

# Nanopartículas poliméricas no biodegradables cargadas con CoQ10 para su potencial administración oral

Alfonso Guerrero Barboza <sup>a\*</sup>, Rocío Alvarez Román <sup>b</sup>, J. Deniss Perales Flores <sup>a</sup>, Norma C. Barajas Aguilar <sup>c</sup>, Eduardo Ramírez González <sup>c</sup>, Sergio A. Galindo Rodríguez <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Pedro de Alba s/n, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, UANL, Madero y Dr. Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro sin número Monterrey, Nuevo León, México.

<sup>c</sup> Nanoingredientes Bioactivos S.A. de C.V., Saltillo, Coahuila.

\*e-mail: [alfonso\\_guerrero\\_2@hotmail.com](mailto:alfonso_guerrero_2@hotmail.com)

## Resumen

Se prepararon nanopartículas a base de un polímero derivado de ácido metacrílico por el método de nanoprecipitación con y sin tensoactivo e incorporando diferentes cantidades de CoQ10. Se les midió el tamaño, PDI y potencial Z. También se obtuvo el porcentaje y la eficiencia de encapsulación. Todas las formulaciones generaron nanopartículas con diámetros menores a 200 nm y valores de PDI menores de 0.2, indicando así que las poblaciones de nanopartículas eran homogéneas y monodispersas. Se aprecia un incremento de tamaño en las partículas conforme se aumenta la cantidad de CoQ10. El potencial Z fue más negativo en las nanopartículas libres de tensoactivo. El porcentaje de encapsulación se incrementó a medida que se incrementaba la cantidad de CoQ10, por su parte la eficiencia aumentó hasta alcanzar un valor máximo a partir del cual fue disminuyendo.

**Palabras clave:** Nanopartículas Poliméricas, CoQ10, Encapsulación.

## Abstract

Nanoparticles were prepared from methacrylic acid based polymer by nanoprecipitation, using different amounts of CoQ10 and developing formulation both with and without surfactant. The size, PDI and Z potential of the particles were measured and the encapsulation percentage as well as the encapsulation efficiency was obtained. The size of the particles increased when increasing the amount of CoQ10. The Z potential was more negative in the surfactant free particles. The encapsulation percentage increased when increasing the amount of CoQ10. On the other hand, the encapsulation efficiency increased until reaching a maximum value after which it started decreasing.

**Key Words:** Polymeric Nanoparticles, CoQ10, Encapsulation.

## 1. Introducción

La Coenzima Q10 (CoQ10) fue descubierta en 1957 por Frederick L. Crane mientras estudiaba los componentes de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias. En un principio, debido a la pigmentación amarilla de la sustancia aislada, se pensó que podía tratarse de carotenoides. Posteriormente, se descubrió que se trataba de una quinona con un pico máximo de absorción en el espectro ultravioleta a 275 nm [1].

Estructuralmente, además del grupo quinona, la Co Q10 contiene 10 unidades isopreno, de lo cual deriva su nombre. Esta molécula se ha encontrado tanto en tejidos vegetales de plantas superiores, como en tejidos animales [2]. Debido a su ubicuidad en la naturaleza también se le denomina Ubiquinona. La CoQ10 no solo es crucial para las reacciones óxido-reducción de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, además tiene capacidad antioxidante y ha demostrado inhibir la peroxidación de ácidos grasos. Este efecto protector de lípidos toma relevancia debido a su estrecha relación con las membranas dada su elevada hidrofobicidad [3].

Aunque la CoQ10 puede ser sintetizada *in vivo*, pueden darse situaciones en que la capacidad del cuerpo para producirla sea insuficiente. La susceptibilidad frente a

un déficit de CoQ10 parece acentuarse en células con un metabolismo activo [4]. Particularmente, se ha observado que la cantidad de CoQ10 presente en los diversos tejidos disminuye con la edad de forma general después de los 20 años. Esto se aprecia fundamentalmente en tejidos como corazón, hígado y riñón [5].

No obstante los beneficios que aporta la CoQ10 a la salud, su administración exógena presenta limitaciones; dada su elevada hidrofobicidad, se dificulta la absorción del activo; además presenta cierta labilidad frente a la luz y temperaturas moderadamente altas. Diversos intentos se han realizado con la intención de aumentar la biodisponibilidad y disminuir la labilidad de la CoQ10. Un estudio realizado por Cuomo y Rabovsky destaca que las formulaciones de CoQ10 solubilizada, administradas en capsulas de gelatina suave y gelatina dura mostraron una mayor biodisponibilidad que las formulaciones en polvo administradas como comprimidos [6].

También se han hecho intentos de formular la CoQ10 en liposomas para su administración oral. Xia S. y colaboradores estudiaron la absorción y comportamiento de liposomas con CoQ10 en monocapas de células Caco-2 como modelo de epitelio

intestinal. Comparando formulaciones nanoliposomales y formulaciones no particuladas, se determinó la cantidad de CoQ10 que atraviesa la monocapa de células (permeabilidad) y la cantidad que queda atrapada dentro de ellas (acumulación). Dentro de este estudio la permeabilidad de la CoQ10 aumentó en las formulaciones nanoliposomales mientras que disminuyó su acumulación. Sin embargo, en todas las formulaciones se encontró que la CoQ10 que logró acumularse consistía en una mezcla de las formas oxidada y reducida a pesar de que ésta se administró como Ubiquinona (forma oxidada). Lo anterior indica que cuando es incorporada por las células del intestino, ésta sufre una reducción. De las formulaciones ensayadas, aquella que contenía colesterol resultó ser la que logró mayor permeabilidad. Esto debido a que el colesterol hace más rígido al liposoma y le permite atravesar la célula conservando su integridad sin liberar su contenido [7].

Otros sistemas nanoparticulados también han sido estudiados para su aplicación por vía oral, entre los cuales destacan las nanopartículas poliméricas, principalmente, debido a que sus características intrínsecas, tales como su tamaño submicrométrico, su gran área superficial, su carácter multiparticulado y su composición polimérica variable les confieren un singular comportamiento en el tracto digestivo. Además, las nanopartículas poliméricas, han demostrado incrementar la biodisponibilidad de diversas moléculas que presentan una pobre absorción por vía oral, asimismo, son capaces de proteger activos lábiles con mayor eficiencia que otros sistemas y aportan una liberación controlada de las moléculas activas en el medio. Específicamente, se ha encontrado que una de las ventajas de las nanopartículas a base de poliácridatos es su capacidad de adhesión en el intestino con lo que se logra un aumento de la concentración de nanopartículas y, por lo tanto, del fármaco encapsulado en el sitio de absorción [8]. Nanopartículas de PLGA cargadas con CoQ10 han probado tener una capacidad de neutralización de las Especies Reactivas de Oxígeno hasta 10 veces mayor que las formulaciones de CoQ10 libre al ser probadas en cultivos celulares. Estas nanopartículas también incrementaron la biodisponibilidad más de 4 veces en comparación con la CoQ10 administrada en forma libre [9].

En este contexto, en el presente trabajo se estudió la influencia de diferentes variables experimentales sobre la preparación de nanopartículas de polimetacrilatos-CoQ10 preparadas por la técnica de nanoprecipitación a fin de obtener una formulación con características favorables para su posterior administración oral.

## 2. Parte experimental

### Materiales

La CoQ10 fue adquirida en SIGMA (México), el polímero formador de las nanopartículas fue un polimetacrilato, mientras que el agente estabilizante correspondió a un tensoactivo copolimérico de uso

comercial. El resto de los reactivos empleados en el estudio fueron de grado analítico.

### Metodología

#### Preparación de las Nanopartículas

Se utilizó el método de nanoprecipitación para la elaboración de las nanopartículas [10]. La fase acuosa de las formulaciones se preparó disolviendo el agente tensoactivo en agua destilada para generar una solución al 2% (p/p). La fase orgánica se preparó disolviendo por agitación el polímero y cantidades variables de CoQ10 (7, 14, 21 y 28 mg) en acetona.

Posteriormente, la fase acuosa se colocó en agitación en un reactor de fondo redondo y se adicionó la fase orgánica usando un inyector inmerso en la fase acuosa. El lote de nanopartículas se sometió a presión reducida a una temperatura de 28°C hasta eliminar la acetona en un rotavapor (Heidolph, Laborota 4003).

#### Caracterización de las nanopartículas.

Las nanopartículas se caracterizaron en función de su tamaño, índice de polidispersidad, potencial Z, así como en su porcentaje de encapsulación de CoQ10 y eficiencia de encapsulación. Para la medición de tamaño, PDI y potencial Z se utilizó un analizador de partículas ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments).

#### Cuantificación espectrofotométrica de la CoQ10

Se realizó una curva de calibración de la CoQ10 ( $\lambda=275$  nm) usando un espectrofotómetro UV/Visible Genesys 10 UV y se utilizaron niveles de concentración entre 15 y 45 ppm. Para la determinación del contenido de CoQ10 se centrifugaron las dispersiones acuosas de nanopartículas a 25,000 rpm (centrífuga Beckman-Coulter, mod. Allegra). Se recuperó el sedimento y se liofilizó durante 24 horas a -48°C y a una presión de 0.09 mb.

#### Eficiencia y porcentaje de encapsulación de las nanopartículas cargadas con CoQ10

La eficiencia y porcentaje de encapsulación se obtuvieron disolviendo las partículas liofilizadas en etanol y leyendo en el espectrofotómetro a  $\lambda=275$  nm para extrapolar posteriormente con la curva de calibración. Con la finalidad de descartar interferencia de los otros componentes de las nanopartículas (tensoactivo y polímero), los lotes blanco (nanopartículas sin carga de CoQ10) también fueron medidos a 275 nm, dando valores de absorbancia nula. Los cálculos para determinar el porcentaje y eficiencia de encapsulación se detallan a continuación:



$$\% \text{ encapsulación} = \frac{\text{mg de CoQ10 cuantificados en las Nanopartículas}}{\text{mg de Nanopartículas liofilizadas}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{rendimiento máximo} = \frac{\text{mg de CoQ10 en FO.}}{\text{mg de CoQ10 en FO.} + \text{mg de polímero en FO.}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ eficiencia de encapsulación} = \frac{\% \text{ encapsulación}}{\text{rendimiento máximo}} \times 100 \quad (3)$$

### 3. Resultados y discusión

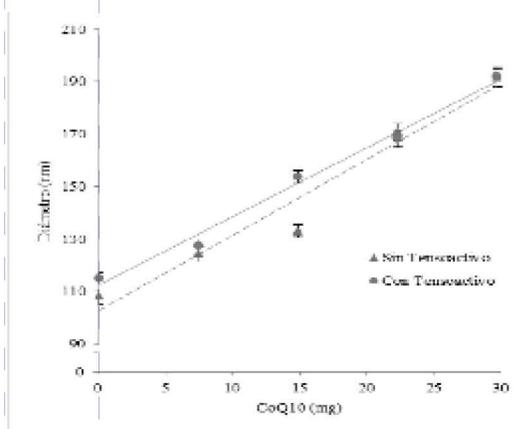
#### Diámetro de nanopartícula

Se observa que la carga de CoQ10 es el principal factor que incide sobre el tamaño de las nanopartículas haciéndolas más grandes a medida que se usa mayor cantidad de activo; en contraste la incorporación de tensoactivo no causa gran efecto sobre esta característica (Fig. 1). Debido a que el polímero cuenta con grupos funcionales ionizables para interactuar con el agua mientras que la CoQ10 no, es de esperarse que un incremento en la cantidad de CoQ10 respecto a la cantidad de polímero genere partículas más grandes.

Tal efecto de la cantidad de activo sobre el diámetro de nanopartícula también se ha observado en otros trabajos, por ejemplo el estudio realizado por Mainardes y Evangelista quienes formularon nanopartículas de PLGA cargadas con prazicantel, en las cuales se mostraba un claro aumento de tamaño al incrementar el contenido de fármaco [11].

Debido a que la CoQ10 es altamente hidrofóbica se espera que en el momento de la inyección ésta se oriente hacia el centro de las diminutas gotas de acetona que se forman en la fase acuosa. Así pues cuando la difusión ha concluido, se forma un centro cristalino de CoQ10 recubierto por polímero. Lo anterior coincide con lo reportado por Ronquillo de Jesús, E. y colaboradores, quienes describen para sus nanopartículas una estructura que consiste en núcleos cristalinos formados por CoQ10 recubiertos por películas de polímero cuando fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido y de

transmisión [12]. Esto implica que una mayor cantidad de CoQ10 formaría un centro de agregación más grande y por lo tanto repercute en una partícula de mayor tamaño.



**Figura 1.** Efecto de la cantidad de CoQ10 sobre el diámetro de nanopartículas de polimetacrilatos preparadas por el método de nanoprecipitación ( $\sigma$ , n=3).

#### Potencial Z

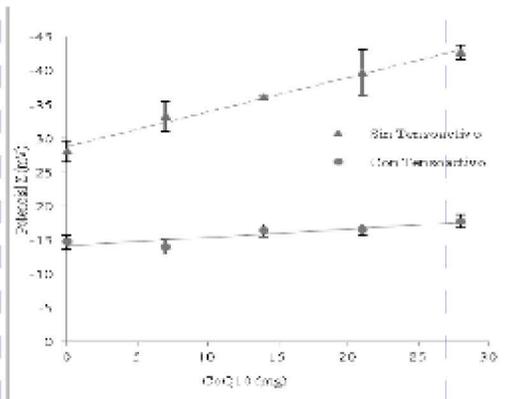
Por otra parte, como se aprecia en la Figura 2, el potencial Z se hace más negativo a medida que se incrementa la cantidad de CoQ10 en las formulaciones, esto puede deberse a que el polímero tiene tanto fracciones hidrofóbicas neutras, como grupos ionizables, así la CoQ10 podría interactuar con las fracciones hidrofóbicas de manera semejante a como lo hace en las membranas de las células, esto probablemente excluye a los grupos ionizables del centro de la partícula y los orienta hacia la periferia, haciendo que la carga de superficie sea más intensa.

También se observa que el potencial Z es menos negativo en las formulaciones con tensoactivo y su variación es menos pronunciada. Esto se debe a que el tensoactivo es un compuesto anfipático neutro, mientras que el polímero es polianiónico y al ser expuesto al entorno acuoso ioniza sus grupos ácidos adquiriendo carga. Estas cargas del polímero que se forman en la superficie de la nanopartícula son entonces las responsables de la carga superficial de la partícula y al ser cubiertas por el tensoactivo la intensidad de la carga se ve disminuida.

#### Porcentaje y eficiencia de encapsulación

El porcentaje de encapsulación de las nanopartículas, así como su eficiencia de encapsulación aumentaron a medida que se incrementó la cantidad de CoQ10 (Tabla I). Este incremento en la eficiencia de encapsulación cuando se usan mayores cantidades de activo se ha

encontrado en otros trabajos que utilizan la técnica de nanoprecipitación, como en el realizado por C.P. Dora y colaboradores, en donde se prepararon nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con Glibenclamida y se lograron más altas eficiencias cuando se implementaba una mayor cantidad de fármaco [13]. Lo mismo se aprecia para las nanopartículas de PLA cargadas con lomustina, en las cuales la eficiencia de encapsulación se incrementó considerablemente al incrementar la concentración del fármaco [14].



**Figura 2.** Efecto de la cantidad de CoQ10 sobre el potencial Z de Nanopartículas de polimetacrilato preparadas por el método de nanoprecipitación (■:  $\sigma$ , n= 3).

**Tabla I.** Efecto de la carga de CoQ10 en fase orgánica y la presencia de tensoactivo sobre la incorporación de Q10 en Nanopartículas poliméricas menores de 200 nm (■:  $\sigma$ , n= 2)

CoQ10 (mg)	Con Tensoactivo		Sin Tensoactivo	
	Encapsulación (%)	Eficiencia de encapsulación (%)	Encapsulación (%)	Eficiencia de encapsulación (%)
7	6.72 ± 0.14	73.96 ± 1.56	6.75 ± 0.03	74.26 ± 0.32
14	14.01 ± 0.41	84.03 ± 2.4	13.09 ± 0.22	78.57 ± 1.33
21	20.75 ± .21	89.92 ± 0.89	13.42 ± 0.53	58.14 ± 2.3
28	18.46 ± 1.4	64.62 ± 4.8	11.35 ± 0.89	49.18 ± 3.8

Por su parte, la oscilación en la eficiencia de encapsulación indica como las nanopartículas limitan su capacidad de carga y dejan de incorporar el activo. El valor máximo de la eficiencia de encapsulación nos muestra este punto de inflexión donde el sistema comienza a saturarse, por lo cual podría decirse que las nanopartículas con tensoactivo comienzan a saturarse con 21 mg de CoQ10 mientras que aquellas que no tienen tensoactivo con 14 mg.

Sin embargo, en nuestro estudio fue evidente que este incremento tiene un valor máximo, a partir del cual los valores de eficiencia decrecen, lo cual indica que la capacidad de encapsulación de las nanopartículas llega a un punto de saturación y debido a esto, aumentos posteriores en la cantidad de CoQ10 en la fase orgánica no son incorporadas en el interior de las nanopartículas. Ahora bien comparando las formulaciones con y sin tensoactivo, se aprecia que los valores más altos tanto en el porcentaje como en la eficiencia de encapsulación se alcanzan cuando se emplea tensoactivo. Esta diferencia en la capacidad de encapsular se acentúa en las formulaciones con mayor carga de CoQ10 y puede deberse a que el tensoactivo se deposita en la interfase acetona-agua, generando una barrera física que evita que la CoQ10 sea arrastrada por la acetona que difunde hacia el medio acuoso.

#### 4. Conclusiones

Fue posible encapsular CoQ10 en nanopartículas poliméricas no biodegradables y se logró determinar como la CoQ10 es capaz de modificar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. La variable que incide de forma más significativa sobre el tamaño de partícula es la cantidad de activo en la fase orgánica, por su parte el potencial Z es afectado tanto por la presencia de tensoactivo así como por la cantidad de CoQ10, mientras que la eficiencia de encapsulación se



ve incrementada cuando se usa tensoactivo y cantidades grandes de CoQ10. Finalmente, se obtuvieron nanopartículas cargadas con CoQ10 con características adecuadas para administración oral: tamaño menor de 200 nm y porcentajes de encapsulación superiores al 6%.

## 5. Agradecimientos

El presente trabajo fue desarrollado a través de una vinculación entre la UANL y la empresa Nanoingredientes Bioactivos S.A. de C.V. por medio del proyecto no.175274 del Fondo Sectorial de Innovación Biotecnológica Productiva C009-2011-3-CONACyT 2011. Patente en trámite. Asimismo, se agradece el apoyo parcial a través del proyecto PAICyT-UANL CS1164-11.

## 6. Referencias

1. Crane FL. Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion*. **2007**, S7, S2-S7.
2. Crane F. Isolation of two quinones with Coenzyme Q activity from Alfalfa. *Plant Physiol*. **1959**, 34(2), 128-131.
3. Ernster L., Forsmark-Andrée P. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin. Invest.* **1993** 71 (8 Suplemento), S60-S65.
4. Gaby A. R. The role of coenzyme Q10 in clinical medicine: Part I. *Altern Med Rev* **1996**;1:11-17.
5. Kalen A, Appelkvist EL, Dallner G. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids*. **1989**; 24(7):579-584.
6. Cuomo J., Rabovsky A. Comparative Bioavailability of Coenzyme Q10 in Four Formulations *USANA Clinical Research Bulletin*, **2000**. USANA Clinical Research Bulletin, USANA Health Sciences, Inc. SLC, UT.
7. Xia S., Xu S., Zhang X., Fang Z., Wang Z. Nanoliposomes mediate coenzyme Q10 transport and accumulation across human intestinal Caco-2 cell monolayer. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57(17) 7989-7996.
8. Des Rieux A., Fievez V. y Garinot M. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*. **2006**, 116 (1), 1-27.
9. Swarnakar N., Jain A., Singh R., Godugu C., Das M., y Jain S. Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q10-loaded polymeric nanoparticles *Biomaterials*. **2011**, 32(28), 6860-6874.
10. Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J. Ph., Ammoury N., Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm.* **1989**, 55 (1), R1-R4.
11. Mainardes RM., Evangelista RC. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *Int J Pharm.* **2005**, 290, 137-144.
12. Ronquillo de Jesús, E., San Martín Martínez E., Guzmán Mendoza J. Obtención de Nanocristales de Coenzima Q10 por el método de desplazamiento de solvente, encapsulados en polímeros de ácido poli-láctico y glicol polietileno *Superficies y vacío*. **2010**, 23 (3) 15-19.
13. Dora C. P., Singh S.K. , Kumar S., Datusalia A.K. y Deep A. Development and characterization of nanoparticles of glibenclamide by solvent displacement method. *Acta Pol Pharm.* **2010**, 67 (3), 283-290.
14. Mehrotra A, Pandit JK. Critical Process Parameters Evaluation of Modified Nanoprecipitation Method on Lomustine Nanoparticles and Cytostatic Activity Study on L132 Human Cancer Cell Line. *J Nanomed Nanotechol* **2012** 3:149. doi:10.4172/2157-7439.1000149