



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas
Departamento de Química Inorgánica y Analítica

Estudio de la incorporación de vitamina E y derivados en nanopartículas de albúmina: diseño experimental para la optimización de la eficiencia de encapsulación

Patrocinante

Dr. Claudio Olea Azar

Departamento de Química
Inorgánica y Analítica

Director

Dr. Javier Morales Valenzuela

Departamento de Ciencias y
Tecnología Farmacéuticas

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

CRISTÓBAL IGNACIO HONORES BRAVO

Santiago de Chile

2020

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia por haberme apoyado durante la carrera, a mi mamá y a Ricardo Aravena por haberme apoyado en la parte estadística de este trabajo. También quiero agradecer a los profesores Claudio Olea y Javier Morales, ya que gracias a ellos pude presentar este trabajo en periodo de cuarentena, siendo así el primer estudiante de la facultad que se pudo titular de esta forma. Y en especial a mi pareja Carolina López por estar siempre a mi lado durante todo este proceso y ayudarme en la parte de diseño de este trabajo.

Resumen

La vitamina E es un compuesto de conocida capacidad antioxidante, siendo beneficioso para salud debido a que ayuda a prevenir enfermedades derivadas del desbalance producido por estrés oxidativo. Los seres humanos ingerimos la vitamina E de manera natural de alimentos tales como nueces, semillas, hortalizas de hojas verde y también a través de la ingesta bebidas fortificadas o mediante suplementos alimenticios. La vitamina E al igual que otros compuestos bioactivos, luego de su absorción mediada por sales biliares, se distribuye a través del organismo por la sangre, donde tiene la capacidad de unirse a proteínas plasmáticas como la albúmina. Además, esta interacción ha sido aprovechada para desarrollar nanopartículas de albúmina para la vehiculización de compuestos bioactivos como la Vitamina E, que mejoren su biodisponibilidad.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto que tienen algunos factores experimentales en la incorporación de Vitamina E en nanopartículas de albúmina de bovino (BSA), aplicando para ello un método estadístico factorial experimental, que permita obtener resultados representativos tal que, al modelar el error experimental, este sea reducido.

Los resultados obtenidos evidencian que tanto la formación como el tamaño de las nanopartículas de BSA, no dependen de la cantidad de antisolvente, de la concentración de vitamina E, ni de la cantidad de BSA agregada. En cambio, depende de otros factores tales como, el antisolvente utilizado, la velocidad de adición de antisolvente y el pH al cual se disuelve la BSA, entre otros. Para la eficiencia de encapsulación esta disminuyó a mayor cantidad de etanol agregado, contrario a lo que ocurre con la concentración de vitamina E. La utilización del método de superficie de respuesta, permitió observar los resultados de forma gráfica y simplificada, para así poder tener un rango de valores donde los cuales se optimice el experimento. Como primera instancia se obtuvo un modelo matemático el cual permitió modelar los resultados obtenidos, sin embargo, este modelo tuvo problemas para la optimización en los límites de la función.

Summary

Vitamin E is a compound known by its antioxidant capacity, being beneficial for health because it helps prevent diseases derived from the imbalance caused by oxidative stress. Humans ingest vitamin E naturally from foods such as nuts, seeds, green leafy vegetables and also through the intake of fortified drinks or through food supplements. Vitamin E, like other bioactive compounds, after its absorption mediated by bile salts, is distributed throughout the body through the blood, where it has the ability to bind to plasma proteins such as albumin. In addition, this interaction has been used to develop albumin nanoparticles for the vehicleization of bioactive compounds, which improve their bioavailability.

The objective of this work is to study the effect that experimental factors have on the incorporation of Vitamin E in bovine albumin nanoparticles (BSA), applying for this an experimental factorial statistical method, which allows obtaining representative results such that, when modeling the experimental error this is reduced.

The results obtained show that both the formation and size of the NPs-BSA do not depend on the amount of solvent, the concentration of vitamin E, or the amount of BSA added. Instead, it depends on other factors such as the antisolvent used, the rate of antisolvent addition and the pH at which the BSA dissolves, among others. For encapsulation efficiency, this decreased to a greater amount of ethanol added, contrary to what occurs with the concentration of vitamin E. The use of the response surface method allowed us to observe the results in a graphic and simplified way, in order to have a range of values where the experiment is optimized. As a first instance a mathematical model was obtained which allowed modeling the results obtained, however, this model has problems for optimization in the limits of the function.

Índice

| | |
|--|--------------------------------------|
| I. Introducción | 7 |
| 1. Vitamina E y su derivado | 8 |
| a) Vitamina E | 9 |
| b) Succinato de tocoferol | 9 |
| 2. Albúmina de suero bovino (BSA)..... | 10 |
| 3. Modelo de estudio: albúmina de suero bovino | 10 |
| 4. Nanopartículas de albúmina de suero bovino (NPs-BSA) | 11 |
| 5. Diseño factorial | 12 |
| 6. Metodología de superficie de respuesta (RSM) | 13 |
| II. Objetivo | 16 |
| 1. Objetivo general | 16 |
| 2. Objetivos Específicos | 16 |
| III. Materiales | 16 |
| IV. Metodología | 17 |
| 1. Preparación de soluciones stock de tocoferol y succinato de tocoferol..... | 17 |
| 2. Caracterización de los compuestos mediante espectrofotometría UV vis y HPLC. | 17 |
| 3. Incorporación de tocoferol en nanopartículas de BSA..... | 17 |
| 4. Análisis y caracterización de NPs-BSA. | 18 |
| 5. Análisis estadístico. | 19 |
| V. Resultados y discusión | 20 |
| 1. Desarrollo de metodologías para la detección de tocoferol y succinato de tocoferol. | 20 |
| a) Espectrofotometría | 20 |
| b) HPLC | ¡Error! Marcador no definido. |
| 2. Desarrollo de NPs-BSA para la encapsulación de tocoferol y succinato de tocoferol. | 38 |
| a) Diseño experimental | 38 |
| b) Preparación de NPs..... | 39 |
| c) Optimización por Método de superficie de respuesta (RSM) | 58 |
| 3. Caracterización de las NPs y comparación entre NPs-BSA con tocoferol y NPs-BSA con succinato de tocoferol. | 61 |
| VI. Conclusión | 64 |

I. Introducción

Los compuestos polifenólicos de origen natural han sido con frecuencia estudiados en diversas disciplinas de las ciencias naturales fundamentalmente dados sus conocidos efectos antioxidantes. En la actualidad, la industria de alimentos los ha incorporado en diversos productos manufacturados, recibiendo el interés de los consumidores por varias razones. Varios estudios epidemiológicos¹ han sugerido asociaciones entre el consumo de alimentos o bebidas ricas en polifenoles y la prevención de enfermedades. Una segunda razón está relacionada con la naturaleza química fundamental de estos compuestos. Los polifenoles son agentes reductores y junto con otros agentes reductores tales como la vitamina C, la vitamina E y los carotenoides, protegen los tejidos del organismo contra el estrés oxidativo, siendo comúnmente conocidos como antioxidantes. De esta forma, son agentes utilizados en la prevención de diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como cánceres, enfermedades cardiovasculares, inflamación y otras. Un factor importante es que los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en nuestras dietas.

Las nanopartículas poliméricas tienen mucho potencial en el ámbito médico con una gran cantidad de nanopartículas (NPs) terapéuticas actualmente en ensayos clínicos o aprobados para uso terapéutico. La utilización de nanopartículas posibilita la entrega adecuada de fármacos con problemas de solubilidad en agua en tejidos específicos, a través de mecanismos de liberación controlada.²

El uso de albúmina de suero bovino (BSA) como un nanotransportador para compuestos antioxidantes naturales de baja solubilidad en agua (por ejemplo, la vitamina E) podría ser una alternativa interesante, ya que la BSA es una proteína natural biocompatible, biodegradable, no tóxica y no inmunogénica, que tiene múltiples sitios de unión, lo que permite unir una gran cantidad de compuestos bioactivos (hidrofílicos e hidrofóbicos) de una manera relativamente

¹ A. Scalbert, G. Williamson, Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *The Journal of nutrition*, 130 (2000) 2073S-2085S.

² Protein–Polymer Hybrid Nanoparticles for Drug Delivery Jun Ge, Evgenios Neofytou, Jiandu Lei, Ramin E. Beygui, and Richard N. Zare

inespecífica. Además, la albúmina sérica es la más abundante proteína plasmática en mamíferos, por lo que su administración *in vivo* es bien tolerada.

1. Vitamina E y su derivado

La vitamina E es un nutriente liposoluble presente en muchos alimentos. En el organismo actúa como eficiente antioxidante, al ayudar a proteger las células contra los daños causados por los radicales libres y otras especies oxidantes. Los radicales libres se forman tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Las personas también están expuestas a los radicales libres presentes en el ambiente por el humo del cigarrillo, la contaminación del aire y la radiación solar ultravioleta. Por otra parte, el organismo necesita vitamina E para estimular el sistema inmunitario a fin de que éste pueda combatir agentes nocivos como microorganismos que están constantemente invadiéndolo. También ayuda a dilatar los vasos sanguíneos y evitar la formación de coágulos de sangre en su interior. Además, las células emplean la vitamina E para interactuar entre sí y cumplir numerosas funciones.³

Los beneficios para la salud de la vitamina E son bien conocidos por los consumidores. Existe evidencia de que esa vitamina tiene efectos positivos sobre enfermedades cardiovasculares, la prevención del cáncer, el sistema inmunitario y ralentiza el proceso de envejecimiento. Se puede obtener una cantidad adecuada de vitamina E a partir de una dieta equilibrada, o compensar la diferencia con medicamentos, alimentos o bebidas fortificados con vitamina E. Debido a que esta vitamina no es soluble en agua, es necesario administrarla en vehículos como las emulsiones antes de que pueda usarse en la fortificación de bebidas.

A continuación, se presentan en la Figura 1 y Figura 2, las estructuras químicas de los dos compuestos que se estudiarán en ese trabajo.

³ Office of Dietary Supplements (ODS)

a) Vitamina E

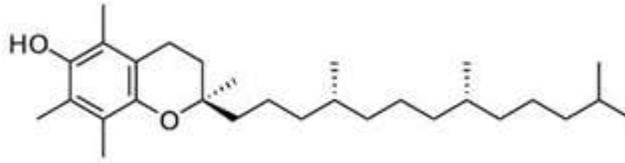


Figura 1: Estructura química de α -Tocoferol.

b) Succinato de tocoferol

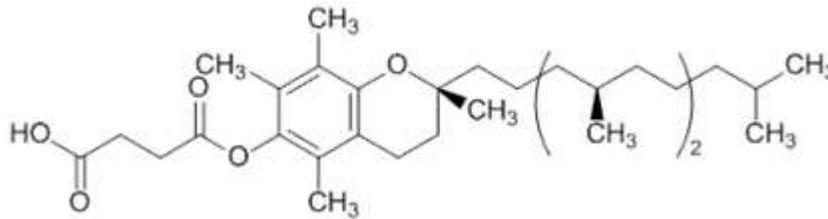


Figura 2: Estructura química de succinato de α -Tocoferol.

Si bien ambos compuestos pertenecen a la familia de los polifenoles y tienen estructuras similares entre sí, tienen una gran diferencia. En la molécula de tocoferol se encuentra un grupo hidroxilo (OH), en cambio en la estructura del succinato de tocoferol, en la misma posición donde se encuentra el grupo OH, el protón está sustituido por un grupo succinato. Esto genera que ambas estructuras posean propiedades diferentes, en específico, la polaridad, estabilidad y pKa.

En cuanto al pKa, la molécula de succinato de tocoferol es más ácida que el tocoferol simple, esto se debe a que el grupo ácido carboxílico tiene una mayor facilidad para desprotonarse a diferencia del fenol del tocoferol, que está completamente sustituido.

2. Albúmina de suero bovino (BSA)

La albúmina de suero bovino (también conocida como BSA o "Fracción V") es una proteína de albúmina de suero derivada de vacas, Figura 3. A menudo se usa como un estándar de concentración de proteínas.

La proteína precursora de BSA de longitud completa tiene 607 aminoácidos (AA) de longitud. Una secuencia de 18 residuos de péptido N-terminal se corta de la proteína precursora tras la secreción, por lo tanto, el producto proteico inicial contiene 589 residuos de aminoácidos. Se dividen seis aminoácidos adicionales para producir la proteína BSA madura que contiene 583 aminoácidos.

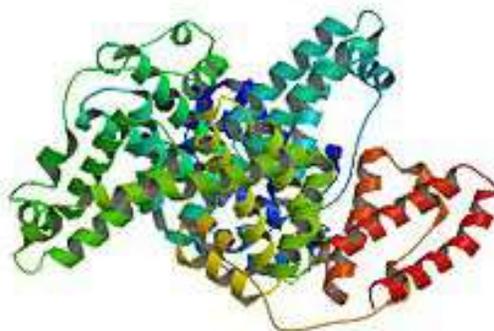


Figura 3: Ilustración de la molécula de BSA.

3. Modelo de estudio: albúmina de suero bovino

Los antioxidantes poseen la capacidad de interactuar con distintas proteínas desde que se administran (por ejemplo; algunas catequinas con la caseína de la leche), al estar en la circulación sanguínea (flavonoides con albúmina), con proteínas estructurales celulares (glicoforina de eritrocitos) pudiéndose modificar tanto su biodisponibilidad como sus efectos

farmacológicos. Una de las proteínas importantes para la distribución de compuestos bioactivos en el organismo es la proteína albúmina de suero humano (HSA). La unión de sustancias induce muchas veces modificaciones de interacciones débiles, lo que resulta en cambios en la estructura y en la estabilidad de HSA.

La albúmina de suero bovino (BSA) es utilizada con frecuencia como modelo en estudios toxicológicos y en la interacción de moléculas bioactivas (fármacos y moléculas naturales como los polifenoles). Estudios recientes sugieren que la unión con BSA afecta la absorción, biodisponibilidad y actividad de las moléculas unidas, dependiendo de la estructura del polifenol.

La BSA es una de las proteínas más estudiadas dentro de los tipos de albúminas, debido principalmente a la similitud estructural que existe con la albúmina de suero humana (HSA)⁴.

4. Nanopartículas de albúmina de suero bovino (NPs-BSA)

La coacervación es un fenómeno que está asociado con las sustancias coloidales. Este fenómeno ocurre con la modificación de algunas características en un sistema coloidal, tales como, cambio en el pH o la adición de una sal, las cuales pueden producir una disminución de la solubilidad de la macromolécula, provocando su separación en una nueva fase⁵.

En este nuevo sistema pueden distinguirse dos zonas, una rica en sustancia coloidal y la otra que contiene una baja proporción de la macromolécula. En la fase rica en coloide, la macromolécula puede quedar constituyendo una fase en forma de pequeñas gotas al estado líquido. Este fenómeno se denomina coacervación y las pequeñas gotas forman el estrato líquido llamado coacervato. Cuando se forma el coacervato y en condiciones favorables, éste

⁴ Structural comparison of HSA, BSA, ESA and LSA aligned on C atoms in Coot. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography 68(Pt 10):1278-89

⁵ Galisteo-González F, Molina-Bolívar JA. Systematic study on the preparation of BSA nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces. 2014;123:286–92.

puede producir la microencapsulación de pequeñas partículas sólidas o gotas de líquido inmiscibles que se encuentren en la interface.

Este proceso es preferible para la preparación de NP basados en proteínas y la encapsulación de fármacos proteicos.

5. *Diseño factorial*

El objetivo de un diseño factorial es estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas, cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores. Por ejemplo, uno de los objetivos particulares más importantes que en ocasiones tiene un diseño factorial es determinar una combinación de niveles de los factores en la que el desempeño del proceso sea mejor.

Los diseños factoriales producen experimentos más eficientes, pues cada observación proporciona información sobre todos los factores, y sus respuestas en diferentes niveles. La respuesta a cualquier factor observado en diferentes condiciones indica si éstos actúan en las unidades experimentales de manera independiente. La interacción entre factores ocurre cuando su actuación no es independiente.⁶

Para estudiar la manera en que influye cada factor sobre la variable de respuesta es necesario elegir al menos dos niveles de prueba para cada uno de ellos. Con el diseño factorial completo se corren aleatoriamente todas las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a investigar. Por ejemplo, con $k = 2$ factores, ambos con dos niveles, se forma el diseño factorial $2 * 2 = 2^2$, que consiste en cuatro combinaciones o puntos experimentales. Si ahora uno tiene tres niveles y el otro dos, se pueden construir $3 * 2$ combinaciones que dan lugar al diseño factorial $3 * 2$ ⁷.

⁶ Ref. Kuehl, R.O., Diseño de experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2ed. Thomson Learning (pp:175)

⁷ Humberto G. Pulido, Roman de la Vara S. Análisis y diseño de experimentos.

El estudio cruzado describe experimentos con tratamientos suministrados en secuencia a cada unidad experimental: un tratamiento se administra a una unidad experimental en un período específico, después del cual se administra otro tratamiento a la misma unidad. Los tratamientos se aplican en forma sucesiva a la unidad hasta que ha recibido todos los tratamientos.

Cuando se comparan tratamientos en la misma unidad experimental, la variación entre unidades se elimina del error experimental. Así, las unidades experimentales individuales se usan como bloques para disminuir el error experimental y aumentar la eficiencia del experimento⁸.

Una desventaja del diseño cruzado es la posibilidad de que un tratamiento suministrado en un periodo influya en la respuesta del siguiente periodo de tratamiento. Los efectos de un tratamiento que continúan durante el siguiente periodo de tratamiento son efectos acarreados. Por ejemplo, después de administrar un fármaco a un paciente, se trata de que el periodo de descanso permita eliminar o “limpiar” los residuos en su sistema, para que no estén presentes en los períodos sucesivos de tratamiento. Aunque se dé suficiente tiempo de descanso para que desaparezca el fármaco inicial del sistema, el estado psicológico del paciente puede haberse alterado lo suficiente como para tener algún efecto en las respuestas de los posteriores periodos de tratamiento.

6. Metodología de superficie de respuesta (RSM)

La Metodología de Superficies de Respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito de estas técnicas es determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos y establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta.⁹

⁸ Douglas C. Montgomery. *Design And Analysis of Experiments* 8th Edition (2012).

⁹ Raymond H. Myers, Douglas C. Montgomery, Christine M. Anderson-Cook. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*, 3rd Edition.

La superficie de respuesta permite que el investigador inspeccione, de manera visual, la respuesta para cierta zona de los niveles de los factores de interés y evaluar su sensibilidad a los factores de tratamiento. En ciertas aplicaciones industriales, las superficies de respuesta se exploran para determinar la combinación de niveles de los factores que proporcionan una condición operativa óptima, como la combinación de temperatura y tiempo que maximiza la producción química. Las superficies de respuesta también se pueden utilizar en estudios analíticos de procesos fundamentales; por ejemplo, suelen usarse en las ciencias biológicas para investigar la influencia mutua de los factores sobre la variable de respuesta, como la interacción entre el nitrógeno y fósforo en el crecimiento de las plantas ¹⁰.

La metodología de superficie de respuesta (RSM) explora las relaciones entre varias variables explicativas y una o más variables de respuesta. La idea principal de RSM es usar una secuencia de experimentos diseñados, métodos estadísticos de diseños experimentales, para obtener una respuesta óptima. Si bien este modelo es solo una aproximación, es utilizado porque dicho modelo es fácil de estimar y aplicar, incluso cuando se sabe poco sobre el proceso. Los enfoques estadísticos como el RSM pueden emplearse para maximizar la producción de una sustancia especial mediante la optimización de factores operativos. A diferencia de los métodos convencionales, la interacción entre las variables del proceso puede determinarse mediante técnicas estadísticas.

De esta forma, el propósito de este trabajo es estudiar el efecto que tienen los factores como concentración de tocoferol, cantidad de BSA y volumen de etanol agregado, que influyen a la formación de nanopartículas de BSA y la incorporación de Vitamina E, aplicando para ello un método estadístico factorial experimental. Éste permitirá obtener resultados representativos tal que, al modelar el error experimental sea reducido. El método de superficie de respuesta (RSM) será utilizado con los resultados obtenidos del diseño experimental con el fin de modelar y optimizar cada uno de estos factores que afectan la formación de las NPs-BSA. Esta

¹⁰ Ref. Kuehl, R.O, Diseño de experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2ed. Thomson Learning (pp:423-4)

combinación de métodos estadísticos ha sido ampliamente utilizada para optimizar procesos y estudiar los factores de éstos. Por ejemplo, en la encapsulación de fármacos dirigidos al tratamiento del cáncer con nanopartículas de BSA.¹¹

¹¹ Yuangang Zu, Yu Zhang, Xiuhua Zhao, Qi Zhang, Yang Liu, and Ru Jiang, Optimization of the preparation process of vinblastine sulfate (VBLS)-loaded folateconjugated bovine serum albumin (BSA) nanoparticles for tumor-targeted drug delivery using response surface methodology (RSM).

II. Objetivo

1. *Objetivo general*

Estudiar la incorporación de tocoferol y su derivado succinato de tocoferol en nanopartículas de albúmina a través de un diseño experimental.

2. *Objetivos Específicos*

1. Optimizar una metodología por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para la posterior evaluación de la incorporación de Vitamina E y su derivado en nanopartículas de BSA.
2. Preparar y caracterizar nanopartículas de BSA con y sin derivados de vitamina E.
3. Evaluar la eficiencia de incorporación de vitamina E y su derivado, y tamaño de la nanopartícula en función de variables como: propiedades estructurales y fisicoquímicas de la molécula en estudio, concentración de albúmina, pH del medio, agitación, volumen de antisolvente, entre otros.
4. Realizar un análisis estadístico de diseño factorial utilizando el programa R.
5. Obtener un modelo estadístico que permita la preparación de BSA NPs óptimas en cuanto a tamaño de partícula, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación.

III. Materiales

Se utilizó α -Tocoferol, succinato de α -Tocoferol y glutaraldehído obtenidos de Sigma-Aldrich sin mayor purificación.

Albúmina de suero bovino (BSA fracción V, $\leq 98\%$ kDa), hidróxido de sodio (NaOH), etanol (grado HPLC), metanol (grado HPLC), bicarbonato de sodio (NaHCO₃) fueron obtenidos de Merck.

Para todos los experimentos se utilizó agua desionizada (Mili Q, 18,2 M Ω cm).

IV. Metodología

1. Preparación de soluciones stock de tocoferol y succinato de tocoferol.

Se prepararon soluciones estándares de cada uno de los compuestos estudiados, pesando para ello una cantidad determinada de los compuestos, que posteriormente fueron transferidos a matraces volumétricos de 20 mL y solubilizados con etanol, para obtener concentraciones entre 0,5 mg/mL y 2 mg/mL. Luego se agitaron en vórtex para su total disolución.

También se preparó una solución tampón pH 8,8 de concentración 0,1 M, para lo cual se utilizó agua desionizada, ajustándose el pH con soluciones de bicarbonato de sodio 20 mM e hidróxido de sodio 0,1 M.

2. Caracterización de los compuestos mediante espectrofotometría UV vis y cromatografía líquida de alta eficiencia.

A partir de las soluciones stock se preparan diluciones de cada compuesto, para ser medidas tanto por espectrofotometría UV vis en una cubeta con 3 mL del medio seleccionado, como por cromatografía HPLC. Para la determinación espectrofotométrica se midió el espectro de absorción y las absorbancias a la longitud de máxima absorción, 290 nm para el tocoferol y 278 nm para el succinato de tocoferol. Para el método cromatográfico se midió el área bajo la curva de la señal correspondiente al compuesto. Para ambas metodologías se realizaron curvas de calibración en triplicado.

Los medios seleccionados fueron etanol, agua desionizada y una mezcla 2:1 de etanol:agua.

3. Incorporación de tocoferol en nanopartículas de BSA.

Las nanopartículas de BSA fueron preparadas mediante el método de adición de antisolvente¹², para lo cual se pesaron cantidades variables, entre 10 mg y 100 mg de BSA. De esta forma, para una cantidad determinada de BSA contenida en un vial, se le agregó 2 mL de la solución de

¹² Galisteo-González F, Molina-Bolívar JA. Systematic study on the preparation of BSA nanoparticles.

tampón a pH 8,8 previamente preparado. Luego la BSA se disolvió con ayuda de un baño de ultrasonido, para evitar la formación de espuma por la BSA.

Luego de la disolución de la BSA se agregó gota a gota un determinado volumen de la solución stock del compuesto en estudio, el cual proviene de una solución patrón en etanol. La agitación se mantuvo constante durante este proceso. Finalmente, luego de agregar toda la solución, se agregó un volumen de 10 µL de glutaraldehído al 4% (v/v).

4. Análisis y caracterización de NPs-BSA.

Luego de obtener las nanopartículas, estas fueron purificadas por centrifugación a 12.500 rpm por 10 min a 25°C. El sobrenadante fue separado para su posterior análisis.

El sobrenadante obtenido se analizó por HPLC para así, a través de los cálculos correspondientes, determinar la eficiencia de encapsulación y el porcentaje de carga del fármaco. En cuanto al pellet obtenido, este se redispersó y se analizó mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de barrido (SEM) para la caracterización de la morfología de la nanopartícula.

Para la eficiencia de encapsulación, el sobrenadante se mide en el HPLC utilizando el método ya definido.

La eficiencia de encapsulación (%EE) y el porcentaje de carga de fármaco (%DL), se determinan utilizando las siguientes fórmulas:

$$\%EE = \frac{C_i - C_l}{C_i} * 100$$

$$\%DL = \frac{C_i - C_l}{Peso\ total} * 100$$

Donde C_i y C_f son las cantidades de compuesto inicialmente agregadas en las nanopartículas BSA desarrolladas y la cantidad de compuesto no encapsulado determinada por el método HPLC, respectivamente. El peso total es la cantidad total de BSA y compuesto en la preparación final.

El precipitado obtenido de la centrifugación se re suspende en agua desionizada pura. Luego de eso, se toma solo una pequeña cantidad de la suspensión de nanopartículas para su análisis.

Los diámetros hidrodinámicos y los índices de polidispersidad de las nanopartículas se determinarán usando DLS a 25 °C, en el equipo Zetasizer Nano Z y un tiempo de equilibrio de 30 s. Para esto, los NP de BSA se diluyen en agua desionizada. El potencial zeta se obtendrá utilizando el mismo equipo, y las muestras se diluyen en agua desionizada a 25 °C. Cada medida se realizará tres veces.

TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL ZETA:

Las medidas de tamaño y potencial zeta de las nanopartículas, fueron obtenidas mediante el analizador Zetasizer Nano Z controlado por el programa Zetasizer software (Malvern, Reino Unido) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO:

Microscopio Electrónico de Barrido FEITM inspect modelo F50, con un voltaje de aceleración de 10.000 kV. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

5. *Análisis estadístico.*

Los datos obtenidos fueron registrados en una planilla de Excel, las cuales fueron analizadas posteriormente utilizando el programa de R Studio. Los gráficos fueron obtenidos utilizando el paquete de Plotly en R.

V. Resultados y discusión

1. *Desarrollo de metodologías para la detección de tocoferol y succinato de tocoferol.*

a) Espectrofotometría

Antes de realizar los experimentos necesarios para la determinación de los compuestos en estudios incorporados en nanopartículas de albúmina, es necesario realizar una caracterización de estas moléculas. Para esto se prepararon soluciones de tocoferol y de succinato de tocoferol en etanol, las cuales se midieron en un espectrómetro Interspec 200-X FT-IR, haciendo para ello un barrido entre 200 nm y 400 nm con la finalidad de identificar el espectro de absorción y las señales correspondientes a la longitud de onda de máxima de absorción.

Del espectro de absorción de tocoferol (Figura 4), se puede apreciar un máximo de absorción a 290 nm, correspondiente al grupo fenol¹³.

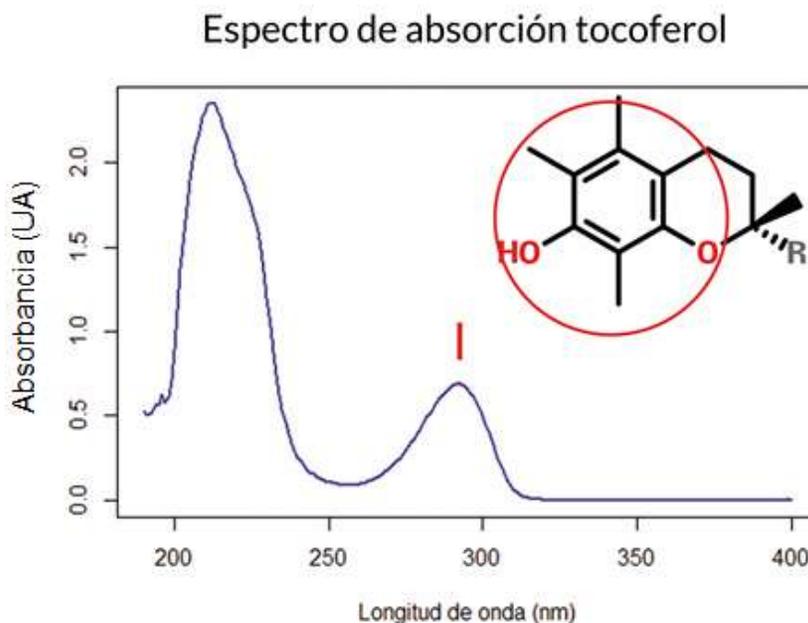


Figura 4: Espectros de absorción de tocoferol medido entre 200 nm y 400 nm

¹³ Iva MATIJEVIĆ, Sandra BISCHOF, Ana SUTLOVIĆ & Tanja PUŠIĆ. DETERMINATION OF α -TOCOPHEROL IN COSMETOTEXTILES – UV/VIS SPECTROPHOTOMETRIC METHOD. University of Zagreb Faculty of Textile Technology, Prilaz baruna Filipovića 28 a, Zagreb, Croatia .

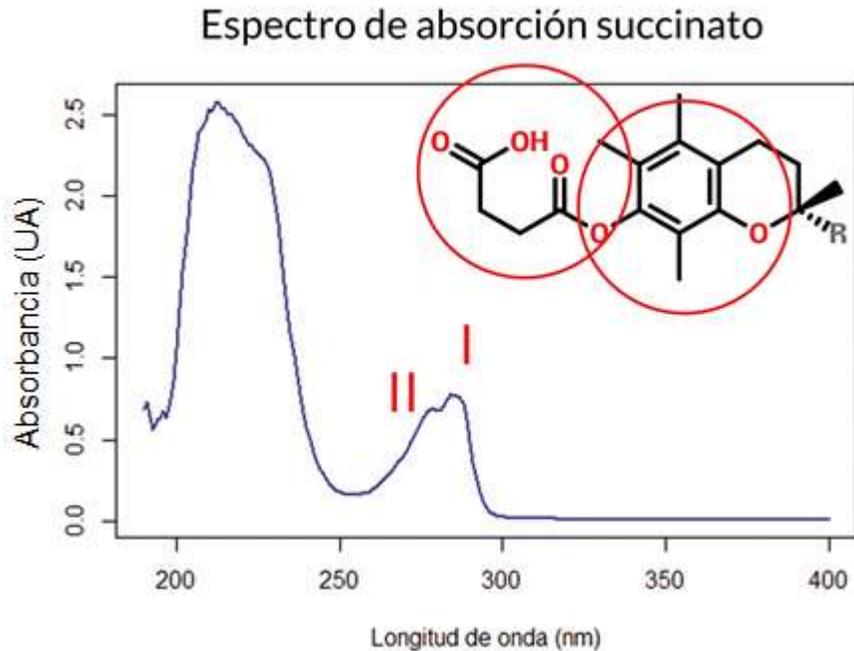


Figura 5: Espectro de absorción de succinato de tocoferol medido entre 200 nm y 400 nm.

Por otra parte, del espectro de absorción de la compuesto succinato de tocoferol (Figura 5), se puede apreciar que existen dos máximos a 278 nm y a 285 nm. La primera señal corresponde al ácido del grupo succinato unido al oxígeno correspondiente al fenol, y la segunda, al grupo fenol, que, a diferencia del tocoferol, se encuentra sustituido. Ambas señales están superpuestas debido a la resonancia que existe entre el grupo ácido de la molécula de succinato y el anillo aromático, y dada la cercanía entre ambos.

Dados estos resultados, se decide seleccionar la longitud de onda de 290 nm para la determinación de tocoferol y 278 nm para el succinato. Si bien esta señal correspondiente al succinato, no es la de mayor intensidad, si es la que se encuentra más alejada de la longitud de onda del tocoferol, por lo cual hace más fácil su diferenciación.

Posteriormente, se realizan curvas de calibración para ambos compuestos. Los medios utilizados fueron etanol, agua y una mezcla 2:1 de etanol: agua.

La curva de calibración del tocoferol en etanol se representa en la Figura 6.

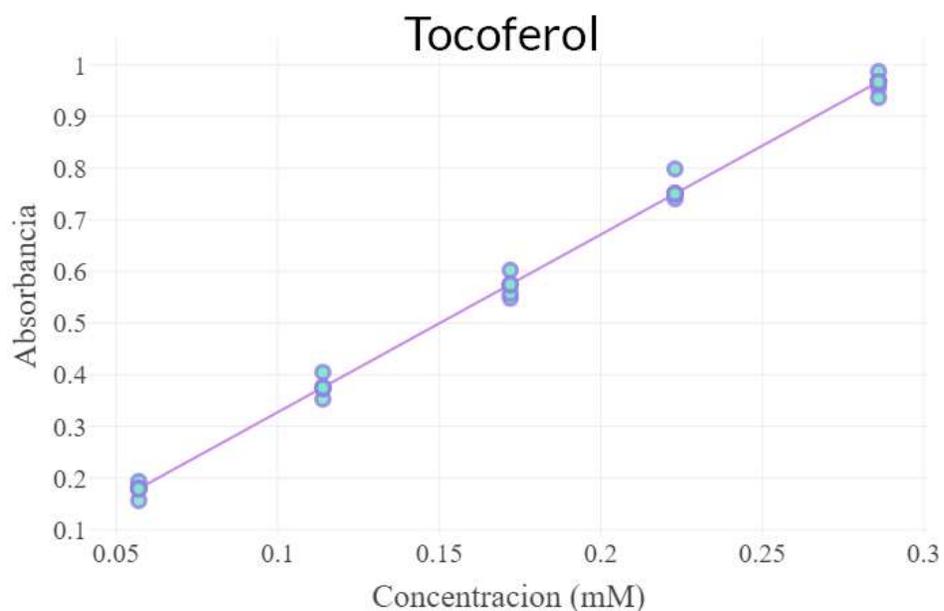


Figura 6: Curva de calibración para el tocoferol en etanol como solvente.

Tabla 1: Regresión lineal para tocoferol en etanol

| Análisis de regresión: Abs vs. Concentración | | | | |
|---|----------------|-------------------------|---------------------|---------|
| Resumen del modelo | | | | |
| S | R ² | R ² ajustado | R ² pred | |
| 0,0243727 | 99,33% | 99,28% | 99,12% | |
| Coeficientes | | | | |
| Término | Valor del coef | EE del coef | Valor T | Valor P |
| Intercepto | -0,0170 | 0,0148 | -1,15 | 0,270 |
| Pendiente | 3,4409 | 0,0785 | 43,86 | 0,000 |
| Ecuación | | | | |
| Abs = -0,0170 + 3,4409 Concentración (mM) | | | | |

Según los resultados obtenidos (Tabla 1), se aprecia un ajuste lineal con un valor de R^2 del 99%.

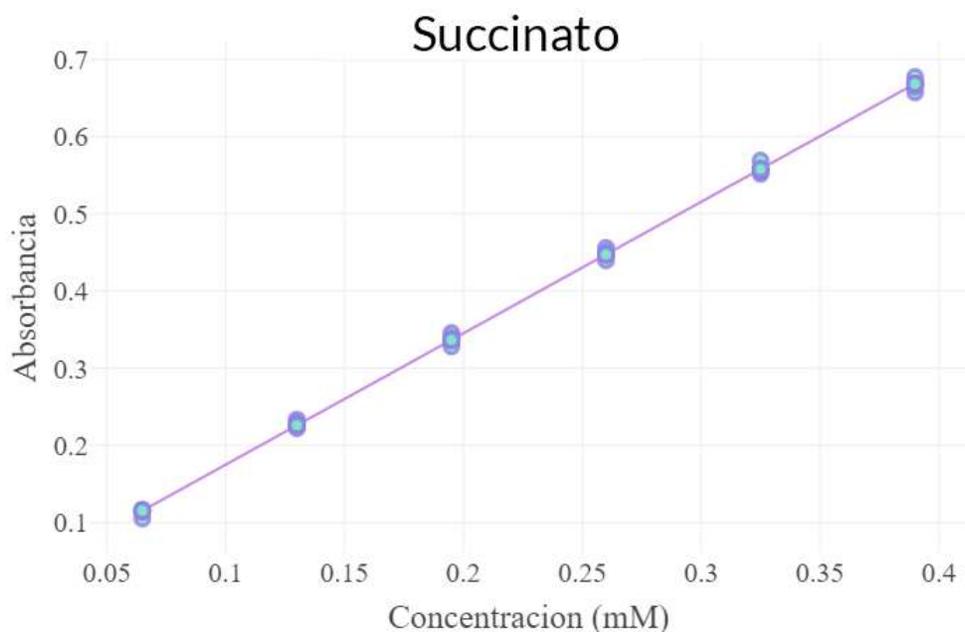


Figura 7: Curva de calibración para el succinato de tocoferol en etanol

Tabla 2: Regresión lineal para curva de calibración de succinato de tocoferol en etanol.

Análisis de regresión: Abs vs. Concentración

Resumen del modelo

| S | R ² | R ² ajustado | R ² pred |
|-----------|----------------|-------------------------|---------------------|
| 0,0074445 | 99,86% | 99,85% | 99,82% |

Coefficientes

| Término | Valor del coef | EE del coef | Valor T | Valor P |
|------------|----------------|-------------|---------|---------|
| Intercepto | 0,00456 | 0,00400 | 1,14 | 0,271 |
| Pendiente | 1,7024 | 0,0158 | 107,70 | 0,000 |

Ecuación

Abs_{278nm} = 0,00456 + 1,7024 Concentración (mM)

La Figura 7 muestra los valores obtenidos de la curva de calibración del succinato de tocoferol en etanol, observándose un ajuste lineal con un R^2 del 99%. Al comparar las pendientes de las

curvas obtenidas, se aprecia que el tocoferol tiene una mayor sensibilidad (3,4409 [UA/mM] para el tocoferol y 1,702 [UA/mM] para el succinato).

La Figura 8 y Figura 9 muestran las curvas de calibración para el tocoferol y el succinato de tocoferol en solución tampón pH 8,8.

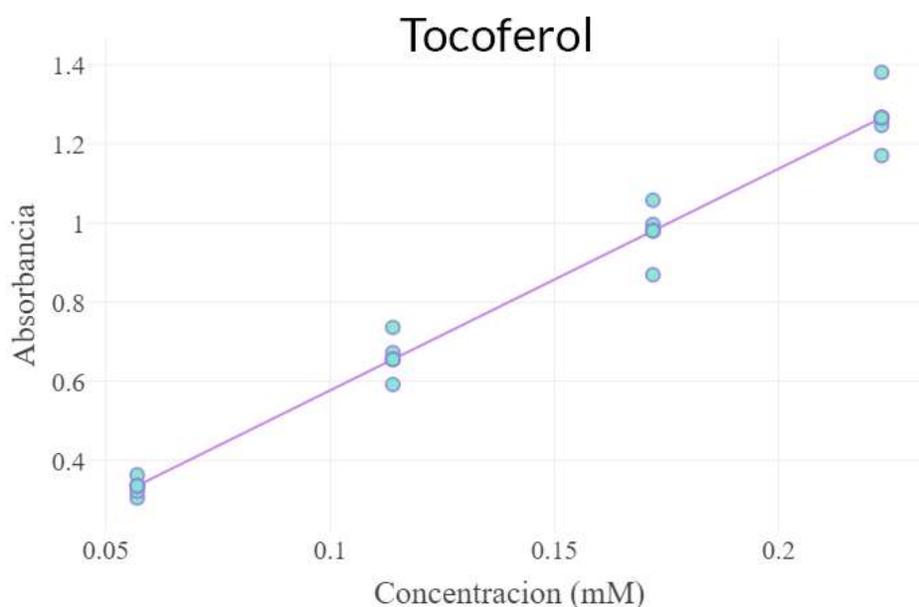


Figura 8: Curva de calibración para tocoferol en solución tampón pH 8,8

Tabla 3: Regresión lineal para curva de calibración de tocoferol en solución tampón pH 8,8.

| Análisis de regresión: Abs vs. Concentración | | | | |
|---|----------------|-------------------------|---------------------|---------|
| Resumen del modelo | | | | |
| S | R ² | R ² ajustado | R ² pred | |
| 0,0733625 | 96,44% | 96,08% | 94,88% | |
| Coefficientes | | | | |
| Término | Valor del coef | EE del coef | Valor T | Valor P |
| Intercepto | 0,0169 | 0,0526 | 0,32 | 0,754 |
| Pendiente | 5,603 | 0,341 | 16,45 | 0,000 |
| Ecuación | | | | |
| Abs = 0,0169 + 5,603 Concentración (mM) | | | | |

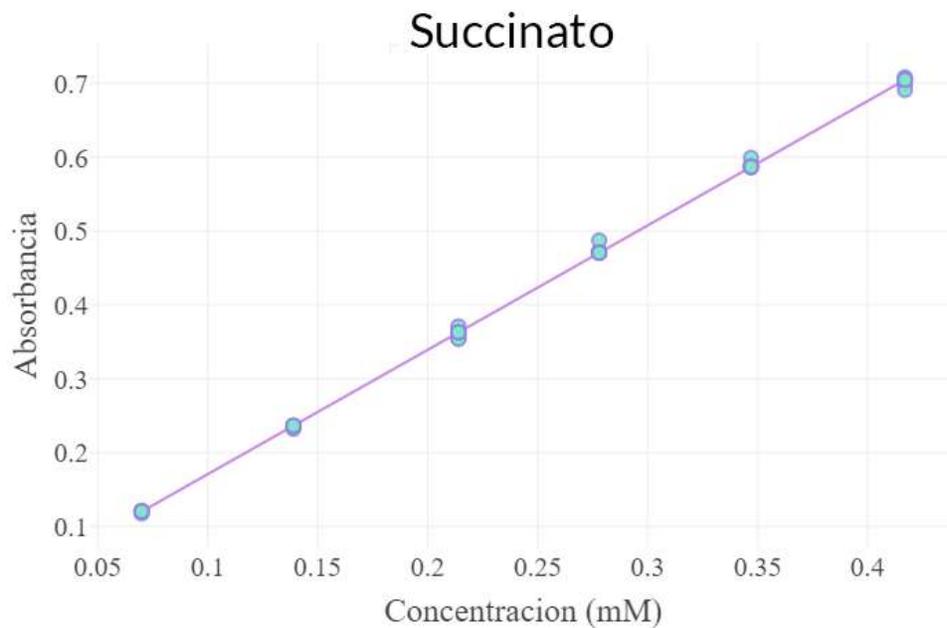


Figura 9: Curva de calibración para succinato de tocoferol con solución tampón pH 8,8

Tabla 4: Regresión lineal para curva de calibración de succinato de tocoferol en solución tampón pH 8,8.

| Análisis de regresión: Abs vs. Concentración | | | | |
|--|----------------|-------------------------|---------------------|---------|
| Resumen del modelo | | | | |
| S | R ² | R ² ajustado | R ² pred | |
| 0,0075841 | 99,87% | 99,86% | 99,84% | |
| Coefficientes | | | | |
| Término | Valor del coef | EE del coef | Valor T | Valor P |
| Intercepto | 0,00247 | 0,00410 | 0,60 | 0,555 |
| Pendiente | 1,6840 | 1,6840 | 111,40 | 0,000 |
| Ecuación | | | | |
| Abs_278nm = 0,00247 + 1,6840 Concentración (mM) | | | | |

Al analizar los resultados obtenidos, se observa que para el tocoferol (Tabla 3), el valor de R^2 es de un 96% con una pendiente de 5,603 [UA/mM]. En cuanto al succinato de tocoferol (Tabla 4)

se observa un valor de R^2 de 99% y una pendiente de 1,6840 [UA/mM], muy similar al valor obtenido en la calibración en etanol (Tabla 2).

Ambas curvas (valores de la Tabla 3 y Tabla 4), presentan una adecuada correlación lineal R^2 (96% para el tocoferol y 99% para el succinato de tocoferol), sin embargo, al igual que en etanol, la sensibilidad de la curva es mayor para el tocoferol (valor de 15,603 [UA/mM]) que para el succinato de tocoferol (valor de 1,6840 [UA/mM]).

Por último, en el Figura 10 se presentan los resultados obtenidos de las curvas de calibración de ambos compuestos en una solución 2:1 de etanol: agua como medio de disolución.

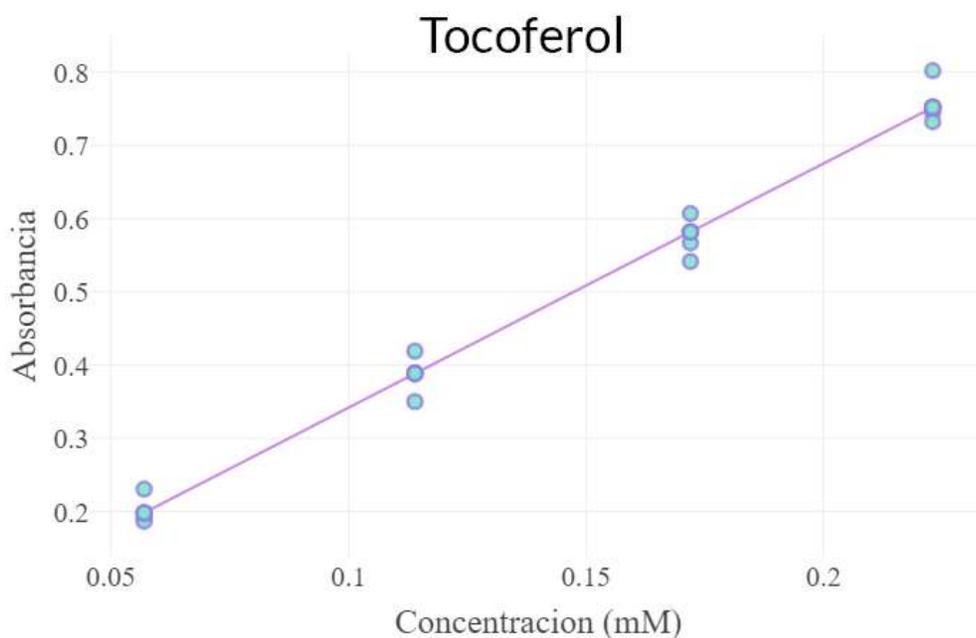


Figura 10: Curva de calibración para tocoferol en una solución 2:1 de etanol:agua como medio de disolución.

Tabla 5: Regresión lineal para curva de calibración de tocoferol en una mezcla 2:1 de etanol:agua.

| Análisis de regresión: Abs vs. Concentración | | | | |
|---|----------------|-------------------------|---------------------|---------|
| Resumen del modelo | | | | |
| S | R ² | R ² ajustado | R ² pred | |
| 0,0300769 | 98,28% | 98,11% | 97,51% | |
| Coeficientes | | | | |
| Término | Valor del coef | EE del coef | Valor T | Valor P |
| Intercepto | 0,0082 | 0,0216 | 0,38 | 0,711 |
| Pendiente | 3,335 | 0,140 | 23,89 | 0,000 |
| Ecuación | | | | |
| Abs = 0,0082 + 3,335 Concentración (mM) | | | | |

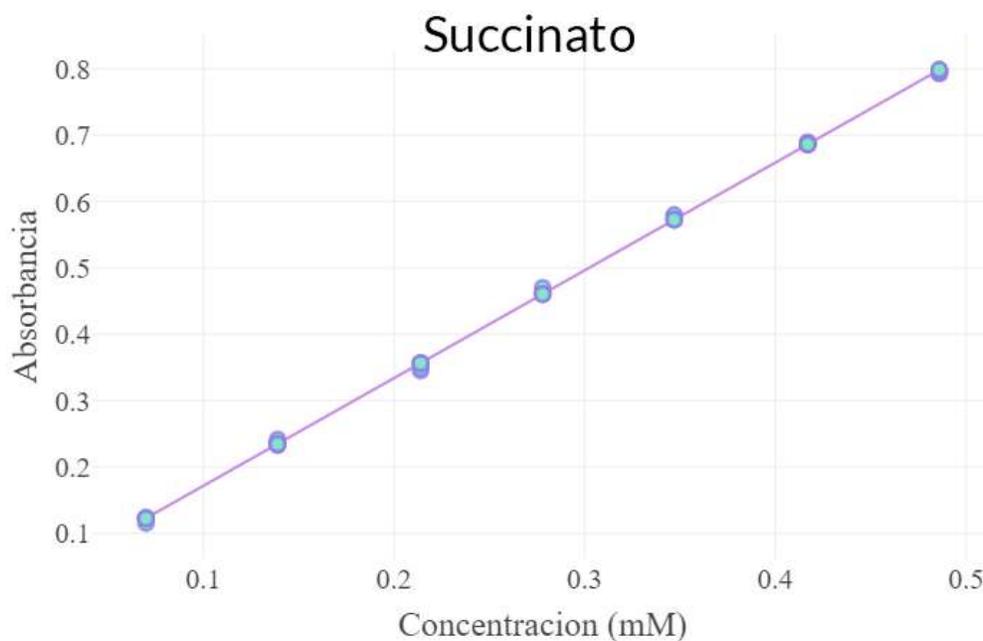


Figura 11: Curva de calibración para succinato en una solución 2:1 de etanol:agua como solvente

Tabla 6: Regresión lineal para curva de calibración de succinato de tocoferol en solución 2:1 de etanol:agua.

| Análisis de regresión: Abs vs. Concentración | | | | |
|---|----------------|-------------------------|---------------------|---------|
| Resumen del modelo | | | | |
| S | R ² | R ² ajustado | R ² pred | |
| 0,0055841 | 99,94% | 99,94% | 99,93% | |
| Coefficientes | | | | |
| Término | Valor del coef | EE del coef | Valor T | Valor P |
| Intercepto | 0,00861 | 0,00274 | 3,14 | 0,005 |
| Pendiente | 1,62517 | 0,00881 | 184,54 | 0,000 |
| Ecuación | | | | |
| Abs_{278nm} = 0,00861 + 1,62517 Concentración (mM) | | | | |

Por último, ambas curvas obtenidas en mezcla etanol:agua, Tabla 5 y Tabla 6, presentan una adecuada correlación lineal R^2 muy cercanos a l 99%. En cuanto a la sensibilidad de la curva es mayor para el tocoferol (valor de 15,603 [UA/mM]) que el succinato de tocoferol (valor de 1,6840 [UA/mM]).

De los resultados mostrados en las tablas anteriores, se puede evidenciar que todos los modelos de regresión presentan valores-p menores a 0,05, rechazándose la hipótesis nula, indicando que tanto la pendiente como el intercepto no tienen un efecto significativo sobre los resultados, es decir, estos factores si tienen un efecto significativo sobre este modelo de regresión.

En la mayoría de las curvas realizadas, el modelo de regresión presenta un valor de R^2 cercanos al 98%, y un R^2 de 96% en un caso particular (Tabla 3). Esto significa que cada modelo es capaz de ajustarse al menos en un 96% de la variabilidad de los resultados.

b) Cromatografía líquida de alta eficiencia.

Para la detección y cuantificación de los compuestos en estudio, se utilizó una metodología de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), usando para ello un equipo HPLC Agilent serie 1100, con detector de arreglo de diodos (DAD).

El método HPLC utilizado se basó en método desarrollo por Nada y col.¹⁴, el cual fue optimizado en nuestro laboratorio. Las condiciones cromatográficas en las cuales se obtuvieron una adecuada determinación de los compuestos fueron:

- Fase móvil de 100% metanol.
- Flujo de 1,5 mL/min.
- Volumen de 50 µL de inyección.
- Longitud de onda de 290 nm para detectar Tocoferol y una de 278 nm para succinato de tocoferol.
- Columna Purospher®STAR RP-18 ENCAPPED (5µm, 250-4.6mm).

En cuanto a la velocidad de elución, se eligió una velocidad de 1,5mL/minuto para así obtener tiempos de retención pequeños para cada compuesto.

Los cromatogramas obtenidos con este método se presentan a continuación:

¹⁴Nada A, Krishnaiah Y, Zaghloul A, Khattab I. Analysis of vitamin E in comercial cosmetic preparations by HPLC. J. Cosmet. Sci., 2010; 61: 353–365 hplc

Cromatograma Tocoferol

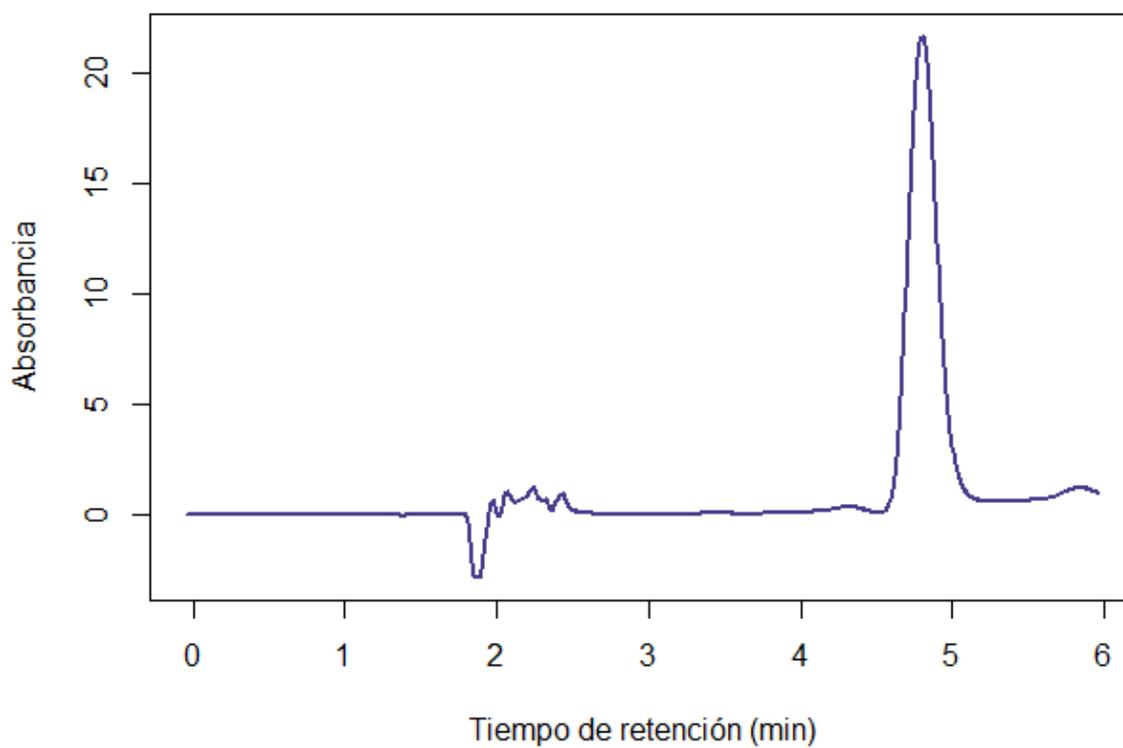


Figura 12: *Cromatograma de tocoferol.*

En el cromatograma obtenido para el tocoferol, 12, se aprecia claramente una señal aguda a los 4,8 min, la cual corresponde al compuesto en estudio.

Cromatograma Succinato

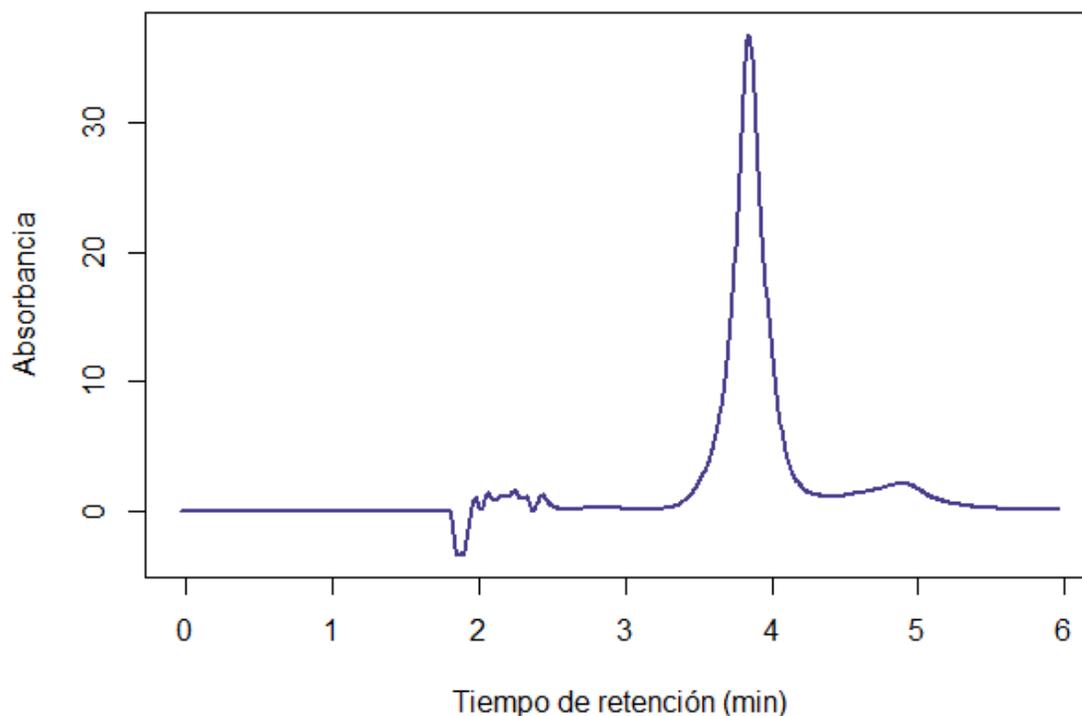


Figura 13: *Cromatograma de Succinato de tocoferol.*

En cuanto al compuesto succinato de tocoferol (Figura 13) se aprecia que la señal eluye a los 3,9 minutos. Este compuesto eluye a un menor tiempo que el tocoferol, debido a su mayor polaridad.

Análisis de la eficiencia cromatográfica

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se realizó una serie de análisis para determinar distintos parámetros relacionados a las resolución y selectividad de las señales cromatográficas¹⁵.

¹⁵ Guillermo Esteban Montero Leal. Desarrollo de una metodología cromatográfica HPLC para la determinación de las isoflavonas en sistemas de interés farmacéutico, evaluación de la estabilidad y eficiencia antioxidante.

Para ello, una vez determinados los tiempos de retención de los compuestos, se calculó el factor de retención, factor de selectividad y la resolución, resultados que se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7: Resultados de análisis de la eficiencia cromatográfica.

| Compuesto | Tiempo de retención (min) | Factor de retención (K) | Factor de selectividad (α) | Resolución |
|------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------------|------------|
| Tocoferol | 4,80 | 1,18 | - | - |
| Succinato de tocoferol | 3,85 | 0,75 | 1,58 | 1,62 |

Dado que los tiempos de retención del succinato de tocoferol y del tocoferol fueron 3,85 min y 4,80 min respectivamente, y que el tiempo muerto fue de 2,20 min, los tiempos de retención relativos de los compuestos correspondientes a la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto fueron de 1,65 min y 2,60 min, respectivamente.

El factor de retención (K') se refiere a las velocidades de migración de los solutos en las columnas, y depende tanto del tiempo de retención, como del tiempo muerto obtenido en el cromatograma. Se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$K' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0}$$

donde t_r corresponde al tiempo de retención y t_0 al tiempo muerto.

Los valores ideales esperados para el factor de retención se encuentran entre 2 y 10. Sin embargo, en el método aplicado, el factor calculado para el succinato de tocoferol y para el tocoferol fueron de 0,75 y 1,18, respectivamente. Aunque estos valores son menores a los esperados, del análisis del cromatograma se desprende que con esta metodología obtenemos señales cromatográficas apropiadas en un tiempo de análisis relativamente bajo (menor a los 6 minutos).

Por su parte, el factor de selectividad (α), relaciona la selectividad de acuerdo al orden de elución de los compuestos, es decir, de acuerdo a los tiempos de retención entre un compuesto y el otro compuesto anterior en el cromatograma, indicando si hay una adecuada separación entre picos adyacentes. Se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{t_{rB} - t_0}{t_{rA} - t_0} = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}} = \frac{K'B}{K'A}$$

donde t_{rA} es el tiempo de retención de un compuesto A, t_{rB} el tiempo de retención de un compuesto B, t'_{rA} el tiempo de retención corregido de A, t'_{rB} el tiempo de retención corregido de B y t_0 el tiempo muerto.

El factor de selectividad debe ser mayor a 1, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este análisis cromatográfico (1,58).

La resolución (R_s) corresponde al factor que permite evaluar si existe una buena separación entre dos compuestos adyacentes. Un valor superior a 1,5 da cuenta de una separación óptima entre los compuestos. Se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$R_s = 2(t_{rB} - t_{rA}) / (WA + WB)$$

donde WA corresponde al ancho de la base del pico del compuesto A, WB al ancho de la base del pico del compuesto B.

La resolución entre tocoferol y succinato de tocoferol es de 1,62, lo cual indica la adecuada separación de los compuestos.

Linealidad

La linealidad fue evaluada realizando curvas de calibración para los dos compuestos en estudio ellos, de seis puntos cada una y en triplicado. Las concentraciones de los puntos medidos en las curvas estuvieron en un rango de concentración entre 0,001 mM y 0,1 mM (430,71 $\mu\text{g/L}$ y 43071

$\mu\text{g/L}$) para el tocoferol, y entre 0,001 mM y 0,3 mM (530,76 $\mu\text{g/L}$ y 159228 $\mu\text{g/L}$) para el succinato de tocoferol.

La Figura 14, muestra los resultados obtenidos de la curva de calibración para el método de HPLC del tocoferol.

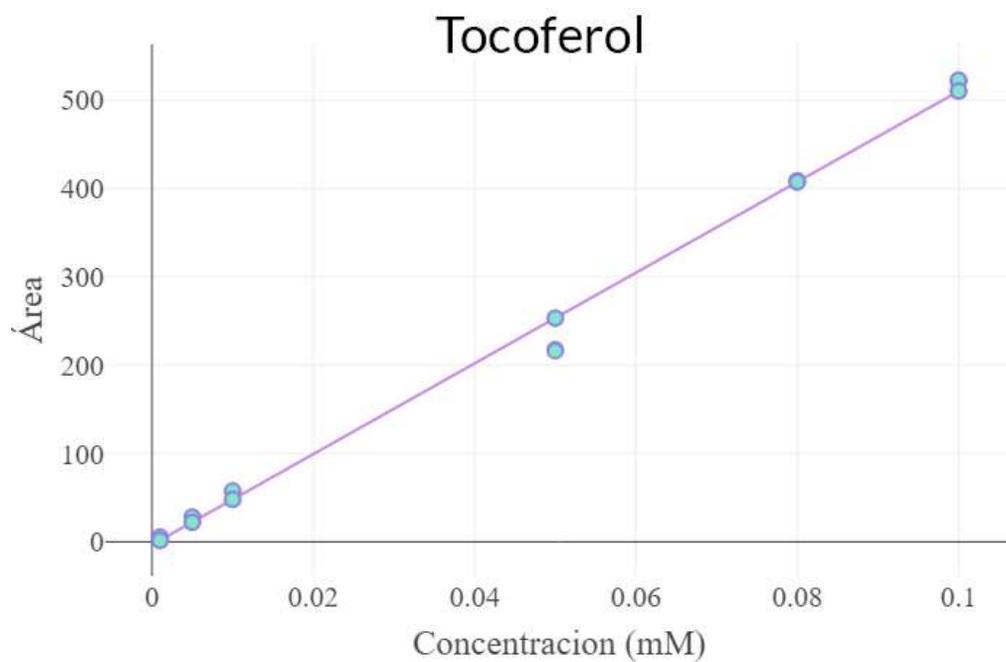


Figura 14: Curva de calibración de Tocoferol en etanol

Tabla 8: Regresión lineal para curva de calibración de tocoferol por HPLC.

| Análisis de regresión: Abs vs. Concentración | | | | |
|---|----------------|-------------------------|---------------------|---------|
| Resumen del modelo | | | | |
| S | R ² | R ² ajustado | R ² pred | |
| 17,0685 | 99,38% | 99,34% | 99,28% | |
| Coeficientes | | | | |
| Término | Valor del coef | EE del coef | Valor T | Valor P |
| Intercepto | -3,56 | 5,84 | -0,61 | 0,550 |
| Pendiente | 5136,5 | 98,4 | 52,23 | 0,000 |
| Ecuación | | | | |
| Área = -3,56 + 5136,5 Concentración (mM) | | | | |

Se aprecia un ajuste lineal con un R^2 de 99%, lo que implica que el modelo de regresión explica un 99% de la variabilidad obtenida. Además, se puede apreciar que el valor-p del coeficiente es menor a 0,05 lo que significa que el coeficiente si tiene un efecto significativo dentro del modelo, validando así el modelo de regresión lineal obtenido.

De igual manera se presentan los resultados obtenidos de la calibración de succinato de tocoferol por el método de HPLC (*Error! No se encuentra el origen de la referencia.* 14).

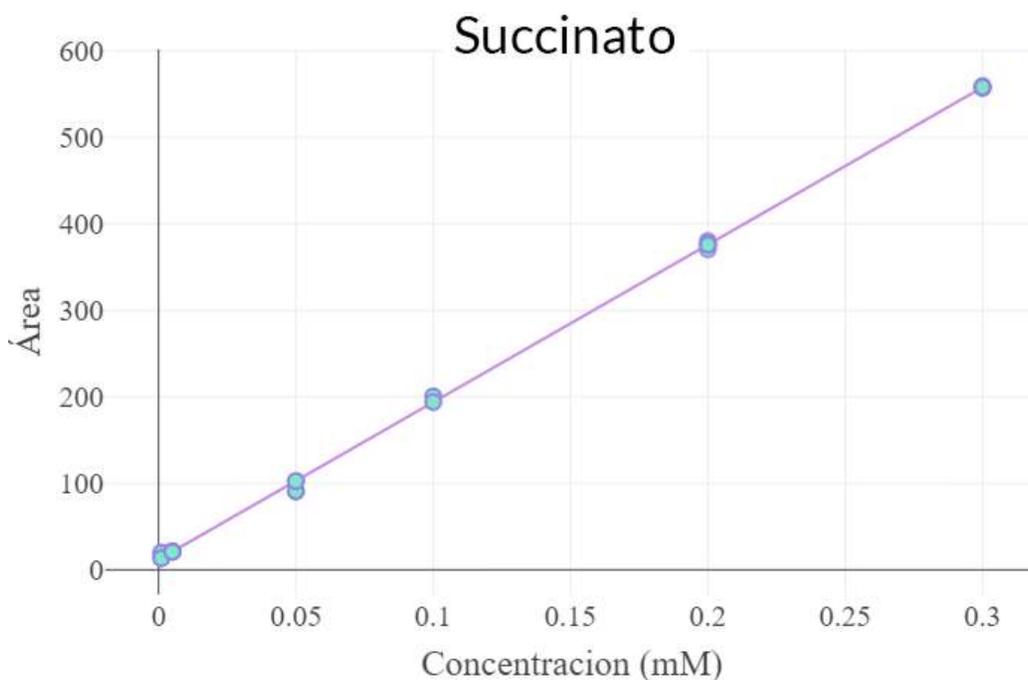


Figura 14: Curva de calibración para Succinato de tocoferol en etanol.

Tabla 9: Regresión lineal para curva de calibración de succinato de tocoferol para HPLC.

| Análisis de regresión: Abs vs. Concentración | | | | |
|---|----------------|-------------------------|---------------------|---------|
| Resumen del modelo | | | | |
| S | R ² | R ² ajustado | R ² pred | |
| 6,87243 | 99,90% | 99,89% | 99,88% | |
| Coeficientes | | | | |
| Término | Valor del Coef | EE del coef | Valor T | Valor P |
| Intercepto | 11,70 | 2,34 | 5,01 | 0,000 |
| Pendiente | 1820,6 | 14,9 | 122,07 | 0,000 |
| Ecuación | | | | |
| Área = 11,70 + 1820,6 Concentración (mM) | | | | |

Al igual que en los resultados obtenidos para el tocoferol (Tabla 8), se aprecia un R^2 de 99%, implicando que para modelo de regresión explica un 99% de la variabilidad obtenida, y un valor-p del coeficiente menor a 0,05 lo que significa que, el coeficiente tiene un efecto significativo dentro del modelo, lo cual valida el modelo obtenido.

- Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) fueron calculados a partir de la medición de la altura del pico cromatográfico de soluciones diluidas de concentración conocida de cada compuesto. LD se refiere a la mínima concentración que entrega la señal del cromatograma que es tres veces mayor que la señal de ruido base. LC es la menor cantidad de analito que puede ser cuantitativamente determinada y corresponde a diez veces la proporción entre la señal cuantificada y la señal de ruido base.

Tabla 10: Límites de detección y cuantificación.

| Compuesto | Límite de detección | Límite de cuantificación |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Tocoferol | $2,95 \times 10^{-5}$ mM | $9,65 \times 10^{-5}$ mM |
| Succinato de tocoferol | $8,82 \times 10^{-5}$ mM | $2,94 \times 10^{-4}$ mM |

- Precisión

La precisión del método indica el grado de dispersión en una serie de mediciones de una misma muestra. Se evaluó la precisión para cada uno de los compuestos estudiados, para lo cual se prepararon estándares disueltas en etanol y luego de esto, se realizaron 3 soluciones de 0,05 mM para cada compuesto. Cada solución fue originada a partir de 3 pesajes diferentes y cada muestra fue medida en triplicado.

Los resultados obtenidos, expresados en coeficiente de variación, están resumidos en la siguiente tabla.

Tabla 11: Resultados de análisis de repetitibilidad del método HPLC expresados en coeficiente de variación

| Compuesto | Tiempo de retención | Área |
|------------------------|---------------------|--------|
| Tocoferol | 0,03 % | 1,34 % |
| Succinato de tocoferol | 0,06 % | 3,62 % |

2. Desarrollo de NPs-BSA para la encapsulación de tocoferol y succinato de tocoferol.

a) Diseño experimental

Tal como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos de este trabajo fue realizar previo a la fabricación de NPs, un diseño experimental que permitiese un análisis adecuado del efecto de cada factor experimental involucrado en la obtención de nanopartículas de BSA que fueran de una distribución de tamaño estrecho y una alta eficiencia de carga de vitamina E y/o su derivado. Para esto se seleccionó un diseño factorial de 3 elementos: 1. la cantidad de BSA agregada medida en mg, 2. la concentración de la solución de Tocoferol que será agregada medida en mg/mL, y, por último, 3. la cantidad de la solución de tocoferol en etanol agregada medida en mL.

El primer factor fue medido en 5 niveles: 10 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg y 100 mg de BSA. El segundo fue medido en 3 niveles: 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL de concentración de tocoferol. Por último, el tercer factor también fue medido en 3 niveles, 2,5 mL, 3 mL y 4 mL de etanol. Los rangos de estos niveles fueron definidos con el fin de abarcar todas las cantidades y concentraciones deseadas.

A partir de esto, el modelo esperado es el siguiente:¹⁶

¹⁶ Ref. Kuehl, R.O. (), Diseño de experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2ed. Thomson Learning

$$y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

- μ : Media general.
- τ : Efecto del tratamiento A.
- β : Efecto del tratamiento B.
- γ : Efecto del tratamiento C.
- $\tau\beta$: Interacción del efecto A y B.
- $\tau\gamma$: Interacción del efecto A y C.
- $\beta\gamma$: Interacción del efecto B y C.
- $\tau\beta\gamma$: Interacción triple.
- ε : Error.

b) Preparación de NPs

Las nanopartículas de albumina de suero bovino (NPs-BSA) cargadas con tocoferol fueron obtenidas con éxito mediante la técnica de desolvatación. Varios trabajos autores^{17,18,19} han utilizado con frecuencia alcoholes -especialmente etanol- como agentes disolventes para obtener NPs-BSA con una distribución de tamaño adecuado para el suministro de medicamentos.

Para este trabajo, el compuesto en estudio (tocoferol) fue solubilizado en etanol. La adición de este compuesto fue realizada en pequeños volúmenes de esta solución (gotas de un volumen aproximado de 0,05 mL) sobre la solución acuosa de albúmina, lo que produce la formación de una dispersión coloidal de NPs, a las cuales luego se les adiciona una cantidad determinada de

¹⁷ . Richinandan Maiti, Saptarshi Panigrahi, Yin Tingjie, Huo Meirong. Bovine Serum Albumin Nanoparticles constructing procedures on Anticancer Activities.

¹⁸ ES Bronze-Uhle, BC Costa, VF Ximenes, and PN Lisboa-Filho. Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid

¹⁹ Mohamad Tarhini, Ihsane Benlyamani, Selim Hamdani, Géraldine Agusti, atem Fessi, Hélène Greige-Gerges, Abderrazzak Bentaher and Abdelhamid Elaissari. Protein-Based Nanoparticle Preparation via Nanoprecipitation Method

solución de glutaraldehído como agente reticulante, dejándose posteriormente el sistema en agitación por 24 horas.

En la Figura 15, se presenta un esquema para la formación de NPs de BSA cargada con tocoferol (Figura 15).

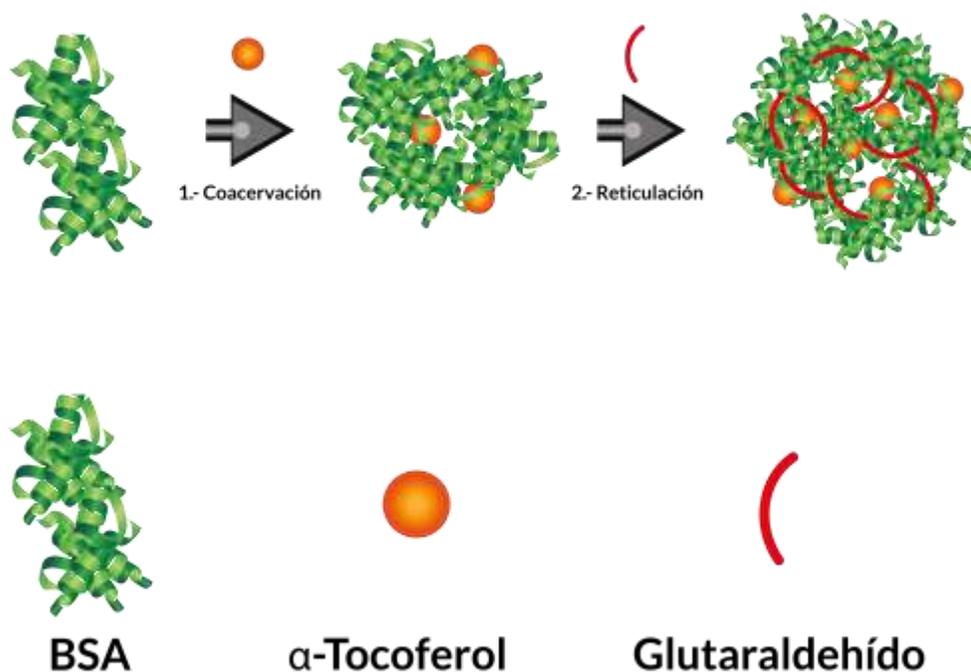


Figura 15: Esquema del método de preparación

Previo al procedimiento de desolvatación se identificó el pH de la solución en que se solubiliza la BSA como uno de los principales factores que afectaría el tamaño de las NPs. A valores altos de pH se obtienen nanopartículas más pequeñas²⁰. Teniendo en cuenta esto, se utilizó una solución ajustada pH 8,8 para la disolución de la BSA²¹.

En cuanto al anti-solvente, estudios anteriores discuten la influencia de alcoholes como el etanol, el alcohol propílico y el alcohol isopropílico como agentes desolvatantes para la

²⁰ Langer K, Balthasar S, Vogel V. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles.

²¹ Francisco Arriagada, Germán Günther, Irene Zabala, Jorge Rubio-Retama, and Javier Morales. Development and Characterization of Florfenicol-Loaded BSA Nanoparticles as Controlled Release Carrier.

formación de nanopartículas de BSA. Los resultados muestran que el alcohol propílico y el alcohol isopropílico tenían una capacidad de coacervación más fuerte para producir nanopartículas con tamaños más grandes y rendimientos más altos. En cambio, sería más fácil controlar el tamaño de las nanopartículas producidas con etanol (Figura 16).²²

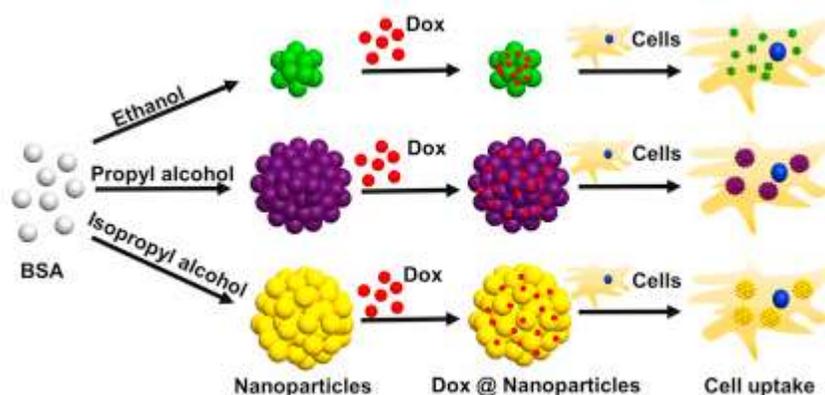


Figura 16: Formación de NPs-BSA utilizando 3 diferentes antisolventes.

A pesar de su conocida carcinogenicidad, el glutaraldehído se ha utilizado tradicionalmente como un agente de reticulación para estabilizar los NPs de albúmina después de la coacervación. La función del glutaraldehído es reducir la extensión de los grupos $-NH_2$ en las superficies de las partículas, lo que afecta la biodegradabilidad y la liberación del fármaco desde las NPs²³.

Este método ha sido ampliamente utilizado para la preparación de NPs-BSA encapsulando diferentes tipos de moléculas y obteniendo diferentes tamaños de partícula y eficiencias de encapsulación. Se han obtenido NPs-BSA cargadas con Ca^{24} , donde los tamaños de partícula más pequeños obtenidos fueron de 260 nm en promedio. En otro estudio, en donde se incorporó Rodamina B a NPs-BSA ²⁵, para el tratamiento de trastornos del oído interno, se

²² SiSuna, Qian-Ru, Xiaob Yang Wang, Yong Jiang. Roles of alcohol desolvating agents on the size control of bovine serum albumin nanoparticles in drug delivery system.

²³ Guilin Wang, Hasan Uludag. Recent developments in nanoparticle-based drug delivery and targeting systems with emphasis on protein-based nanoparticles

²⁴ Ji Yeon, Juna Hoang, Hai Nguyena, Sae-Yeol-Rim, Paika Hyang, Sook Chunb, Byeong-Cheol Kang. Preparation of size-controlled bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by a modified desolvation method

²⁵ Zhan Yu, Min Yu, Zhibao Zhang, Ge Hong, and Qingqing Xiong. Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear

obtuvo un máximo de eficiencia de encapsulación de un 40%, y con tamaños, medidos por DLS, entre 255 nm y 825 nm, con un tamaño promedio de 492 nm.

En este trabajo, las NPs de BSA cargadas con tocoferol fueron preparadas con éxito, pero si bien, este experimento estaba diseñado para ser utilizado con tocoferol únicamente, también se probó con su derivado succinato de tocoferol en algunos niveles, más específico en los extremos de la matriz de diseño. Los resultados mostraron que al agregar solamente 2 mL de etanol no se logró formar nanopartículas. Esto se puede evidenciar de forma visual, ya que una vez que éstas se forman, la solución se vuelve una solución opalescente, debido a que la formación de una solución coloidal. Dado esto, el nivel más bajo para este factor quedó fijado finalmente en 2,5 mL.

Otra de las observaciones a destacar, es que a bajas cantidades de BSA para el compuesto de succinato de tocoferol, una vez que se forma la suspensión de nanopartículas, éstas agregaban luego de transcurrido el tiempo. Sin embargo, esto también fue dependiente del volumen de etanol agregado. A mayor cantidad de etanol, las NPs-BSA parecían estar más dispersas en la solución, dificultándose así su agregación. Debido a esto, solamente a partir de 50 mg de BSA se pudo apreciar una efectiva formación de nanopartículas a todos los niveles de etanol utilizados en el estudio.

A diferencia de lo explicado para el compuesto derivado succinato estos problemas no se presentaron para el tocoferol. Las diferencias respecto a la polaridad y carga que tiene el succinato respecto al tocoferol, explicarían las dificultades expuestas, dado que el succinato cuenta con un sustituyente ácido carboxílico, cuyo protón ácido es mucho más fácil desprenderse de la molécula, lo que produce que se genere una carga que se deslocaliza a través del grupo succinato. Si bien en el grupo OH de la molécula del tocoferol también se desprotona, éste lo hace con menor facilidad y la carga estaría mucho más deslocalizada por el anillo aromático, dado su valor de pKa, esta diferencia de carga hace que interactúe con una mayor facilidad con la molécula de BSA provocando así una interacción iónica entre ambos, haciendo que a bajas cantidades de BSA, la interacción con la molécula de succinato de tocoferol

crea un par iónico y no una nanopartícula, evidenciándose de esta forma agregados suspendidos en la solución. A una mayor proporción de BSA respecto a la cantidad de succinato de tocoferol, se logra formar la suspensión coloidal, debido a que la mayor cantidad de BSA tiene un efecto de dilución de la molécula de succinato favoreciendo la formación de la BSA-NP.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los experimentos realizados.

Determinación de la eficiencia de encapsulación (%EE)

En primer lugar, de forma exploratoria, se realizaron los resultados obtenidos para la eficiencia de encapsulación, en porcentaje, en función de cada factor estudiado en el diseño.

El gráfico a continuación (Figura 17) presenta la distribución de los resultados obtenidos respecto a la cantidad de BSA. El eje X corresponde a las cantidades de BSA agregadas en mg y en el eje Y se representa la E.E. (%) de vitamina E en las NPs de albúmina.

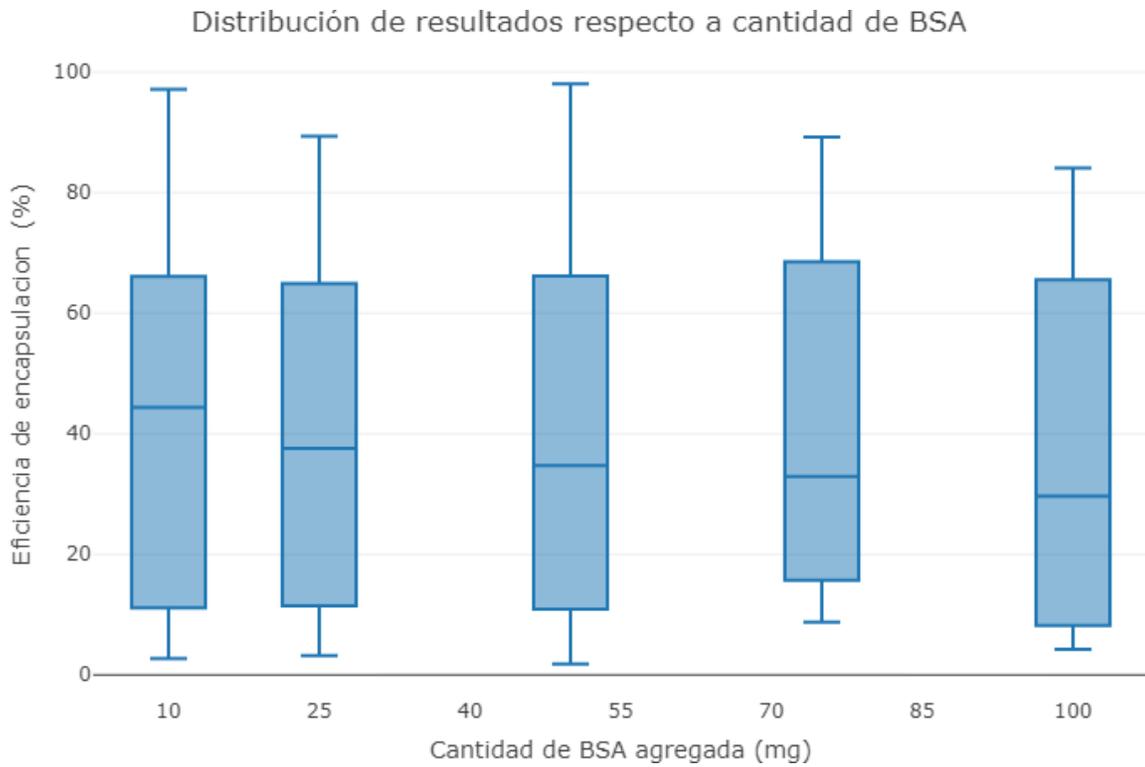


Figura 17: Gráfico de caja de EE% respecto a cantidad de BSA agregada

Se observa que a medida que varía la cantidad de BSA, la eficiencia no cambia de manera significativa, teniendo una eficiencia promedio de un 40% aproximadamente.

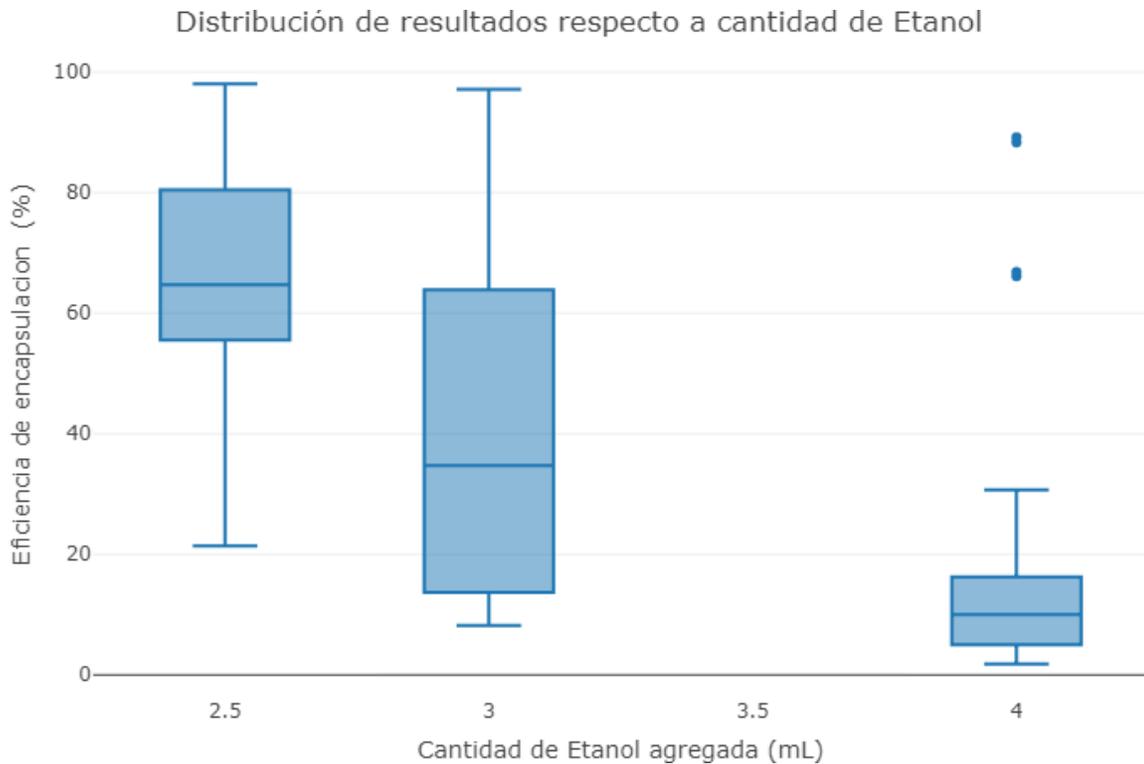


Figura 18: Gráfico de caja de EE% respecto a cantidad de etanol agregada

La Figura 18 muestra los resultados obtenidos para la eficiencia de encapsulación y su distribución en función del volumen de etanol agregado al sistema, expresado en mL. Se observa que, a diferencia del gráfico anterior, existe una relación entre ambas variables, observándose que a medida que aumenta la cantidad de etanol, disminuye la eficiencia de encapsulación. Esto puede explicarse entendiendo que el rol del etanol es solo como antisolvente, luego de agregarse la cantidad necesaria, la BSA coacerva, siendo desplazado el etanol pasando a ser parte del medio de dispersión, dificultando así la incorporación de tocoferol en las moléculas de BSA.

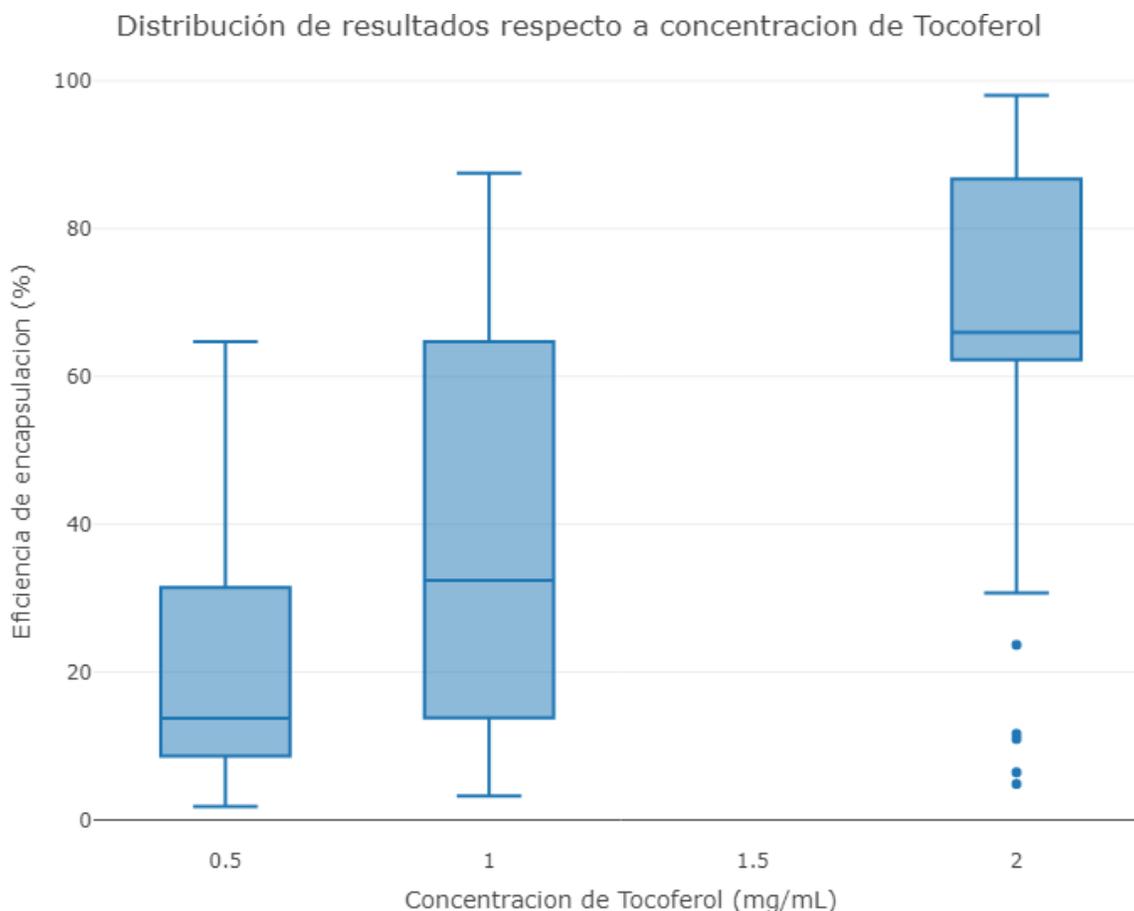


Figura 19: Gráfico de caja de EE% respecto la concentración de Tocoferol agregada

En La Figura 19 se muestra la distribución de los resultados obtenidos para la eficiencia de encapsulación respecto a la concentración de tocoferol agregada expresada en mg/mL. De este gráfico se puede observar una relación inversa a la mostrada en la Figura 18. Esto se explica bajo la misma lógica, entendiendo el rol que cumple el tocoferol en la formación de las nanopartículas. Mientras mayor sea la cantidad de tocoferol, se ve más favorecida la interacción entre la BSA y el tocoferol, provocando así que la EE sea mayor.

En ambas Figuras (18 y 19) se aprecian algunos datos anómalos. Esto se debe a que la formación de la nanopartícula no depende únicamente de estos 3, sino también depende de la velocidad a la que se agrega el antisolvente, entre otros. Esto no se observa en la Figura 17, ya que cada

cantidad de BSA tiene una gran variabilidad en cuanto a la EE, ya que este factor es independiente a la cantidad de BSA, lo que provoca que tenga una menor capacidad de detectar anomalías.

El efecto de un elemento se define como el cambio observado en la variable de respuesta debido a un cambio de nivel de tal factor. En particular, los efectos principales son los cambios en la media de la variable respuesta que se deben a la acción individual de cada factor.

Por otra parte, se dice que dos factores interactúan entre sí o tienen un efecto de interacción sobre la variable respuesta, cuando el efecto de un factor depende del nivel en que se encuentra el otro. Por ejemplo, los factores A y B interactúan si el efecto de A es muy diferente en cada nivel de B, o viceversa. A. Para ver si existe algún tipo de interacción entre la variable Tocoferol y la variable Etanol, se realizó un gráfico de interacciones entre ambas²⁶.

En el siguiente gráfico presenta las interacciones entre la variable “Tocoferol” y la variable “Etanol”.

²⁶ Humberto Gutierrez Pulido, Roman De La Vara Salazar. Analisis y diseño de experimentos.

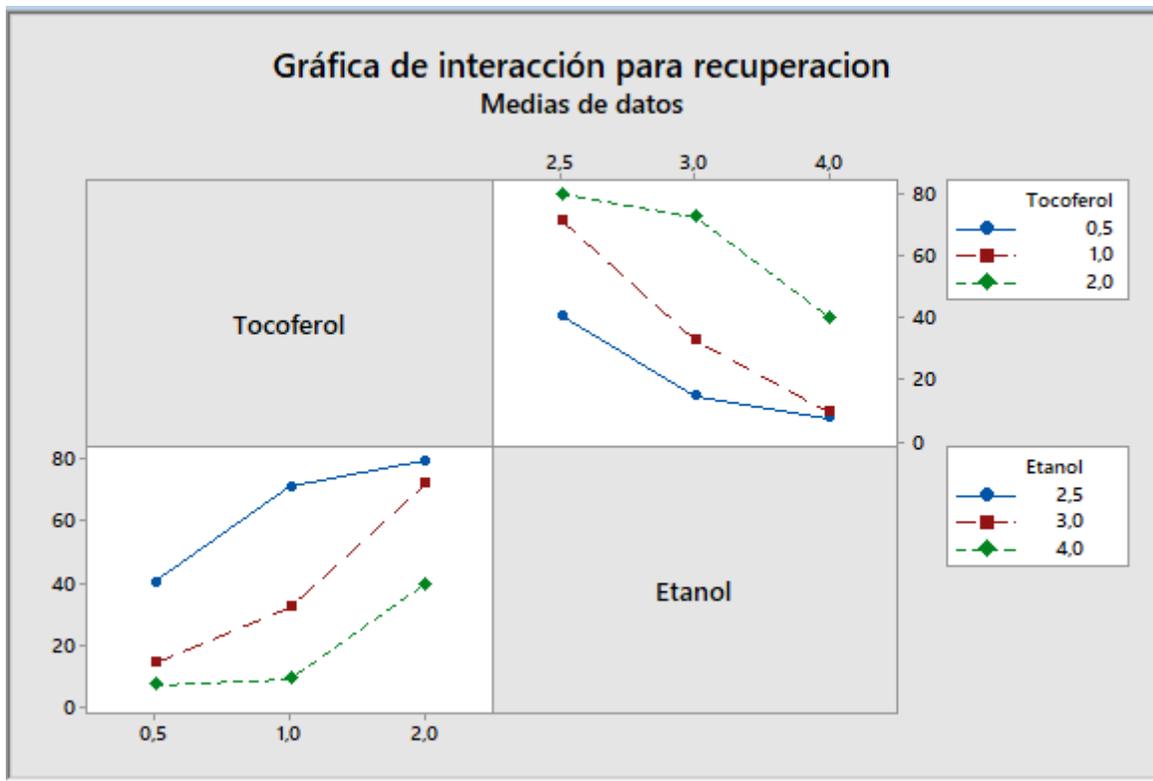


Figura 20: Interacciones para el modelos ANOVA de la recuperación

La Figura 20 presenta las interacciones entre las variables “Tocoferol” y “Etanol”. En el cuadro superior derecho, el eje X corresponde a los valores de la variable “Etanol” y el eje Y a la eficiencia de encapsulación, y cada color representa a un valor de la variable “Tocoferol”. Por otro lado, en el cuadro inferior izquierdo, el eje X corresponde a los valores de la variable “Tocoferol” y cada color representa a un valor de la variable “Etanol”.

Si las curvas obtenidas en alguno de los gráficos se intersectan, indica que son no paralelas, lo que implica que existe interacción entre ellas. Por el contrario, si estas no se intersectan, indica que son paralelas y no existe interacción entre ellas²⁷.

²⁷ Humberto Gutierrez Pulido, Roman De La Vara Salazar. Analisis y diseño de experimentos.

De la Figura 20 se puede concluir que no existe interacción entre las dos variables, esto se debe a que ninguna de las rectas se cruza. Sin embargo, se puede notar que podría existir una eventual intersección entre ambas para valores mayores de Etanol y Tocoferol. Dado que la interacción no fue evidenciada dentro de los parámetros estudiados, se decidió hacer los análisis posteriores sin la interacción entre ambos factores.

El análisis de ANOVA obtenido se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 12: *Tabla anova del modelamiento de Tocoferol y Etanol respecto al EE.*

| Modelo lineal general: recuperación vs. Tocoferol; Etanol | | | | | |
|---|----------------|---------------------------|-----------------------|---------|---------|
| Método | | | | | |
| Información del factor | | | | | |
| Factor | Tipo | Niveles | Valores | | |
| Tocoferol | Fijo | 3 | 0,5 – 1,0 – 2,0 | | |
| Etanol | Fijo | 3 | 2,5 – 3,0 – 4,0 | | |
| Análisis de Varianza | | | | | |
| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor-F | Valor-p |
| Tocoferol | 2 | 28329 | 14164,3 | 53,40 | 0,000 |
| Etanol | 2 | 30162 | 15080,9 | 56086 | 0,000 |
| Error | 85 | 22546 | 265,2 | | |
| Total | 89 | 81037 | | | |
| Resumen del modelo | | | | | |
| S | R ² | R ² (Ajustado) | R ² (Pred) | | |
| 16,2865 | 72,18% | 70,87% | 68,81% | | |
| Coeficientes | | | | | |
| Termino | Valor del Coef | EE del Coef | Valor-T | Valor-p | |
| Constante | 43,72 | 3,84 | 11,39 | 0,000 | |
| Tocoferol | | | | | |
| 1,0 | 16,90 | 4,21 | 4,02 | 0,000 | |
| 2,0 | 43,12 | 4,21 | 10,25 | 0,000 | |
| Etanol | | | | | |
| 3,0 | -24,12 | 4,21 | -5,74 | 0,000 | |
| 4,0 | -44,80 | 4,21 | -10,65 | 0,000 | |
| Ecuación | | | | | |
| Recuperación = 43,72 + 0,0 Tocoferol_0,5 + 16,90 Tocoferol_1,0 + 43,12 Tocoferol_2,0 + 0,0 Etanol_2,5 - 24,12 Etanol_3,0 - 44,80 Etanol_4,0 | | | | | |

En la Tabla 12 se muestra en primer lugar información sobre el modelo aplicado, factores utilizados, el tipo de factor, la cantidad de niveles y los valores de éstos. En este caso, Tocoferol como factor fijo con 3 niveles los cuales representan las 3 concentraciones distintas utilizadas en el experimento, y Etanol como factor fijo con 3 niveles, los cuales representan las 3 cantidades distintas de etanol utilizadas.

A continuación, se presenta una tabla ANOVA convencional (Tabla 13), que muestra los grados de libertad, la suma de cuadrados, la suma de cuadrados medios, un valor de un estadístico F y un valor-p de cada factor, los cuales muestran su alta significancia estadística.

También se obtuvo un resumen del modelo lo cual da cuenta de la calidad que tiene el modelo para ajustar a los datos obtenidos, presentando un valor de R^2 de 72,18%

Finalmente, se entrega el modelo obtenido de predicción obtenido con su respectiva tabla coeficientes para cada nivel de cada factor en estudio.

De esta tabla se puede concluir, gracias a los valores-p, que ambos factores tienen una diferencia significativa en cuanto a la EE, ya que la hipótesis nula del valor-p, implica que no existe diferencia significativa en cuanto a la EE al aplicar diferentes cantidades de Etanol o tocoferol, lo cual es rechazado fuertemente.

$$y_{jkl} = \mu + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{jkl}$$

A partir de esto, se puede proceder a realizar un modelo de regresión el que sea capaz de modelar y predecir diferentes valores de EE respecto a estos factores. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 13: *Tabla anova del modelo de regresión para la EE.*

| Modelo lineal general: recuperación vs. Tocoferol; Etanol | | | | | |
|--|----------------|---------------------------|-----------------------|---------|---------|
| Análisis de Varianza | | | | | |
| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor-F | Valor-p |
| Tocoferol | 1 | 28206 | 28205,5 | 100,99 | 0,000 |
| Etanol | 1 | 28534 | 28533,7 | 102,17 | 0,000 |
| Error | 87 | 24297 | 279,3 | | |
| Total | 89 | 81037 | | | |
| Resumen del modelo | | | | | |
| S | R ² | R ² (Ajustado) | R ² (Pred) | | |
| 16,7117 | 70,02% | 69,33% | 67,54% | | |
| Coefficientes | | | | | |
| Termino | Valor del Coef | EE de Coef | Valor-T | Valor-p | |
| Constante | 98,05 | 9,69 | 10,11 | 0,000 | |
| Tocoferol | 28,39 | 2,82 | 10,05 | 0,000 | |
| Etanol | -28,55 | 2,82 | -10,11 | 0,000 | |
| Ecuación | | | | | |
| Recuperación = 98,05 + 28,39 Tocoferol - 28,55 Etanol | | | | | |

De la Tabla 13 se concluye que, todos los coeficientes e intercepto tienen un efecto significativo en la respuesta. Un indicador importante es el R², el cual alcanza un valor de 70,02%, que corresponde al porcentaje de variabilidad explicada, con un valor-p de 0 lo que, valida el modelo. Finalmente se entrega el modelo predictivo obtenido.

A diferencia del modelo ANOVA obtenido inicialmente, este modelo considera cada factor como valores continuos, permitiendo así que se pueda utilizar a diferentes cantidades de cada factor y no necesariamente a los valores estudiados, a diferencia de lo que ocurre con el modelo de ANOVA.

Esta relación entre la Eficiencia de Encapsulación, el tocoferol y la cantidad de etanol se explica de la siguiente manera: Mientras mayor concentración de tocoferol, la BSA tendrá mayor

cantidad a su alcance para su encapsulación. Debido a esto, después que se agregue la cantidad mínima necesaria de etanol para la formación de la nanopartícula, el resto solo estaría actuando como diluyente del tocoferol dificultando así la incorporación del tocoferol dentro de las moléculas de BSA, provocando así una disminución de la eficiencia de encapsulación.

Porcentaje de carga (DL%)

Al igual que con la EE, se realizaron los gráficos de caja de manera exploratoria para explicar el Porcentaje de carga (DL).

En la siguiente figura (Figura 21) se presenta la distribución de los resultados obtenidos de DL respecto a la cantidad de BSA agregada expresada en mg.

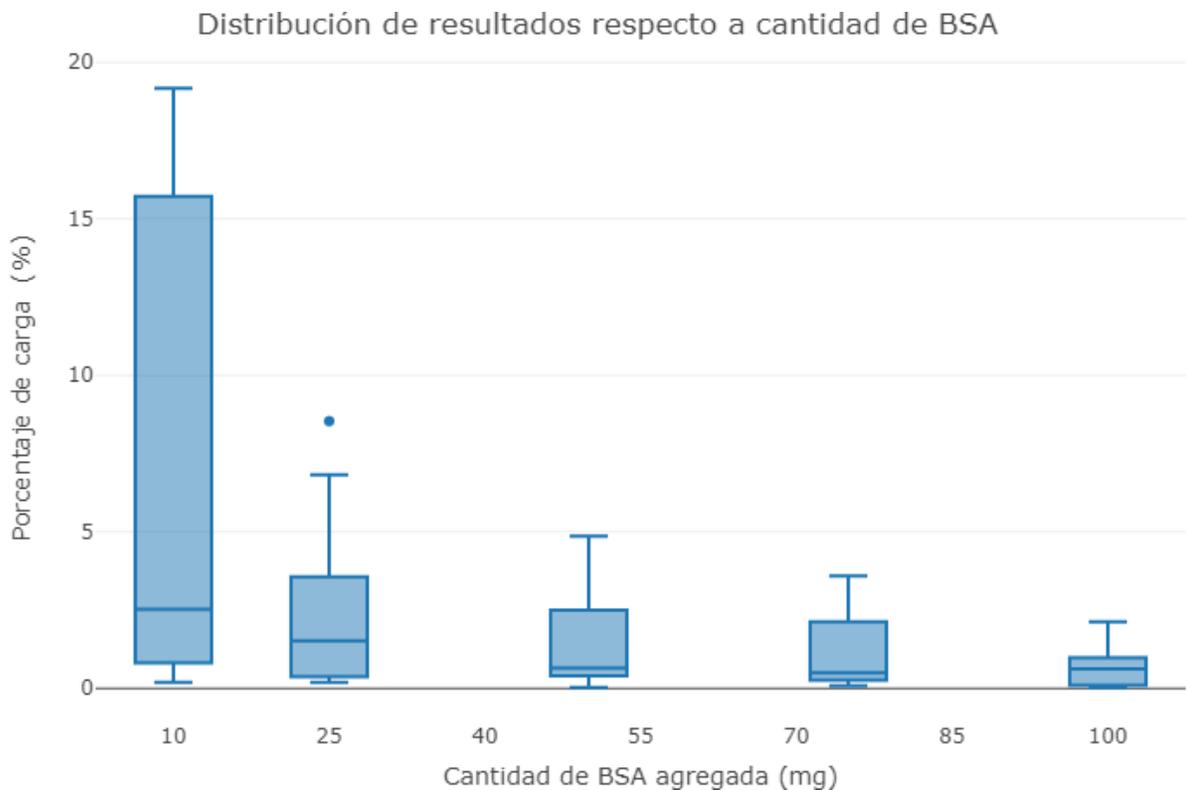


Figura 21: Gráfico de caja de DL% respecto a cantidad de BSA agregada

Se puede apreciar una clara tendencia inversa, a diferencia de los resultados obtenidos de EE. Para esta relación la DL depende de la cantidad de BSA que está relacionada con la cantidad de NPs formadas, siendo a mayor BSA una mayor cantidad de NPs. Esto produce que, ante una misma cantidad de etanol y tocoferol, al variar la cantidad de BSA, lo que varía es la cantidad de NPs formadas.

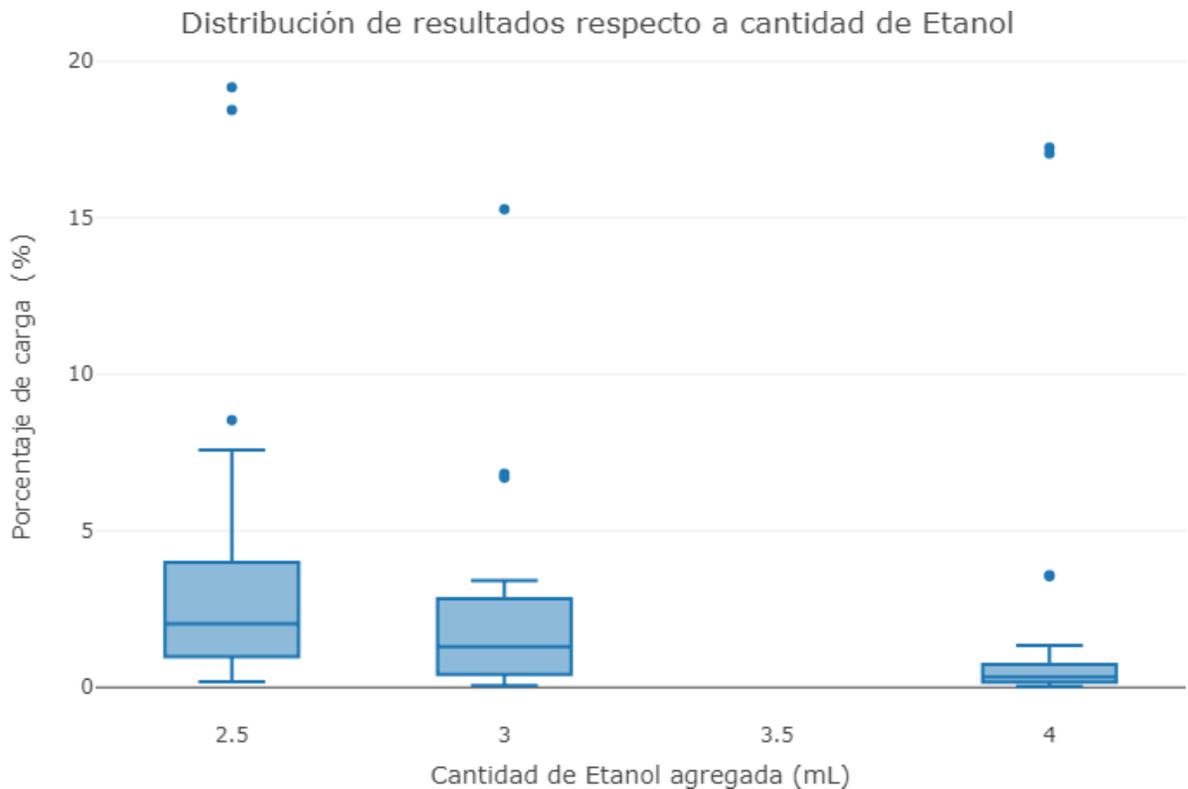


Figura 22: Grafico de caja de DL% respecto a cantidad de etanol agregada

La Figura 22 representa la distribución de los resultados de DL respecto a la cantidad de etanol agregado. A diferencia de los resultados obtenidos respecto a la EE, el valor de los resultados y las variabilidades disminuyen bastante, ya que ahora se está tomando en cuenta la cantidad de BSA agregada, lo que hace que al dividir por un número más grande los valores disminuyan, poniendo así en una mayor evidencia los valores atípicos.

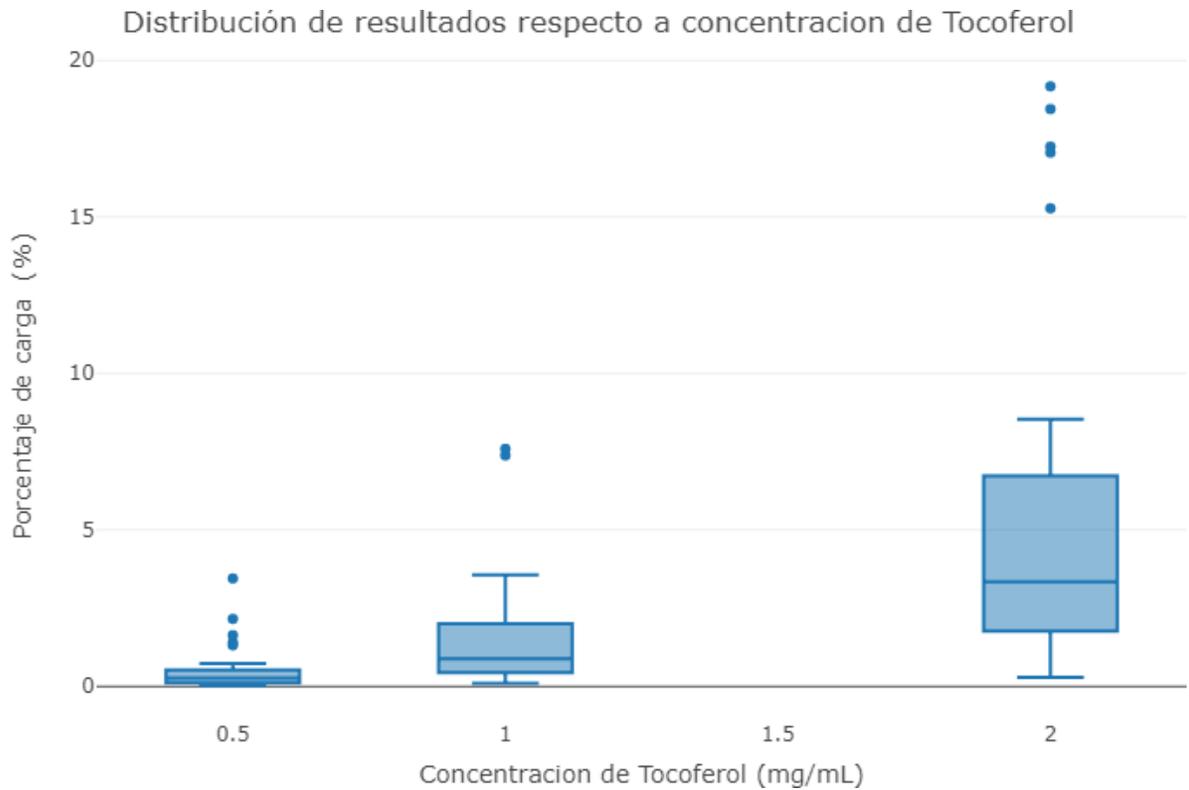


Figura 23: Gráfico de caja de DL% respecto a cantidad de tocoferol agregada

En la Figura 23 se presenta la distribución de la DL respecto a la cantidad de tocoferol agregado. De igual manera que en el caso anterior de la DL respecto al etanol, las diferencias obtenidas respecto a los valores de la EE, ocurren por la consideración de la cantidad de la BSA en el cálculo.

Si a bajos volúmenes de etanol y a altas concentraciones de tocoferol, la eficiencia aumentaba, independientemente de la cantidad de BSA agregada. Es lógico pensar que exista una relación negativa en cuanto a los mg de BSA para la DL, ya que, si la EE no cambia dependiendo de los mg de BSA, significa que la cantidad de tocoferol encapsulado sería la misma para diferentes niveles de BSA, con cantidades constantes de tocoferol y etanol. Esto implica que con bajas cantidades de BSA, todo el tocoferol encapsulado estaría en un bajo número de NPs-BSA.

Tamaño de partícula

De la misma manera que en los casos anteriores, se realizó un análisis exploratorio de los resultados.

La siguiente Figura 24 muestra la distribución de los tamaños de partículas obtenidos respecto a la cantidad de BSA agregada expresada en mg.

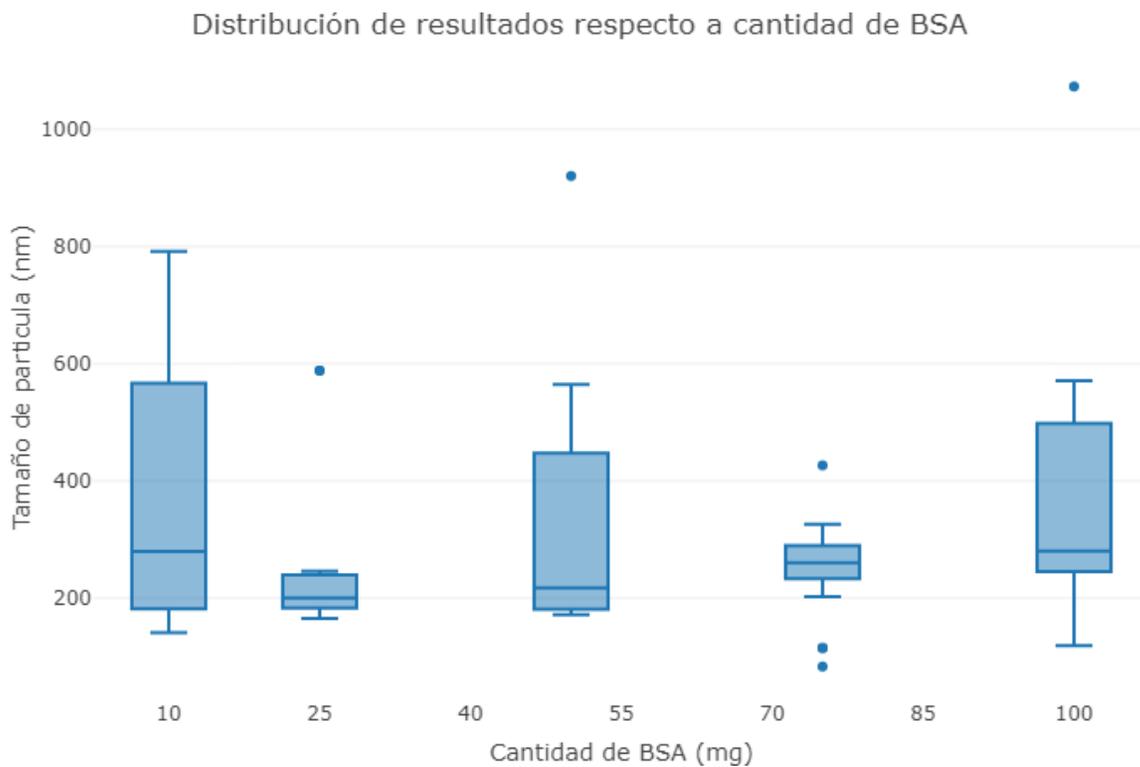


Figura 24: Gráfico de caja del tamaño de partícula respecto a cantidad de BSA agregada

Se observa que no existe relación entre este factor y el tamaño de partícula, obteniéndose un tamaño promedio de unos 300 nm aproximadamente.

De igual forma se presenta, en la Figura 25, la distribución de los tamaños de partículas respecto a la cantidad de etanol agregada.

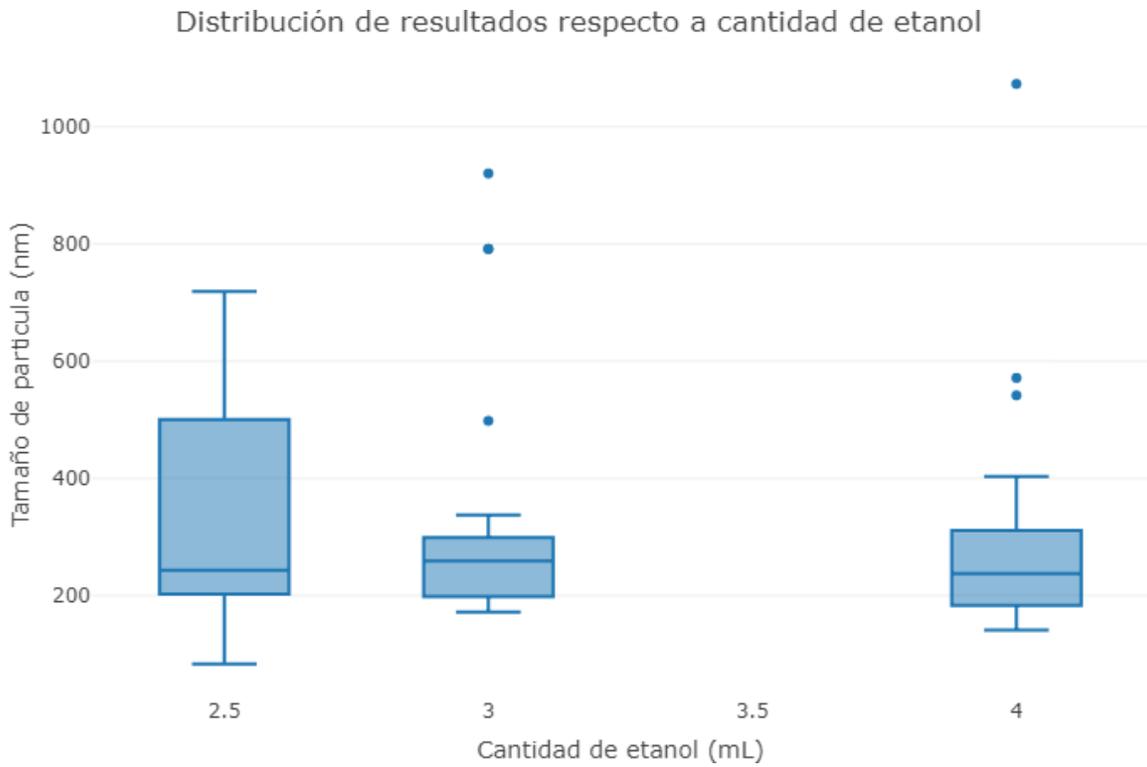


Figura 25: Gráfico de caja del tamaño de partícula respecto a cantidad de etanol agregada

De la misma manera que los resultados obtenidos respecto a la cantidad de BSA, no existe relación entre la cantidad de etanol y el tamaño de partícula.

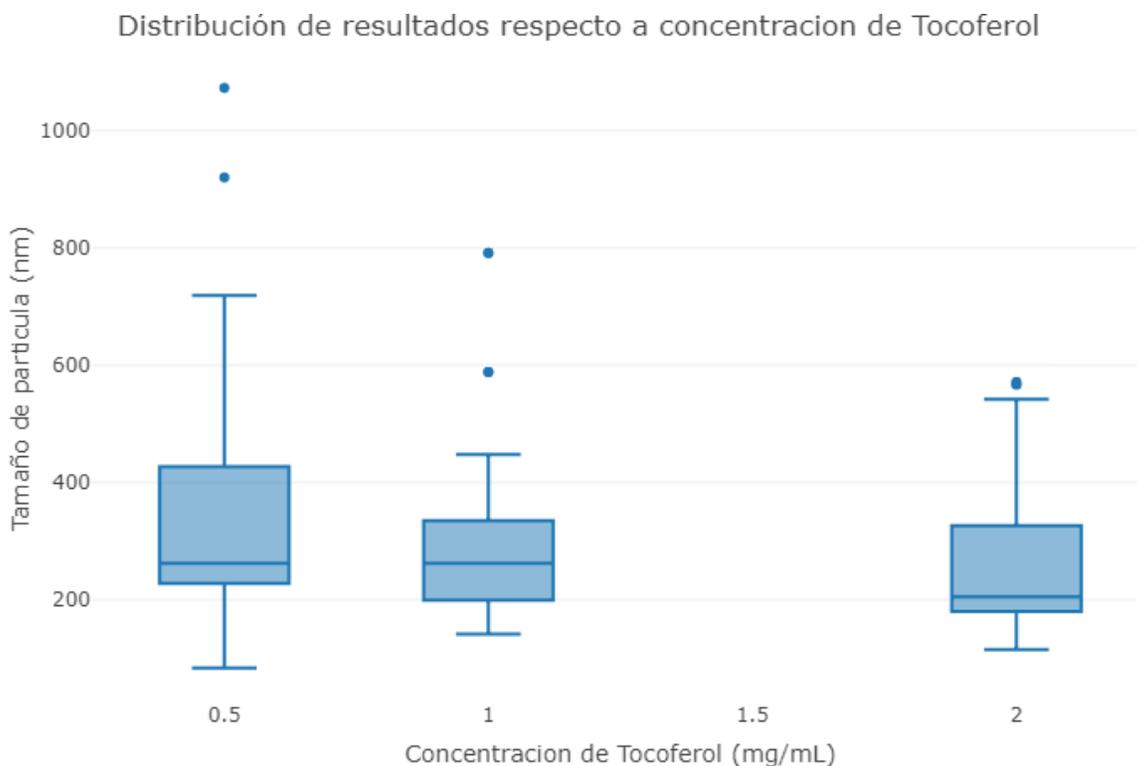


Figura 26: Gráfico de caja del tamaño de partícula respecto a cantidad de tocoferol BSA agregada

En esta última figura, Figura26, se muestran los tamaños de partículas obtenidos respecto a la cantidad de tocoferol agregada expresada en mg/mL. Donde no se observa una relación aparente entre este factor y el tamaño, de igual manera que los análisis anteriores.

A partir de estos gráficos se concluye que el tamaño de partícula no depende de ninguno de estos 3 factores. Según estudios anteriores ya mencionados, el tamaño de partícula depende del antisolvente y la velocidad con la que éste se agrega principalmente, factores lo cuales no fueron medidos en este experimento, es por esta razón que se explican los datos anómalos que aparecen en algunos casos.

c) Optimización por Método de superficie de respuesta (RSM)

Con los resultados obtenidos fue posible construir una regresión para predecir cuál sería la nanopartícula más óptima en cuanto a la EE o a la DL, utilizando el método de maximización mediante derivación de la función obtenida, sin embargo, este método tiene algunos problemas prácticos. Por ejemplo, debido a que el modelo obtenido es una función matemática a la cual no se le han definido límites, ésta tendría como recorrido todos los números reales. Esto implicaría que, si se quisiera maximizar el modelo obtenido anteriormente para la EE, este se maximizaría cuando la concentración de tocoferol tienda a infinito y la cantidad de etanol agregada tienda a menos infinito.

Si bien esto se podría solucionar definiendo los límites de la función bajo criterios de valores físicos, como, por ejemplo, solo utilizando valores positivos, esto tendría un problema en el modelamiento al acercarse a los límites, sobre todo en el caso de los límites inferiores del etanol. Ya que, si bien para los valores máximos de tocoferol estarían dados por la solubilidad del tocoferol en etanol, el valor mínimo de etanol a agregar solo puede ser definido experimentalmente, siendo este valor, la mínima cantidad en la que se forma nanopartícula de BSA.

Para facilitar el problema de los límites y ver una optimización dentro del rango estudiado, se realizó un estudio de RSM, que permite ver de forma visual los valores óptimos donde se maximiza la característica deseada²⁸.

Este procedimiento solamente se realizó para la EE y no para la DL. Si se quisiera optimizar la DL solo sería necesario obtener los valores donde se optimiza la EE, y agregar una baja cantidad de BSA.

²⁸ Ref. Kuehl, R.O., Diseño de experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2ed. Thomson Learning

A continuación, se muestra en la Figura 27 la superficie de respuesta de la EE respecto a la cantidad de etanol agregada, expresada en mL, y a la concentración de tocoferol agregada, expresada en mg/mL.

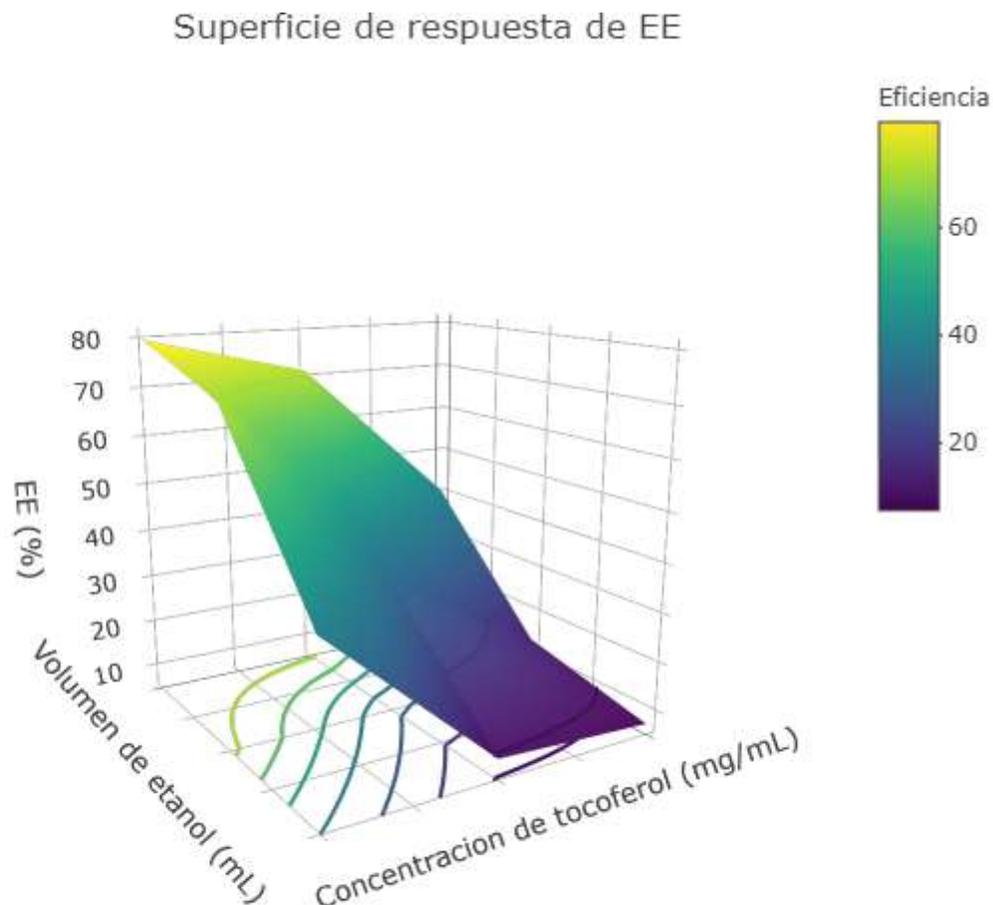


Figura 27: Superficie de respuesta de EE respecto a cantidad de tocoferol (X) y etanol (Y)

Como ya se ha mencionado anteriormente, a menor cantidad de etanol y mayor concentración de tocoferol la EE aumenta.

Para la cantidad de 2,5 mL de etanol y 2 mg/mL de tocoferol, la EE aumenta y, por lo tanto, a estas mismas cantidades y con 10 mg de BSA sería las cantidades más óptimas para la DL.

A partir de esta nanopartícula optmia, es posible calcular la dosis diaria recomendada de esta nanopartícula a consumir.

| Etapa de la vida | Cantidad recomendada de Vitmina E. |
|--|---|
| Bebés hasta los 6 meses de edad | 4 mg |
| Bebés de 7 a 12 meses de edad | 5 mg |
| Niños de 1 a 3 años de edad | 6 mg |
| Niños de 4 a 8 años de edad | 7 mg |
| Niños de 9 a 13 años de edad | 11 mg |
| Adolescentes de 14 a 18 años de edad | 15 mg |
| Adultos | 15 mg |
| Mujeres y adolescentes embarazadas | 15 mg |
| Mujeres y adolescentes en período de lactancia | 19 mg |

Tabla 14: Cantidad diaria recomendad de Vitamina E por rango de edad²⁹.

De los resultados obtenidos, las nanopartículas optimas tienen una capacidad de cercanas al 20%, por lo que la cantidad diaria necesaria de esta nanoparticula, por grupo de edad esta dada en la siguiente tabla.

| Etapa de la vida | Cantidad recomendada de NP-BSA. |
|--|--|
| Bebés hasta los 6 meses de edad | 20 mg |
| Bebés de 7 a 12 meses de edad | 25 mg |
| Niños de 1 a 3 años de edad | 30 mg |
| Niños de 4 a 8 años de edad | 35 mg |
| Niños de 9 a 13 años de edad | 55 mg |
| Adolescentes de 14 a 18 años de edad | 75 mg |
| Adultos | 75 mg |
| Mujeres y adolescentes embarazadas | 75 mg |
| Mujeres y adolescentes en período de lactancia | 95 mg |

Tabla 15: Cantidad diaria recomendad de NP-BSA optima por rango de edad.

²⁹ National Institute of Health, Office of Dietary Supplements. Department of Health & Human Services. U.S.

3. Caracterización de las NPs y comparación entre NPs-BSA con tocoferol y NPs-BSA con succinato de tocoferol.

A partir de los resultados obtenidos se puede inferir que, a menor volumen de etanol y mayor concentración de tocoferol, mayor es la eficiencia de encapsulación. Además, la eficiencia de encapsulación, al ser independiente de la cantidad de BSA, aumenta su capacidad de carga al disminuir la cantidad de BSA agregada. Previamente, se comprobó que a bajas cantidades de BSA, para el compuesto de succinato de tocoferol, se forman agregados de BSA y no una suspensión coloidal.

Considerando lo anterior, se procedió a preparar las nanopartículas más óptimas, tanto de tocoferol como de su derivado succinato. Ambas fueron preparadas a partir de soluciones de tocoferol de 2 mg/mL, y 0,5 mg/mL de succinato de tocoferol, dado que estos valores corresponden a la concentración de esta solución con la menor cantidad de BSA que se observó en la formación de la nanopartícula. En cuanto a la cantidad de BSA se utilizó las menores cantidades para cada compuesto, 10 mg para el compuesto de tocoferol y 50 mg para el compuesto de succinato, dado que estas fueron las menores cantidades de BSA estudiadas a las cuales se observó la formación de nanopartículas. Para el etanol, se agregó etanol hasta que se observara la formación de la suspensión coloidal. En el caso del tocoferol esto ocurrió a los 1,5 mL y para el succinato a los 2,5 mL de etanol respectivamente.

Las nanopartículas de tocoferol y succinato de tocoferol fueron observadas por microscopía SEM.

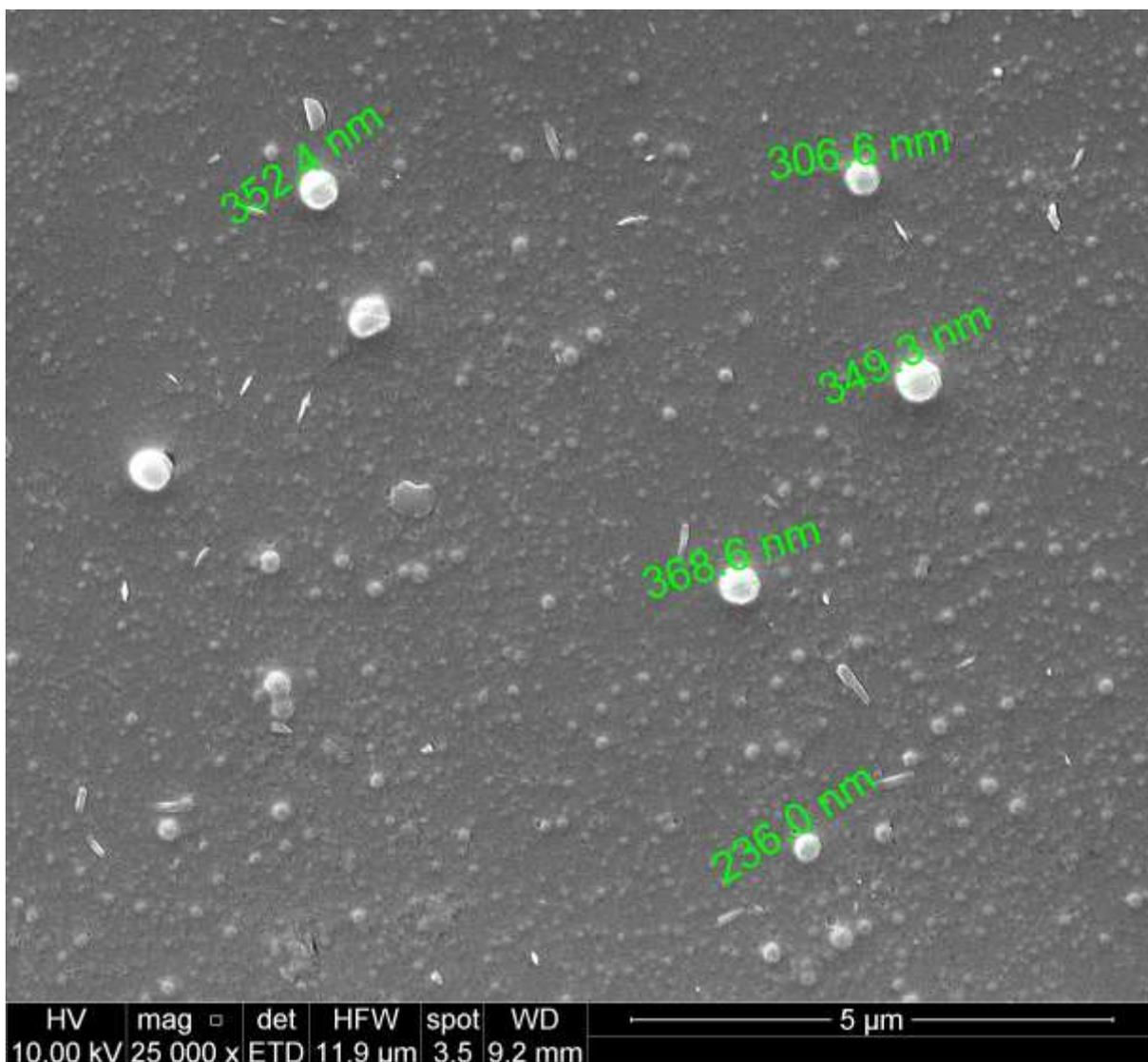


Figura 28: Nanopartículas de succinato de tocoferol medidas por microscopia SEM

Las nanopartículas de succinato de tocoferol, Figura 28, resultaron ser ligeramente más grandes que las nanopartículas de tocoferol. Además de esta diferencia, se observó formaciones de agregados de nanopartículas (Figura 29). Esto puede atribuirse a que la mayor densidad de carga del succinato de tocoferol, provoca una mayor interacción mayor entre las moléculas de succinato y las moléculas de BSA.

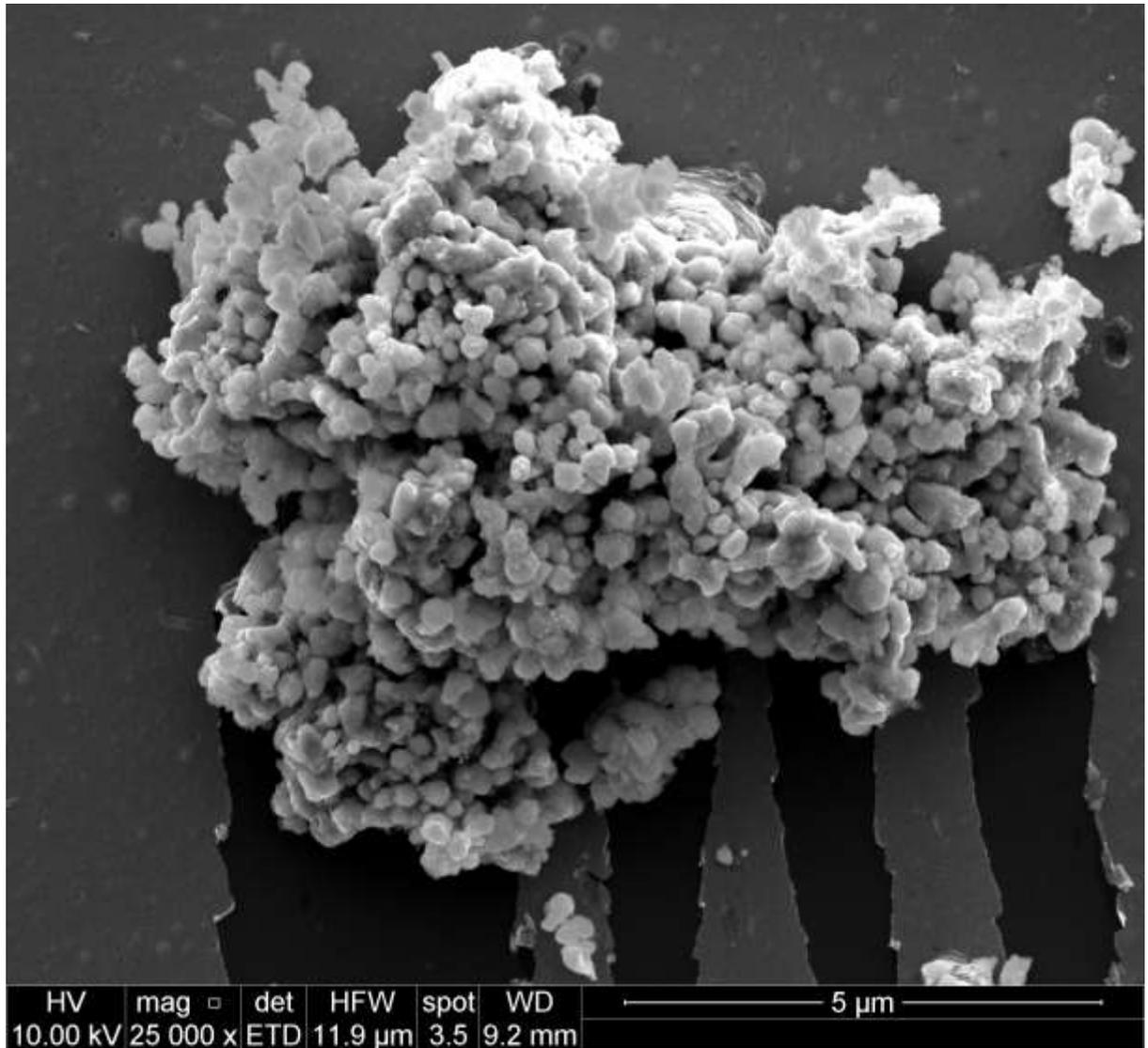


Figura 29: Agregado de nanopartículas de succinato de tocoferol

Esta formación de agregados ocurre con mayor facilidad a bajas cantidades de BSA, lo cual explica que al preparar las nanopartículas de succinato de tocoferol a bajas cantidades de BSA, no se haya logrado una suspensión coloidal, obteniéndose una gran cantidad de agregados de gran tamaño.

Si bien a 50 mg de BSA si hay formación de nanopartículas, estos agregados se siguen formando.

VI. Conclusiones

1. En este trabajo, se optimizaron dos metodologías analíticas (espectrofotometría y cromatografía líquida de alta eficiencia) para la apropiada determinación de vitamina E y su derivado succinato, que permitieron determinar la eficiencia de encapsulación de estos compuestos en nanopartículas de albúmina bovina.
2. El estudio de formación de nanopartículas dio como resultados que tanto la formación y el tamaño de la NPs-BSA, no depende de la cantidad de antisolvente, de la concentración de vitamina E, ni de la cantidad de BSA agregada. En cambio, depende de otros factores tales como, el antisolvente utilizado, la velocidad de adición de antisolvente y el pH al cual se disuelve la BSA, entre otros.
3. La eficiencia de encapsulación de la vitamina E en nanopartículas de albúmina disminuyó en función del volumen de etanol agregado, contrario a lo obtenido con la concentración de vitamina E. Esto se debe a que el etanol solo actúa como antisolvente, una vez que se alcanza la concentración necesaria para coacervación de la BSA y, el exceso dificulta la incorporación de la vitamina E dentro de la NPs-BSA recién formada. Si bien la eficiencia de encapsulación no se ve afectada por la cantidad de BSA utilizada, éste si es un factor significativo en la capacidad de carga, ya que a mayor cantidad de BSA, mayor cantidad de NPs son formadas, esto implica que ante las mismas condiciones de vitamina E y etanol, solo estaría disminuyendo la cantidad de vitamina E por NPs-BSA.
4. Con el fin de optimizar los factores estudiados, la utilización del método de superficie de respuesta, permitió observar los resultados de una manera de forma gráfica y simplificada para así poder tener un rango de valores donde los cuales se optimice el experimento.
5. Las grandes diferencias entre los resultados de las NPs-BSA de ambas moléculas, se debe principalmente a la diferencia de las densidades de carga y polaridad entre ambas. Al tener un grupo ácido la molécula de succinato de tocoferol tiene una densidad de carga

mayor en el grupo OH luego de desprotonarse, provocando así que se genere una carga mucho más localizada que en la molécula de tocoferol. Esto hace que al interactuar con las moléculas de BSA exista una interacción de tipo iónica, por lo que, a una baja proporción de BSA respecto al succinato, se formarían pares iónicos y no necesariamente nanopartículas. Esto cambia a una mayor proporción de BSA, ya que esta estaría “diluyendo” las moléculas de succinato de tocoferol, favoreciendo así la formación de las NPs-BSA.

6. La implementación de métodos estadísticos como herramienta de análisis de datos y de planificación y diseño de experimentos resulta muy útil, no solo para este caso si no para cualquier aplicación. Gracias a la implementación de un diseño factorial, que es capaz de diseñar un experimento que logre estudiar, de manera que minimice la variabilidad, una serie de factores los cuales están involucrados en la formación de NPs-BSA y en la encapsulación de moléculas de vitamina E.
7. La preparación de NPs-BSA con una alta cantidad de vitamina E encapsulada, podría ser utilizada para productos alimenticios formados por sistemas dispersos como soluciones (bebidas), emulsiones (leche, yogurt), suspensiones (pastas), geles (gelatinas), entre otros.
8. Los suplementos de vitamina E serán más seguros cuando se aproximen a la dosis diaria recomendada que equivale a 15 mg/día para sujetos adultos. Sin embargo, si se considera que los alimentos naturales, además de vitamina E, contienen una mezcla compleja de nutrientes que favorecen su absorción y proporcionan otros fotoquímicos, lo más prudente y científicamente apoyado sería consumir una dieta con alto contenido en tocoferoles ya sea en alimentos naturalmente que contengan una gran cantidad de vitamina E o, en su defecto, alimentos fortificados en vitamina E.