

Obtención de Nanocristales de Coenzima Q10 por el método de desplazamiento de solvente, encapsulados en polímeros de ácido poli-láctico y glicol polietileno

E. Ronquillo de Jesús, E. San Martín Martínez*, J. Guzmán Mendoza

*Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional
Legaria 694. Colonia Irrigación, 11500 México D. F., 57296300*

R. Pedroza Islas

*Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas, Universidad Iberoamericana
Prolongación Paseo de la Reforma 880, CP 01210 México, D.F.*

(Recibido: 01 de octubre de 2009; Aceptado: 13 de agosto de 2010)

En este trabajo se presentan los resultados de la obtención de los nanocristales de Coenzima Q10 (CoQ10), utilizando el método de desplazamiento de solvente. Los nanocristales fueron encapsulados en los polímeros: ácido poli-láctico (PLA) y glicol polietileno (PEG), evaluándose los siguientes parámetros: factor A, PLA:PEG (mg), factor B, CoQ10 (%) y factor C, gelatina (%). Adicionalmente, se determinó la solubilidad de las nanopartículas encapsuladas en fluido gástrico y fluido intestinal simulado, utilizando un diseño experimental completo de superficie de respuesta. La caracterización de nanopartículas de CoQ10 se realizó utilizando las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y difracción de rayos X (DRX).

Palabras clave: Coenzima Q10; Acido poliláctico; Glicol polietileno; Nanopartículas; Nanocristales

This work presents results for Coenzyme Q10 (CoQ10) nanocrystal obtainment using the solvent displacement method. The nanocrystals were encapsulated in polylactic acid (PLA) and polyethylene glycol (PEG) polymers. The following parameters were evaluated: factor A, PLA-PEG (mg), factor B, CoQ10 (%), and factor C, gelatin (%). Additionally, solubility of the encapsulated nanoparticles in simulated gastric fluid and intestinal fluid was determined using a complete surface-response experimental design. The characterization of CoQ10 nanoparticles was performed employing Scanning Electron Microscope (SEM), Transmission Electron Microscope (TEM), and X-ray diffraction (XRD) techniques.

Keywords: Coenzyme Q10; Polylactic acid; Polyethylene glycol; Nanoparticles; Nanocrystals

1. Introducción

La Coenzima Q10 (CoQ10) es un suplemento alimenticio que se utiliza para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y enfermedades crónico-degenerativas como cáncer, Parkinson y diabetes, entre otras [1]. Su consumo también se ha recomendado, no sólo a personas de la tercera edad, sino a aquellas que no la sintetizan en la proporción en que el organismo la requiere para llevar a cabo de manera eficiente todas sus funciones celulares. Entre los factores relacionados con la disminución de la síntesis de CoQ10 en el organismo humano, se encuentran la biosíntesis ineficiente en las células, la edad de las personas, la alimentación inadecuada, el estrés, el medio ambiente y algunos fármacos como las estatinas [1], entre otros.

También es un suplemento apropiado para los atletas de alto rendimiento, para contrarrestar la generación excesiva de radicales libres. Actualmente, la industria de los suplementos alimenticios ofrece una amplia gama de presentaciones y formulaciones con CoQ10, entre las que encontramos: cápsulas a base de aceites esenciales o vegetales, cápsulas de gel hidrofílicas y cápsulas con CoQ10 en polvo o tabletas. No obstante, mejorar la biodisponibilidad, solubilidad y estabilidad de la CoQ10 sigue siendo un reto por su naturaleza lipofílica, su baja

solubilidad en solventes orgánicos [2], su fotosensibilidad y porque puede deteriorarse a temperaturas mayores a los 50°C.

La CoQ10 es una molécula con estructura cristalina, físicamente es un polvo de color anaranjado intenso, sin olor ni sabor. Esta molécula pertenece a la familia de los compuestos órgano-cíclicos (quinonas). Su estructura química general (2,3 dimetoxi-5 metil-6 decaprenil benzoquinona) consta de dos partes (figura 1): una soluble en grasa formada por 10 unidades de isopreno y la otra hidrofílica (grupo funcional benzoquinona) [3]. Otra característica de la CoQ10 es que se puede encontrar en las células en sus tres estados de oxidación.

Por otra parte, las industrias farmacéuticas y de alimentos han empleado por muchos años diversos polímeros como el glicol polietileno (PEG), el ácido poli-láctico (PLA) y el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) por ser biodegradables e inoocuos para los humanos [4].

Estos polímeros han sido utilizados en la síntesis para la elaboración de medicamentos, en sistemas de encapsulación de diversas partículas y en ingeniería de tejidos, entre otros. La incorporación del PEG en las dispersiones provee de segmentos hidrofílicos a la matriz polimérica, incrementando el contenido de agua de las partículas e induciendo la formación del poro, y mejorar tanto la disolución como la difusión de las partículas.

Tabla 1. Determinación de la solubilidad de la CoQ10 embebida en una matriz polimérica.

Estándar	Corrida	Factor APLA/PEG (mg)	Factor BCoQ10 (%)	Factor C Gelatina (%)	FGS Solubilidad (%)	FIS Solubilidad (%)
18	1	50.00	1.00	2.00	93.24	82.57
10	2	100.00	1.00	2.00	99.03	75.22
17	3	50.00	1.00	2.00	94.21	68.75
7	4	20.27	1.30	2.59	93.24	74.53
1	5	20.27	0.70	1.41	95.17	75.21
8	6	79.73	1.30	2.59	98.07	79.89
6	7	79.73	0.70	2.59	93.24	78.55
12	8	50.00	1.50	2.00	100.00	87.99
20	9	50.00	1.00	2.00	100.00	86.69
2	10	79.73	0.70	1.41	97.10	80.17
3	11	20.27	1.30	1.41	99.03	79.59
4	12	79.73	1.30	1.41	96.14	76.26
15	13	50.00	1.00	2.00	97.10	80.17
14	14	50.00	1.00	3.00	97.10	95.75
11	15	50.00	0.50	2.00	96.14	69.27
9	16	0.00	1.00	2.00	94.21	79.62
5	17	20.27	0.70	2.59	92.28	81.48
13	18	50.00	1.00	1.00	91.31	77.81
19	19	50.00	1.00	2.00	95.17	77.96
16	20	50.00	1.00	2.00	92.28	89.42

Además, este polímero es de bajo peso molecular, facilitando su excreción por humanos sin provocar respuesta inmunológica [4, 5].

En este trabajo se propuso la producción y estabilización de nanopartículas de CoQ10 encapsuladas en polímeros biodegradables y la evaluación de su solubilidad en fluido gástrico-intestinal simulado.

2. Desarrollo experimental

2.1. Materiales

Los materiales utilizados en este trabajo de investigación fueron: ácido poli-láctico (PLA), glicol polietileno (PEG), α -tocoferol, gelatina de piel de bovino, acetona grado analítico, pepsina y pancreatina las cuales fueron adquiridos de Sigma Aldrich México. La CoQ10 fue cortesía de Nanonutrition S.A. de C.V.

2.2. Obtención de Coenzima Q10 en escala nanométrica

La obtención de los nanocristales de CoQ10 se realizó de acuerdo al procedimiento experimental de desplazamiento de solvente [2, 6]. Las dispersiones de CoQ10 con diferentes concentraciones porcentuales (0.50, 0.70, 1, 1.30 y 1.5 %) fueron preparadas con acetona, adicionando 7.21 mg de α -tocoferol para evitar la oxidación de la coenzima. Las dispersiones fueron filtradas en un filtro de nylon (Millipore Millex-HV de 0.45 μ m); de cada filtrado se tomaron 5 ml, a los que se agregaron 100mg de una mezcla de polímeros encapsulantes y por agitación magnética se dispersaron en la solución. Las mezclas poliméricas fueron preparadas previamente de acuerdo a las siguientes relaciones de PEG:PLA: 20.27:79.79, 50:50, 79.73:20.27 y 100:0. Las dispersiones de CoQ10 combinadas con las mezclas poliméricas, se adicionaron gota a gota en cada una de las soluciones acuosas de gelatina en concentraciones de 1, 1.41, 2, 2.59 y 3 % en un volumen de 70 ml de agua; la gelatina fue utilizada como agente

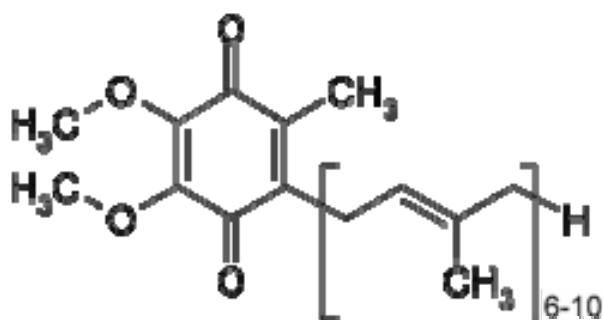


Figura 1. Estructura química de la Coenzima Q10.

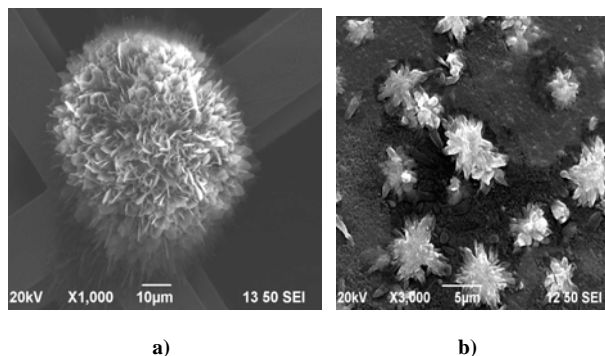
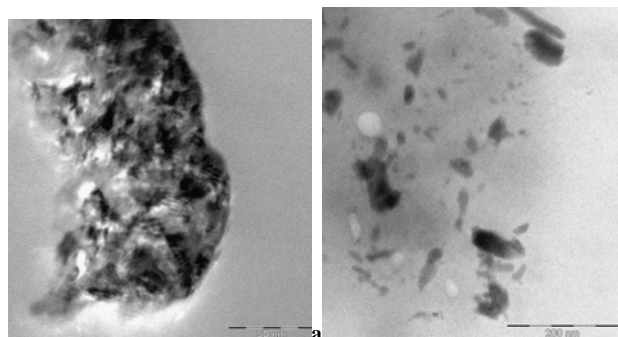


Figura 2. Micrografías en MEB de A) CoQ10 pura y B) coenzima Q10 después de ser pasivada en la matriz polimérica.



Figuras 3. A y B. Micrografías en MET de coenzima Q10 después de ser pasivada en la matriz polimérica.

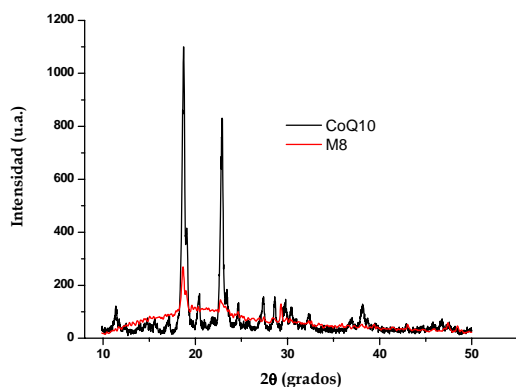


Figura 4. Patrón de difracción de rayos X de CoQ10 pura y CoQ10 embebida en la matriz polimérica.

emulsificante [7, 8]. Finalmente, se eliminó el solvente orgánico de cada una de las suspensiones coloidales en un evaporador rotatorio Yamato RE500 en ausencia de luz. Las estructuras obtenidas en esta última etapa fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) (JEOL JSM-6390LV, JEOL Akishima, Japón), microscopía electrónica de transmisión (MET) (JEOL JEM2010, JEOL Akishima, Japón), difracción de rayos X (DRX) utilizando un difractómetro de Rayos X (Siemens D5000, Alemania), con una radiación $K\alpha$ del Cu de longitud de onda $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$.

2.3. Preparación de las soluciones de fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS)

Para la obtención de la solución de FGS, fueron agregados 0.5 g de NaOH, 0.5g de enzima pepsina (Sigma, EUA) y 1.75 ml de HCL y aforados con agua destilada a un volumen de 250 ml, ajustando el pH a 1.2 con HCl concentrado. Por otro lado se preparó la solución FIS disolviendo 3.8 g de fosfato de potasio monobásico (J.T. Backer) en 125 ml de agua destilada, adicionando 5mg de pancreatina (Sigma, EUA). Esta solución fue aforada a 500 ml con agua destilada, ajustando el pH a 7.5 con una solución de NaOH 1N.

2.4. Determinación de la solubilidad en (FGS y FIS)

Para evaluar la solubilidad de las partículas obtenidas, se planteó un diseño experimental de superficie de respuesta utilizando el software Design Expert versión 7.0.1, realizándose un total de 20 corridas como se muestra en el tabla 1.

En 1.3 ml de FGS se colocaron 3.6 mg de sólidos totales (CoQ10, gelatina, PEG y PLA) de cada una de las suspensiones coloidales. Esta suspensión fue colocada en un baño con agitación moderada y temperatura controlada ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 2 horas. Las suspensiones se centrifugaron a 12000 rpm y la fase sólida fue secada y pesada determinando la solubilidad en FGS por diferencia de peso. Sobre la muestra seca, se adicionaron 1.3ml de FIS (pH 7.5), para lograr una mayor similitud con el proceso de digestión, colocándose nuevamente en baño con agitación moderada y temperatura controlada ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) por 2 horas. Finalmente, las muestras se secaron y pesaron para obtener la solubilidad en FIS, de la CoQ10 embebida en la matriz de polímeros.

3. Resultados y discusión

3.1. Características microestructurales por MEB

En la figura 2A se muestran las características microestructurales de la CoQ10 pura y en la figura 2B se aprecian las características morfológicas de la CoQ10 después de ser pasivada en la matriz polimérica. En la microestructura de la CoQ10 pura (figura 2A) se aprecia un arreglo esferoidal con estructuras alargadas y

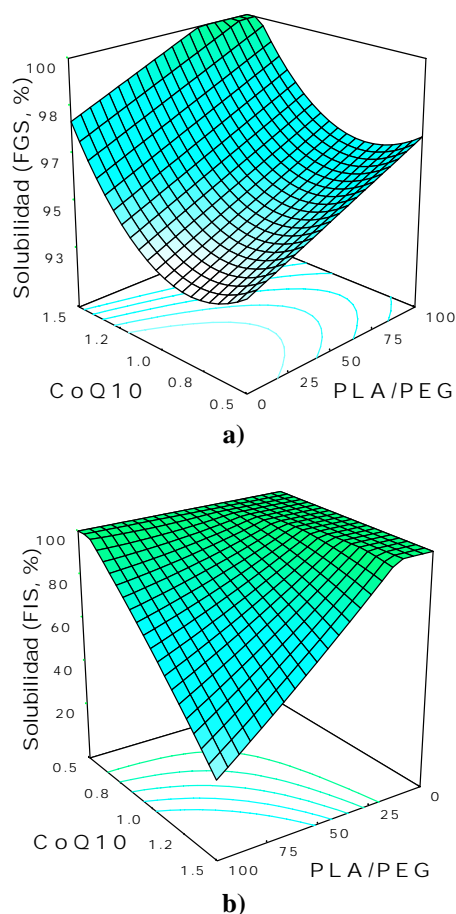


Figura 5. a) Superficie de respuesta de la solubilidad de la CoQ10 en FGS y b) CoQ10 en FIS.

delgadas, unidas superficialmente de forma uniforme. En la figura 2B se puede observar a la CoQ10 con las mismas características morfológicas después de ser embebida en la matriz polimérica, mostrando aglomerados de aproximadamente ($5 \mu\text{m}$) con respecto a la CoQ10 pura ($50 \mu\text{m}$). Esta reducción de tamaño probablemente se deba al efecto inhibitorio de la agregación de los cristales de CoQ10, que ejercen los polímeros y la gelatina sobre los cristales.

3.2. Características microestructurales por MET

Los cristales de CoQ10 que se encuentran embebidos dentro de la red polimérica fueron evaluadas por MET (figuras 3A y 3B). La diferencia de contrastes en las dos micrografías indica que el tono gris claro se relaciona a la presencia de la red polimérica conteniendo en su interior a los cristales de CoQ10 con un color gris oscuro, lo cual fue confirmado posteriormente a través de DRX.

En la figuras 3A y 3B se observa la matriz polimérica envolviendo a los nanocristales de CoQ10, cuyos tamaños se encuentran en un rango menor a los 100 nm . En anteriores figuras se muestran diferentes formas y tamaños de nanopartículas de CoQ10, entre las que encontramos estructuras alargadas en forma de aguja que sugieren la

presencia de los cristales de CoQ10 en la matriz polimérica; aquí también se encontró que el tamaño del cristal de la CoQ10 es de 100 nm .

3.3. Difracción de Rayos X

En la figura 4 se observa el difractograma de la CoQ10 pura y pasivada en los polímeros (M8), respectivamente.

En este patrón de difracción se pueden observar los picos correspondientes a la CoQ10 pura, en los ángulos 2θ 18.68 , 20.47 , 22.83 y 27.36 . Por otro lado, en el patrón de difracción de la muestra pasivada (M8) se observa la presencia de los mismos picos asociados a la CoQ10 sobrepuestos a la curva correspondiente a la estructura amorfa de la red polimérica. Estos picos presentan un ensanchamiento con respecto de los picos de la CoQ10 pura, lo cual está relacionado con la disminución en el tamaño de los cristales embebidos en la red polimérica. Estos resultados concuerdan con los análisis obtenidos mediante MET.

3.4. Solubilidad en FGS y FIS

Los resultados de solubilidad de las nanopartículas encapsuladas se presentan en la figura 5. En la figura 5A se observa la superficie de respuesta de solubilidad de la CoQ10 expuesta a FGS; en la figura 5B se presenta la superficie de respuesta correspondiente a la solubilidad en FIS.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que los factores concentración de CoQ10 y relación de PLA respecto a PEG, afectan directamente la solubilidad de las nanopartículas de CoQ10; es decir, a mayores concentraciones de CoQ10 y de PLA se favorece la solubilidad en FGS, mientras que en FIS la solubilidad se ve disminuida cuando se tienen las mayores concentraciones de CoQ10 y PLA en relación con PEG. Es probable que este comportamiento se deba al efecto del pH y al tipo de enzima utilizada en cada una de las pruebas, es decir, que en FGS con pH bajo (1.2) la solubilidad se incrementa a mayor concentración de CoQ10. Sin embargo en FIS con pH (7.5), la solubilidad de la CoQ10 disminuye indicando que a este pH y mayor concentración de PLA no se favorece la solubilidad.

Por otro lado, con los modelos estadísticos evaluados mediante análisis de varianza se realizaron las superficies de respuesta que se presentan en las figuras 5A y 5B, obteniendo los siguientes valores estadísticos para FGS ($R^2 = 0.5792$, $P < 0.05$ y $\sigma = 2.10$). El modelo y la superficie de respuesta fueron utilizados únicamente para análisis de tendencias del efecto de los factores en la solubilidad. Con respecto al modelo para la solubilidad en FIS el análisis de varianza (ANOVA) con valores de ($P < 0.05$ y $R^2 = 0.7857$). Estos valores nos indican que el modelo se ajusta adecuadamente a los datos experimentales, por lo que el modelo es válido para graficar la superficie de respuesta e inferir sobre los efectos de los factores en la solubilidad.

4. Conclusiones

El método de desplazamiento de solvente resultó adecuado para la obtención de nanopartículas de CoQ10, obteniéndose tamaños menores a 100 nanómetros como se indica en los resultados por MET. A través de DRX y TEM se confirmó que los nanocristales de CoQ10 se encuentran embebidos en la matriz polimérica. También se observó que hay un incremento en la solubilidad de la CoQ10 expuesta a FGS cuando la concentración de CoQ10 y PLA es elevada y en FIS los resultados son inversos a FGS.

Agradecimientos

Agradecemos al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y a la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP), ambos del IPN por su apoyo a este trabajo.

Agradecemos también a la Maestra Marcela Guerrero del Departamento de Física del Centro de Investigación y de

Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), por las medidas de DRX.

Referencias

- [1]. P. Niklowitz, T. Menke, W. Andler, J. G. Okun, *Clinica Chimica Acta* **342**, 219 (2004).
- [2]. K. Terao, D. Nakata, H. Fukumi, G. Schmid, H. Arima, F. Hirayama, y K. Uekama, *Nutrition Research* **26**, 503 (2006).
- [3]. E. G. Bliznakov, *The Journal of the American Nutraceutical Association*, 5, 3 (2002).
- [4]. B. Zanetti-Ramos, M. Soldi, V. Soldi y E. Lemos-Senna, *Acta farmacéutica Bonaerense*, **25**, 2 (2006).
- [5]. H. A. Monreal-Romero, J. Villegas-Ham, R. Guzmán-Medrano, R. Duarte-Rico, M. Loya-Loya, R. Pájaro-Hernandez, J. S. Pinedo-Hernandez y E. García-Torres, *TECNOCENCIA Chihuahua* **I**, 3 (2007).
- [6]. N. J. Barrett, B. Magnus, P. C. Ketul., D. A. Tejal, *International Journal of Pharmaceutics* **348**, 107 (2008).
- [7]. H. S. Ribeiro, B-S. Chu, S. Ichikawa, M. Nakajima, *Food Hydrocolloids* **22**, 12 (2008).
- [8]. K. Sundhir, *Lagmuir*, **14**, 1021 (1998).