Dp, nm), se obtuvo diluyendo 10 gotas de emulsión en 1 mL de agua desionizada para realizar la determinación en un Nanotracc Wave II Q (Microtracc). Se realizaron tres lecturas por muestra para determinar el tamaño promedio por corrida experimental.

Potencial zeta (pζ). Se diluyeron 5 mL de emulsión en 10 mL de agua desionizada, esto se vertió en una celda de PTF del equipo ZETA-check (Microtracc). La determinación se

realizó por triplicado usando un pistón de 200 micras.

¹H - NMR. En DMSO-d₆ se disolvieron 10 mg de RSV, CUR, PVA o microcápsulas el análisis se realizó en un equipo Avance III HD (Bruker) a 400 MHz y 16 escaneos por muestra. Los espectros obtenidos fueron analizados mediante el software MestReNova versión 14.

Preparación y visualización de experimento optimizado

SEM. Para determinar la morfología obtenida, se llevó a cabo el secado de una parte de las emulsiones utilizando alguno de los siguientes tres métodos (Fig. 1b).

Aireación. Sobre un porta muestras para SEM se colocaron unas gotas de las emulsiones y se dejaron secar a temperatura ambiente protegidas de la luz.

Liofilización. Muestras previamente congeladas fueron liofilizadas en un equipo Labconco por 48 horas y después montadas en un porta muestras con cinta de carbón para SEM.

Aspersión. En equipo mini spray dryer B-290 (BÜCHI) fue secado por atomización un volumen de 70 mL de emulsión bajo las siguientes condiciones de operación: flujo de entrada 130 °C, flujo de salida 66 °C,

velocidad de aspirado al 92% y de bombeo al 14%. El polvo resultante fue montado en un porta muestras con cinta de carbón.

SEM. Las muestras montadas en cilindros de aluminio fueron recubiertas con oro - paladio y posteriormente visualizadas a 15 KV a diferentes ampliaciones mediante un microscopio electrónico de barrido marca TOCO.

Resultados y discusión

En el espectro de la Fig. 2a, pueden observarse una multiplicidad de señales en los desplazamientos de 3.5 a 5 ppm los cuales se encuentra asociadas a los hidrógenos del OH, H1 y H2 presentes en el PVA. Por otro lado, también se analizaron en los espectros de las Figs. 2 b y 2c, las señales que comparten el RSV y CUR en la región de 9.5 a 9.8 ppm, estas señales suelen asociarse a enlaces tipo hidroxilo en donde, OH - A y OH - B corresponde al RSV, mientras que OH es de la CUR. Así mismo, ambos principios activos comparten señales en el desplazamiento de 6.5 a 7.0 ppm asociadas a los H de aromáticos y unidos a enlaces dobles, siendo H-B, H-3 para CUR y H-B, H-2, H-1 para RSV. El espectro de la Fig. 2d, permitió el análisis del sistema particulado mediante secado por aspersión en donde se pueden encontrar las señales correspondientes a todos los componentes del sistema experimental optimizado.

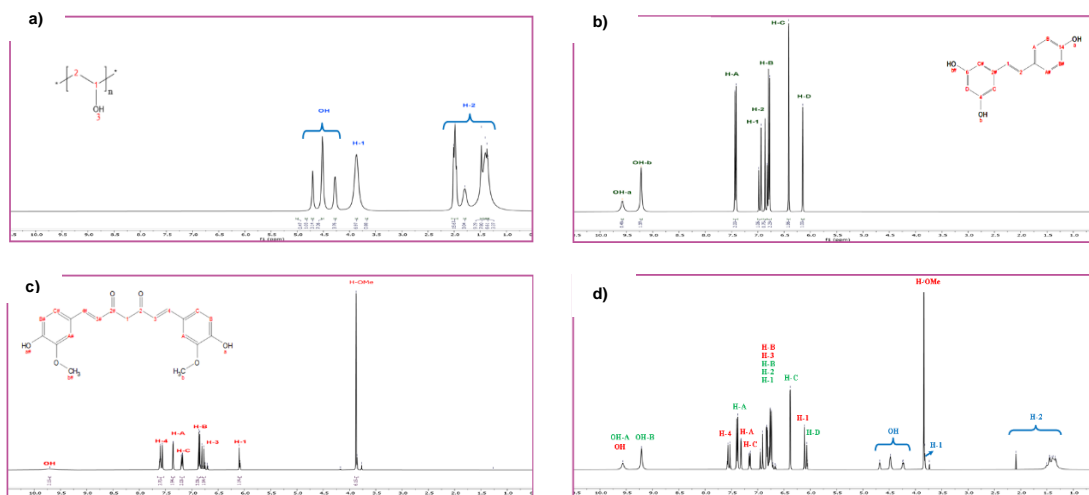


Fig. 2. Espectros por ¹H - NMR correspondientes: a) PVA, b) resveratrol, c) curcumina y d) encapsulado.

Los datos de D_p y $p\zeta$ obtenidos para cada condición experimental fueron analizados mediante DESIGN EXPERT, esta herramienta permitió realizar el ajuste correspondiente de los mismos, obteniendo para el factor tamaño de partícula una superficie con ajuste a un modelo lineal (Fig.3a). Mientras que para el factor potencial zeta, se obtuvo una superficie parabólica resultado del ajuste de los datos modelo cuadrático (Fig. 3b).

Los coeficientes asociados a cada modelo se encuentran en la Tabla 2. Estos permitieron establecer que las condiciones óptimas de encapsulado para este estudio correspondieron a una potencia ultrasónica del 72 %, concentración de 70 y 63 mg/mL de RSV y CUR respectivamente. Estas condiciones pronosticaban un $D_p = 583$ nm y un $p\zeta = -72.7$ mV, sin embargo, los valores experimentales obtenidos fueron $D_p = 1074$ nm y $p\zeta = -61.3$ mV. Esta variación es atribuible a que los modelos presentaron un ajuste cuadrático poco eficiente.

Una razón atribuible a la falta de ajuste es debido a la morfología obtenida en el proceso de encapsulación. Como pudo observarse mediante el estudio SEM (Fig. 4), se

obtuvieron morfologías tanto de lajas, bastones y esferas en el sistema optimizado, de acuerdo con la literatura las morfologías tipo laja y esferas corresponden al RSV¹¹, mientras que las de tipo bastón o varilla se asocian a la CUR¹². Esta variedad en cambios morfológicos debió afectar principalmente las determinaciones de D_p , ya que en un análisis posterior de los fitofármacos por separado bajo las mismas condiciones experimentales optimizadas se obtuvieron D_p con baja dispersión (datos no mostrados), este hecho nos permitió atribuir el bajo ajuste estadístico a la diversidad morfológica.

Por otro lado, a pesar de la diversidad morfológica, los sistemas se mantuvieron sin cambios de fase aparentemente significativos por más de 5 meses en contraste a los sistemas carentes de RSV que se separaron en dos fases en un lapso menor a 24 horas posteriores a la emulsión, lo cual puede asociarse a que los valores obtenidos para $p\zeta$, siendo este un indicador de la estabilidad de una dispersión o emulsión, son numéricamente mayores a 30. Este valor es considerado como el $p\zeta$ límite por la literatura como valor de estabilidad independiente al signo asociado al potencial obtenido.

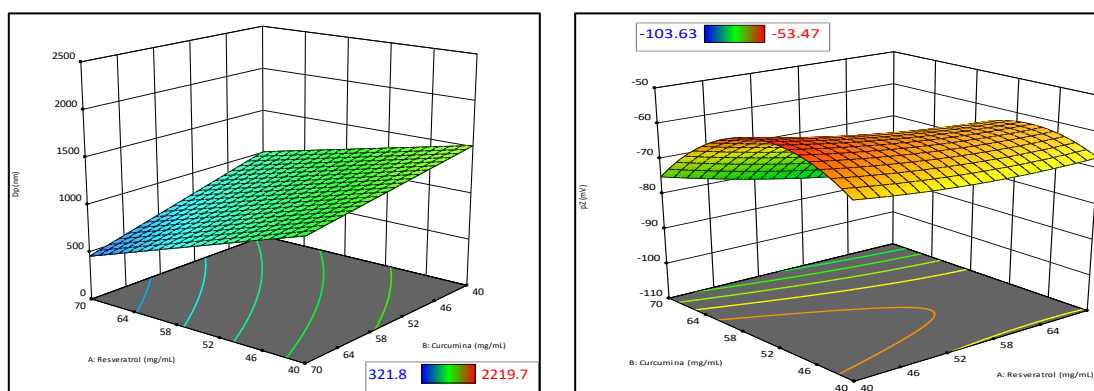


Fig. 3. Superficie de respuesta de (a) tamaño de partícula y (b) potencial ζ

Tabla 2. Coeficientes del modelo experimental											
# valor — $p < 0.05$											
	Int.	RSV	CUR	POT	RSV*CUR	RSV*POT	CUR*POT	(RSV) ²	(CUR) ²	(POT) ²	R ²
D_p	1074.0	-320.2 [#]	-214.3 [#]	189.7 [#]	-66.9	-301.2 [#]	35.3				0.82
$p\zeta$	-61.3	-3.8 [#]	-7.8 [#]	9.4 [#]	-2.3	-8.1 [#]	5.4 [#]	1.4	-12.8 [#]	-6.3	0.86

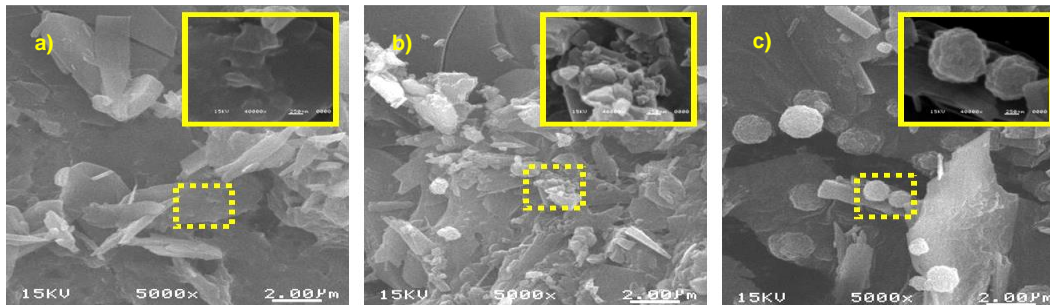


Fig. 4. Micrografías SEM de partículas secas. (a) Aire, b) liofilización y c) aspersión. Las magnificaciones corresponden a 5,000 y 40,000x respectivamente

Conclusiones.

Los fitofármacos son principios activos de gran interés por su múltiples beneficios en la atención de diversos problemas de salud pública. Sin embargo, muchos de ellos presentan el inconveniente de su biodisponibilidad. Aquí se reporta el estudio de la encapsulación de RSV y CUR en PVA mediante la combinación de los métodos de ultrasonido y anti-solvente.

De acuerdo con el estudio realizado al aplicar la metodología de superficie de respuesta se obtuvieron parámetros de optimización para el encapsulado de RSV y CUR en PVA, condiciones que fueron valoradas experimentalmente para verificar el ajuste a los modelos obtenidos. Los valores experimentales variaron considerablemente entre los resultados obtenidos respecto a los esperados. De esta forma, en el caso del Dp se obtuvieron tamaños aproximadamente del doble al esperado. Como se mencionó previamente, esto es atribuible a las distintas morfologías obtenidas en el sistema, lo cual resultó una determinación del Dp imprecisas mediante DLS, por tanto, un análisis morfológico mediante imágenes SEM pudiera brindar un mejor acercamiento a los tamaños y morfologías presentes en el sistema.

Por otro lado, la diferencia del $p\zeta$ experimental respecto al esperado bajo condiciones óptimas de encapsulado fue menor al 14%. Sin embargo, el valor de $p\zeta$ obtenido permitió mantener el sistema estable en el tiempo, por lo que puede considerarse que esta variación no es significativa para el sistema optimizado.

Los resultados obtenidos establecen que el estudio debe redireccionar su atención a la búsqueda de mejoras del proceso de encapsulado enfocados en la morfología, lo cual puede ser modificado con polímeros diferentes o mezclas.

Agradecimientos.

Agradecemos al CIQA por la beca de tesis de licenciatura y facilidades otorgadas para el desarrollo del presente trabajo.

A las Lic. Judith Caballero y Maricela García, por su apoyo técnicos en la obtención de datos por $^1\text{H-NMR}$.

A Ing. Beatriz Reyes por su apoyo técnico con los equipos Microtrac.

Al Dr. Carlos Espinoza y M.C. Layza Arizmendi por su apoyo técnico en la obtención de muestras por atomización.

Al Dr. René Peralta y Dra. Esther Treviño, por facilitar curcumina para este estudio.

Referencias.

- (1) Li, D.-D.; Han, R.-M.; Liang, R.; Chen, C.-H.; Lai, W.; Zhang, J.-P.; Skibsted, L. H. Hydroxyl Radical Reaction with *Trans*-Resveratrol: Initial Carbon Radical Adduct Formation Followed by Rearrangement to Phenoxy Radical. *J Phys Chem B* **2012**, *116* (24), 7154–7161. <https://doi.org/10.1021/jp3033337>.

- (2) Bandiwadekar, A.; Jose, J.; Khayatkashani, M.; Habtemariam, S.; Solomon, S.; Hamid, S.; Kashani, R. K.; Seyed, S.; Nabavi, M.; Habtemariam, S.; Reza, H.; Kashani, K.; Nabavi, S. M. Emerging Novel Approaches for the Enhanced Delivery of Natural Products for the Management of Neurodegenerative Diseases. *Journal of Molecular Neuroscience* **2021**, *72*:3 **2021**, *72* (3), 653–676. <https://doi.org/10.1007/S12031-021-01922-7>.
- (3) San-Juan Orta, D.; Rodríguez Zubia, E.; Janeth Gómez González, G.; Vázquez Gregorio, R.; Miguel Tabera Tarello, P.; Fleury, A.; Suárez, V.; Neurológico ABC, C.; Médico ABC, C.; Velasco Suárez, M. Neurocisticercosis y Epilepsia. *Anales Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico ABC* **2014**, *59* (3), 212–218.
- (4) Lu, X.; Ji, C.; Xu, H.; Li, X.; Ding, H.; Ye, M.; Zhu, Z.; Ding, D.; Jiang, X.; Ding, X.; Guo, X. Resveratrol-Loaded Polymeric Micelles Protect Cells from A β -Induced Oxidative Stress. *Int J Pharm* **2009**, *375* (1–2), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.03.021>.
- (5) Razavi, S. M.; Khayatan, D.; Najafi Arab, Z.; Hosseini, Y.; Khanahmadi, M.; Momtaz, S.; Jamialahmadi, T.; Johnston, T. P.; Abdolghaffari, A. H.; Sahebkar, A. Protective Effects of Curcumin against Spinal Cord Injury. *JOR Spine* **2024**, *7* (3). <https://doi.org/10.1002/jsp2.1364>.
- (6) Davatgaran-Taghipour, Y.; Masoomzadeh, S.; Farzaei, M. H.; Bahramsoltani, R.; Karimi-Soureh, Z.; Rahimi, R.; Abdollahi, M. Polyphenol Nanoformulations for Cancer Therapy: Experimental Evidence and Clinical Perspective. *Int J Nanomedicine* **2017**, *Volume 12*, 2689–2702. <https://doi.org/10.2147/IJN.S131973>.
- (7) Zahran, R. F.; Geba, Z. M.; Tabll, A. A.; Mashaly, M. M. Therapeutic Potential of a Novel Combination of Curcumin with Sulfamethoxazole against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Swiss Albino Mice. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **2020**, *18* (1), 13. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00027-9>.
- (8) Chen, X.; Zou, L.-Q.; Niu, J.; Liu, W.; Peng, S.-F.; Liu, C.-M. The Stability, Sustained Release and Cellular Antioxidant Activity of Curcumin Nanoliposomes. *Molecules* **2015**, *20* (8), 14293–14311. <https://doi.org/10.3390/molecules200814293>.
- (9) Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Dev Ind Pharm* **1998**, *24* (12), 1113–1128. <https://doi.org/10.3109/03639049809108571>.
- (10) Cortés, H.; Hernández-Parra, H.; Bernal-Chávez, S. A.; Prado-Audelo, M. L. Del; Caballero-Florán, I. H.; Borbolla-Jiménez, F. V.; González-Torres, M.; Magaña, J. J.; Leyva-Gómez, G. Non-Ionic Surfactants for Stabilization of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Uses. *Materials* **2021**, *14* (12), 3197. <https://doi.org/10.3390/ma14123197>.
- (11) Liu, T.; Müller, R. H.; Möschwitzer, J. P. Consideration of the Solid State for Resveratrol Nanocrystal Production. *Powder Technol* **2018**, *332*, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.03.028>.
- (12) Paradkar, A.; Ambike, A. A.; Jadhav, B. K.; Mahadik, K. R. Characterization of Curcumin–PVP Solid Dispersion Obtained by Spray Drying. *Int J Pharm* **2004**, *271* (1–2), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.11.014>.