

ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj2023821725>

## FORMULACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CON CHITOSÁN PARA LA ADMINISTRACIÓN DE QUERCETINA

### *Formulation and Optimization of Lipid Nanoparticles with Chitosan for Quercetin Delivery*

Diego GALLEGO; Clara Isabel COLINO\*

Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Avda. Lcdo. Méndez Nieto. 37007 Salamanca, España

\*Correo-e: [ganda@usal.es](mailto:ganda@usal.es)

**RESUMEN:** La quercetina posee numerosas actividades, tales como antioxidante, anticancerígena, cardioprotectora, etc., útiles para su uso terapéutico. Sin embargo, presenta una limitada biodisponibilidad debido a su baja solubilidad acuosa, lo que limita su uso farmacéutico. En este trabajo, se propuso la encapsulación de quercetina en liposomas recubiertos con chitosán. Se estudió la influencia del peso molecular del chitosán (ultrabajo, bajo y medio) y la relación fosfatidilcolina:chitosán (16:1, 8:1, 4:1) en el tamaño, el índice de polidispersión, eficacia de encapsulación y potencial zeta de las nanopartículas, obteniéndose valores para estos parámetros de 339,02-670,62 nm, 0,26 y 0,32, 43,5-59,3 % y 55,18-63,28 mV respectivamente. Posteriormente se seleccionó el chitosán de peso molecular bajo y una relación fosfatidilcolina:chitosán 16:1 para un estudio de liofilización de las nanopartículas evaluando el efecto de la temperatura de congelación (-20 °C y -80 °C) y el crioprotector empleado (lactosa, trehalosa y sacarosa) en la eficacia de encapsulación y la humedad residual. Las condiciones de congelación a -80 °C y trehalosa como crioprotector evitaron en mayor medida la pérdida de la quercetina encapsulada.

*Palabras clave:* quercetina; liposomas; chitosán; eficacia de encapsulación; liofilización; crioprotector.

**ABSTRACT:** Quercetin presents numerous activities, such as antioxidant, anticancer, cardioprotective, etc. that make it suitable for its therapeutic use. However, quercetin has a limited bioavailability due to its low water solubility which limits its pharmaceutical application. In this work, the encapsulation of quercetin in chitosan-coated liposomes was proposed. The influence of the molecular weight of chitosan (ultralow, low and medium) and phosphatidylcholine:chitosan ratio (16:1, 8:1, 4:1) on the size, polydispersity index, encapsulation efficiency and zeta potential of the prepared nanoparticles were evaluated, obtaining values of 339.02-670.62 nm, 0,26 y 0,32, 43.5-59.3 % y 55.2-63.3 mV respectively. Subsequently, low molecular weight chitosan and phosphatidylcholine:chitosan 16:1 ratio were selected for a freeze-drying study of the nanoparticles, with freezing temperatures of -20 °C and -80 °C and lactose, trehalose and sucrose as cryoprotectants. The encapsulation efficiency and residual moisture were studied. Freezing conditions at -80 °C and trehalose as cryoprotectant prevented the loss of encapsulated quercetin to a greater extent.

*Keywords:* quercetin; liposomes; chitosan; encapsulation efficiency; freeze-drying; cryoprotectant.

## 1. INTRODUCCIÓN

La quercetina es el flavonoide más abundante en frutas y verduras. Posee actividad antioxidante protegiendo a la célula del estrés oxidativo. Presenta asimismo distintas actividades terapéuticas como anticancerígena, cardioprotectora, antidiabética, antiobesidad, antihipertensiva, antiinflamatoria, antialérgica, inmunomoduladora, hepatoprotectora, antimicrobiana y preventiva de enfermedades neurodegenerativas como el párkinson y el alzhéimer (Brahmachari, 2014).

La quercetina se absorbe por difusión pasiva. Sin embargo, tiene una baja solubilidad en agua (1,53-12,5 mg/l, pH 2-7), se metaboliza ampliamente y es sustrato de las bombas de flujo (Kaşıkçı y Bağdatlıoğlu, 2016). Todo ello reduce su bioavailability por vía oral y compromete su uso farmacéutico.

Para solucionar estos problemas se ha propuesto su incorporación a sistemas nanoparticulares. Dentro de estos, los liposomas son vesículas compuestas principalmente por fosfolípidos, con un tamaño del orden de micrómetros o nanómetros, biocompatibles y que pueden encapsular tanto sustancias hidrosolubles como liposolubles. Los liposomas protegen a los principios activos de la degradación

química, enzimática, térmica y lumínica e incrementan su biodisponibilidad. Además, ofrecen otras ventajas como la vectorización y la liberación controlada (Wang *et al.*, 2016, Gorantla *et al.*, 2022).

Sin embargo, los liposomas también presentan inconvenientes como su rápida eliminación por el sistema retículo endotelial (Elkomy *et al.*, 2022). Además, son inestables en dispersiones acuosas produciéndose agregación y pérdida de fármaco durante el almacenamiento. Los liposomas no son resistentes al pH ácido del estómago ni a la acción de las sales biliares y fosfolipasas del tracto gastrointestinal.

Para evitar los problemas de estabilidad de los liposomas convencionales se pueden recubrir con polímeros como el chitosán. El chitosán es un polisacárido catiónico natural que se obtiene de la quitina por desacetilación química o enzimática. Es uno de los polímeros más utilizados para recubrir la superficie de los liposomas por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y mucoadhesividad (Lee, 2020; Kumar *et al.*, 2020; Elkomy *et al.*, 2022). El chitosán es además promotor de la absorción y tiene propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, cicatrizantes y antitumorales (Alavi, 2017). El recubrimiento de liposomas con chitosán incrementa la integridad de la membrana y la estabilidad física de los liposomas (Lee, 2020; Elkomy *et al.*, 2022).

Para mantener la estabilidad de las nanopartículas se puede recurrir también a su liofilización, método que permite la desecación de un producto en frío. Sin embargo, requiere optimizar el proceso y el uso de crioprotectores para mantener la integridad de la membrana de las vesículas, que se ve comprometida en los procesos de congelación y sublimación.

El desarrollo de formulaciones liposomales recubiertas con chitosán para la administración oral de quercetina resulta de gran interés debido a sus múltiples efectos terapéuticos unidos a su baja solubilidad y biodisponibilidad por vía oral. Por otro lado, hasta el momento no hay prácticamente estudios sobre la liofilización de este tipo de vesículas. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia del tipo y concentración de chitosán en las características de liposomas de quercetina recubiertos con este polímero. Asimismo, se liofilizaron estas vesículas con distintos crioprotectores para su futuro acondicionamiento en cápsulas como una alternativa para mejorar la biodisponibilidad de quercetina por vía oral.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. *Material*

La L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, el chitosán de peso molecular medio y bajo, la sacarosa, la lactosa y la trehalosa fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. El chitosán de peso molecular ultrabajo se adquirió a Glentham Life Sciences. El ácido acético glacial puro se adquirió a AppliChem. El etanol absoluto fue obtenido de Labkem.

## 2.2. Preparación de liposomas recubiertos de chitosán

Se dispersaron 80 mg de fosfatidilcolina de huevo (EPC) y 2 mg de quercetina en 20 ml de tampón fosfato 6,7 mM (pH 7,4). La mezcla se sonicó a 30 °C durante 5 minutos con una frecuencia de 37 kHz en un baño de ultrasonidos (Fisher Scientific FB15061). Después se dejó reposar la suspensión de nanopartículas durante 20 minutos y seguidamente se realizó una filtración con un filtro de poliéster de 0,45 µm (Chromafil PET-45/25).

Para el recubrimiento con chitosán de los liposomas formados se adicionó a la dispersión una disolución de chitosán en ácido acético al 0,5 % en proporciones 1:1 (v:v). Esta mezcla se agitó durante 10 minutos. Se utilizaron polímeros con pesos moleculares ultrabajo, bajo y medio, y relaciones EPC:chitosán 16:1, 8:1 y 4:1 (w:w), realizándose un diseño factorial completo. Finalmente, los liposomas recubiertos se pasaron a través de un filtro de 0,45 µm.

## 2.3. Eficacia de encapsulación

Para determinar la eficacia de encapsulación (EE) de quercetina, se centrifugaron 200 µL de la dispersión de nanopartículas a 14000 rpm y 4 °C durante 1 hora (Eppendorf 5418 R). Después se retiró el sobrenadante y se incorporaron al pellet 800 µL de etanol, con agitación. Tras otra centrifugación de 20 minutos se cuantificó la quercetina del sobrenadante mediante un método de HPLC/UV.

La EE se calculó a partir de la fórmula:

$$EE (\%) = \text{cantidad de quercetina en las nanopartículas} * 100 / \text{cantidad inicial}$$

## 2.4. Determinación del tamaño, PDI y potencial zeta de las nanopartículas por DLS

El análisis del tamaño, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta de las nanopartículas se llevó a cabo por espectrofotometría de correlación fotónica y dispersión de luz electroforética usando el equipo NanoBrook 90 Plus (Brookhaven Instruments).

## 2.5. Cuantificación de quercetina por HPLC

La quercetina se cuantificó mediante un método de HPLC con detección ultravioleta a una longitud de onda de 371 nm. Se utilizó una columna Purospher 18 con tamaño de partícula de 3 µm y una fase móvil compuesta por 30 % acetonitrilo y 70 % ácido ortofosfórico al 0,2 %. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min.

Para la cuantificación se utilizó una recta patrón de quercetina en tampón fosfato y etanol al 50 %. Las concentraciones utilizadas oscilaron entre 50 µg/ml y 1 µg/ml.

Este método fue validado previamente en nuestro laboratorio siguiendo la normativa ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures.

### 2.6. *Liofilización de las nanopartículas*

Los liposomas recubiertos, una vez centrifugados, se resuspendieron en un volumen igual de tampón fosfato (pH 7,4). Se mezcló en un vial de vidrio 1 ml de la suspensión de las vesículas con 1 ml de la disolución del crioprotector. Se realizó un diseño factorial completo y se incluyeron como parámetros de estudio el tipo de crioprotector, lactosa, sacarosa y trehalosa, y la temperatura de congelación, -20° y -80°.

Se usó el chitosán de peso molecular bajo a una relación EPC:chitosán 16:1 y relaciones crioprotector:EPC (w:w) de 10:1 para lactosa y sacarosa y 5:1 para trehalosa basándonos en experiencias previas en nuestro laboratorio. El tiempo de congelación de las muestras fue de 24 horas y posteriormente se liofilizaron durante 48 horas a una temperatura de -80 °C y presión de 0,029 mBar en un liofilizador Telstar Cryodos. Para cada condición de estudio se evaluó la EE antes y después de la liofilización y la humedad residual (HR).

### 2.7. *Determinación de la humedad residual*

La HR se determinó en los liofilizados mediante el método Karl-Fischer con un aparato Titrino Plus (Metrohm 870kF) y el reactivo Aqualine 5.

### 2.8. *Análisis estadístico*

Para la comparación de los resultados se realizó un test ANOVA utilizando el programa MINITAB.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la evaluación de la influencia del peso molecular del chitosán y de la relación EPC:chitosán en el tamaño, PDI, EE y potencial zeta de las vesículas obtenidas se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. Resultados obtenidos del tamaño, PDI, EE y potencial zeta (Media  $\pm$  SD)  
 (n = 3)

TIPO	RATIO EPC:CH	TAMAÑO (NM)	PDI	EE (%)	POTENCIAL ZETA (mV)
Ultrabajo	16:1	339,02 $\pm$ 78,04	0,280 $\pm$ 0,051	43,50 $\pm$ 13,88	55,18 $\pm$ 10,24
Ultrabajo	8:1	473,63 $\pm$ 79,70	0,280 $\pm$ 0,030	63,25 $\pm$ 8,44	61,79 $\pm$ 5,97
Ultrabajo	4:1	461,18 $\pm$ 102,11	0,273 $\pm$ 0,019	49,24 $\pm$ 3,50	62,00 $\pm$ 3,65
Bajo	16:1	488,83 $\pm$ 19,86	0,263 $\pm$ 0,005	59,32 $\pm$ 8,31	61,12 $\pm$ 7,82
Bajo	8:1	670,62 $\pm$ 138,96	0,286 $\pm$ 0,043	53,59 $\pm$ 1,77	57,53 $\pm$ 4,66
Bajo	4:1	610,37 $\pm$ 234,41	0,283 $\pm$ 0,031	47,60 $\pm$ 6,47	57,63 $\pm$ 1,70
Medio	16:1	477,61 $\pm$ 140,65	0,302 $\pm$ 0,012	52,59 $\pm$ 6,88	63,28 $\pm$ 3,46
Medio	8:1	656,49 $\pm$ 351,28	0,287 $\pm$ 0,019	53,93 $\pm$ 5,88	56,72 $\pm$ 8,83
Medio	4:1	558,29 $\pm$ 82,71	0,316 $\pm$ 0,017	49,30 $\pm$ 8,59	57,56 $\pm$ 8,42

Las vesículas presentaron diámetros hidrodinámicos medios de entre 339,02 nm y 670,62 nm. En cuanto a su morfología, mostraron forma redondeada y una distribución de tamaños monomodal (Figura 1). El potencial zeta es positivo por el recubrimiento de las vesículas con chitosán, que se une a la fosfatidilcolina de los liposomas mediante enlaces electrostáticos. Los valores obtenidos son superiores a 30 mV, límite que habitualmente se considera necesario para evitar la agregación de las nanopartículas en un medio acuoso (Mohanraj y Chen, 2006). Sin embargo, la elevada variabilidad en los valores de tamaño obtenidos podría indicar cierto grado de agregación de las vesículas.

El PDI indica la uniformidad de tamaño de las vesículas. Los valores obtenidos fueron  $\leq$  0,3, valor para el que se considera que la población es homogénea y aceptable en las vesículas utilizadas en la administración de fármacos (Barros *et al.*, 2021).

Los resultados de EE de quercetina oscilaron entre un 43,50 % y un 59,32 %, algo inferiores a los obtenidos por otros autores (Hao *et al.*, 2017). Esto podría deberse a que nuestro método no utiliza solventes orgánicos. Sin embargo, esta característica lo hace mucho más respetuoso con el medio ambiente.

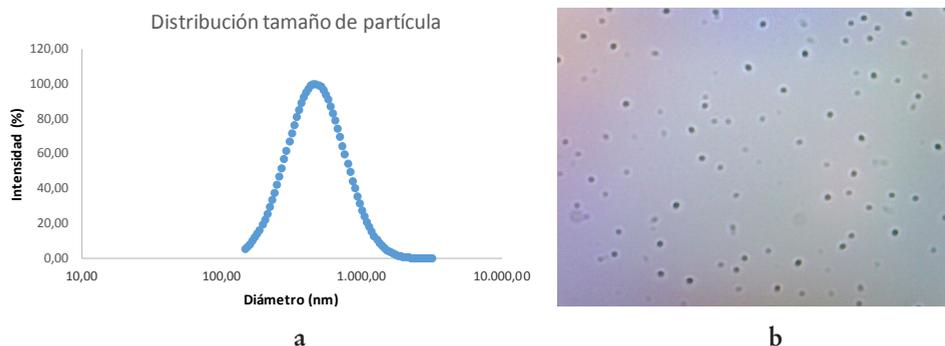


Figura 1. **a.** Distribución de tamaño de partícula para un lote de liposomas recubiertos con chitosán de bajo peso molecular y una relación EPC:chitosán de 16:1. **b.** Fotografía del mismo lote observado al microscopio óptico (Swift x40).

En el rango de valores estudiados, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables evaluadas ( $p > 0,05$ ). Por razones de disponibilidad del excipiente se eligió el chitosán de peso molecular bajo y en la concentración más baja (EPC:chitosán de 16:1) para los siguientes experimentos.

Con el fin de incrementar la estabilidad de las vesículas y con la perspectiva de su formulación en cápsulas se planteó su liofilización.

Los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del crioprotector y la temperatura de congelación en la EE y la HR se muestran en la Tabla 2. Se calculó el error relativo de la EE después de la liofilización en relación al valor de este parámetro antes del proceso.

Los resultados mostraron reducciones de la EE, como consecuencia del proceso de liofilización, de prácticamente el 50 %. Por lo tanto, la estrategia de incorporación de azúcares utilizada no ha podido prevenir la salida del fármaco desde las vesículas durante la liofilización. Este efecto se ha descrito también para los liposomas (Jiang *et al.*, 2023; Guimarães *et al.*, 2019).

TABLA 2. Resultados obtenidos de EE, error relativo en la EE  
 y HR (Media  $\pm$  SD) (n = 3)

CRIOPROTECTOR	TEMPERATURA DE CONGELACIÓN (°C)	EE (%)	ERROR RELATIVO EE (%)	HR (%)
Lactosa	-20	31,66 $\pm$ 2,76	50,15 $\pm$ 3,93	3,16 $\pm$ 1,56
Lactosa	-80	32,16 $\pm$ 2,54	49,36 $\pm$ 3,56	1,75 $\pm$ 0,26
Trehalosa	-20	34,15 $\pm$ 4,70	46,24 $\pm$ 7,00	2,20 $\pm$ 0,61
Trehalosa	-80	35,87 $\pm$ 0,45	43,49 $\pm$ 0,40	2,26 $\pm$ 0,94
Sacarosa	-20	34,24 $\pm$ 0,20	45,49 $\pm$ 0,32	2,55 $\pm$ 0,28
Sacarosa	-80	33,68 $\pm$ 2,20	46,95 $\pm$ 3,05	1,56 $\pm$ 0,43

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el error relativo de la EE según el crioprotector utilizado ( $p = 0,03$ ). Las condiciones trehalosa y  $-80$  °C fueron las que consiguieron una menor reducción en este parámetro.

No obstante, la importante disminución en la EE indica la necesidad de buscar nuevas opciones para la mejora de la estabilidad durante el proceso de liofilización de las vesículas, bien incrementando la proporción de crioprotector, bien modificando el método de incorporación.

La HR no mostró diferencias significativas con la temperatura y el tipo de crioprotector y fue en todos los casos inferior o cercana al 3 %. La optimización del proceso incrementando el tiempo de liofilización y/o incluyendo una etapa de desecación secundaria podría reducir la HR del liofilizado.

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos para los liposomas recubiertos con chitosán de peso molecular ultrabajo, bajo y medio con relación EPC:chitosán de 16:1, 8:1 y 4:1 (w:w) oscilaron entre el 43,5 % y el 63,3 % para la EE, 339,02 nm y 670,62 nm para el tamaño. El valor del PDI fue  $\leq 0,3$  y el potencial zeta  $> 30$  mV.

En el rango de valores estudiados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las características de las vesículas preparadas.

La liofilización de las vesículas usando temperaturas de congelación de  $-20$  °C y  $-80$  °C y lactosa, sacarosa y trehalosa como crioprotectores produjo una reducción de cerca del 50 % en la EE de quercetina.

La trehalosa en condiciones de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  es la estrategia que mejor preserva la EE de las vesículas durante el proceso de liofilización.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Alavi S, Haeri A, Dadashzadeh S. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. *Carbohydr Polym.* 2017;157:991-1012.
- Barros C de, Aranha N, Severino P, Souto EB, Zielińska A, Lopes A *et al.* Quality by design approach for the development of liposome carrying ghrelin for intranasal administration. *Pharmaceutics.* 2021;13(5):686.
- Brahmachari G. Natural bioactive molecules: impacts and prospects. Brahmachari G, editor. Alpha Science International Ltd; 2014.
- Elkomy MH, Ali AA, Eid HM. Chitosan on the surface of nanoparticles for enhanced drug delivery: A comprehensive review. *J Control Release.* 2022;351:923-940.
- Gorantla S, Wadhwa G, Jain S, Sankar S, Nuwal K, Mahmood A *et al.* Recent advances in nanocarriers for nutrient delivery. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2022;12(10):2359-2384.
- Guimarães D, Noro J, Silva C, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Protective Effect of Saccharides on Freeze-Dried Liposomes Encapsulating Drugs. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019;7:424.
- Hao J, Guo B, Yu S, Zhang W, Zhang D, Wang J *et al.* Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. *LWT.* 2017;85:37-44.
- Jiang H, Wang Y, Xu X, Deng L, Feng L, Han J *et al.* Effect of oligosaccharides as lyoprotectants on the stability of curcumin-loaded nanoliposomes during lyophilization. *Food Chem.* 2023;410:135436.
- Kaşıkcı MB, Bağdatlıoğlu N. Bioavailability of Quercetin. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal.* 25 de octubre de 2016;4:146-151.
- Kumar S, Dutta J, Dutta PK, Koh J. A systematic study on chitosan-liposome based systems for biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020;160:470-481.
- Lee MK. Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. *Pharmaceutics.* 2020;12(3):264.
- Mohanraj, VJ, Chen Y. Nanoparticles - A review. *Trop. J. Pharm. Res.* 2006;5(1):561-573.
- Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J *et al.* The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci.* 2016;56:21-38.

