

## Diseño y desarrollo de un gel bucal conteniendo microcápsulas con aceite de uva como radioprotector

ORTEGA-C., Lucía†, NOGUEZ-M., Norma Angélica\*, RUBIO-M., Alejandro, QUIRINO-B., Carlos Tomás

*Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco. Depto. De Sistemas Biológicos. Calz. Del Hueso 1100. Col.Villa Quietud, Delg. Coyoacán, CP 04960, D.F. México*

*Instituto Tecnológico de Querétaro Dpto. de Ciencias Básicas.Av.Tecnológico s/n esq. Mariano Escobedo.Col.Centro Querétaro,Qro.CP76000*

Recibido Enero 5, 2016; Aceptado Marzo 8, 2016

### Resumen

La radioterapia como tratamiento para el cáncer de cabeza y cuello, destruye las células tumorales a través de la generación de radicales libres que pueden dañar, las células sanas. Existen sustancias radioprotectoras provenientes de la naturaleza como las frutas, entre las que se encuentra, la uva cuya actividad antioxidante se debe a los polifenoles que contiene. Con base a lo anterior, se elaboraron mediante el método de coacervación compleja micropartículas conteniendo aceite de uva, y su posterior incorporación a un gel. Se determinó la capacidad de carga de las micropartículas para el lote 1 (pH 7.99) fue de 56.39% y para el lote 3 (pH 8.33) fue de 53.63%. En relación al estudio de liberación del activo fue del 70% y del 90% dentro de las primeras horas, respectivamente. La fuerza de adhesión del gel base fue de 1.96N en el intervalo de pH de 6.73 a 7.34 siendo ésta la fuerza adecuada, para la permanencia en la cavidad bucal.

**coacervación compleja, radioprotectores, resveratrol.**

### Abstract

Radiotherapy as a treatment for head and neck cancer, destroys tumor cells through the generation of radical free they can damage healthy cells. There are substances radioprotective of the nature as them fruit, between which is found, the grape whose activity antioxidant by polyphenols that contains. With base that, it is developed through the method of microparticles coacervation complex containing oil of grape, and its subsequent incorporation to a gel. The capacity of load of the microparticles for the batch 1 (pH 7.99) was of 56.39% and for the batch 3 (pH 8.33) was of 53.63%. In relation to the release of resveratrol was 70% and 90% within the first hours, respectively. The gel base strength was 1.96 N for permanence in the oral cavity in the range of pH of 6.73 to 7.34

**radioprotective, microparticles coacervation complex, resveratrol**

**Citación:** ORTEGA-C., Lucía, NOGUEZ-M., Norma Angélica, RUBIO-M., Alejandro, QUIRINO-B., Carlos Tomás. Diseño y desarrollo de un gel bucal conteniendo microcápsulas con aceite de uva como radioprotector. Revista de Investigación y Desarrollo 2016, 2-3: 15-20

\* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: nanoguez@correo.xoc.uam.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

## Introducción

El cáncer de cabeza y cuello es una neoplasia que se localiza en la cavidad craneal y bucal, siendo la quinta neoplasia más frecuente a nivel mundial y constituye el 17.6% de las neoplasias malignas en México. Ante esta patología se tiene contemplado como tratamiento la cirugía, la quimioterapia, y a radioterapia de cabeza y cuello. En el caso particular de la radioterapia su objetivo es incrementar el daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células tumorales a través de diversos mecanismos, entre los que se destacan la generación de radicales libres; sin embargo estos radicales no afectan sólo a las células tumorales, sino también a las células sanas, originando los efectos secundarios como mucositis bucal (inflamación de los tejidos de la boca), xerostomía (síndrome de la boca seca), trismo (contractura de los músculos elevadores de la mandíbula que producen la oclusión forzada de ambos arcos dentarios).

Para prevenir o reducir la magnitud de los efectos secundarios, existen fármacos llamados radioprotectores, los cuales pueden prevenir el daño ocasionado a las células sanas, o bien, disminuir el daño ocasionado a dichas células, como los analgésicos, pero su uso se encuentra limitado debido a los efectos secundarios. Esto ha motivado la búsqueda de otros fármacos con actividad antioxidante proveniente de plantas o de las frutas ya que su consumo tiene un papel importante como factor de protección, asociándose este efecto benéfico a la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, los cuales actúan como agentes reductores, formando un singulete de oxígeno, actuando como queladores y atrapando los radicales libres; entre las que se cuentan con esta actividad es la uva, que es una fruta cuya actividad se ha descubierto por la cantidad de polifenoles que contiene, entre ellos está el resveratrol, el cual es un estilbenceno con capacidad para capturar los radicales libres que se produce como respuesta a un estímulo externo.

El estilbenceno también conocido como 1,2-difeniletileno, existe en dos formas isoméricas: E-estilbenceno (isómero trans) y el Z-estilbenceno (isómero cis). Los derivados hidroxilados del estilbenceno son productos secundarios de la formación de la corteza en árboles que actúan como fitoalexina, siendo el resveratrol uno de ellos (Likhtenshtein, 2010). El resveratrol es un anabolito que se genera en las células de las plantas con la función de ser un pesticida natural, a través del cual, la planta se defiende de agresiones externas (Rodríguez, 2008). Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue diseñar y desarrollar una microcápsula por coacervación compleja que contenga aceite de semilla de uva (resveratrol) que funcione como un radioprotector con la finalidad de prevenir los efectos secundarios de la radioterapia en una forma farmacéutica semisólida (gel base), con la finalidad de mejorar la calidad de vida del paciente con cáncer.

## Material y métodos

### Reactivos

Aceite de semilla de uva (Olivi Hermanos Argentina, lote 42-10), carbopol, sorbitol 70%, EDTA (Reactivos y Productos químicos Finos), trietanolamina (J.T. Baker), germaben II (Drogueria Cosmopolita), gelatina B (J.T. Baker), goma arábiga<sup>R</sup>, cloruro de calcio (J.T. Baker) y resveratrol (Sigma-Aldrich) Texto redactado en Times New Roman No.12, espacio sencillo.

## Equipos

Balanza analítica Ohaus Explore Pro EP214C, balanza granataria de dos platos Ohaus Harvard Trip capacidad de 2 Kg, pontenciometro Corning Pinnacle 530 pHmeter, espectrofotometro UV-Vis Shimadzu UV-1201, calorímetro Perkin-Elmer DSC-7, microbalanza Perkin-Elmer AD-4 y microscopio electrónico de barrido Jeol 5600 (IFUNAM).

## Metodología

### Determinación del contenido de resveratrol en el aceite de semilla de uva

Elaborar una curva patrón en un intervalo de concentración de 0.625-10.0 µg/ml de resveratrol en una mezcla (1:1) de etanol al 12%: SA de fosfatos pH 7.34 leer a una longitud de onda de máxima absorción de 308 nm. Preparar una solución estándar de resveratrol 0.1 mg/ml en una mezcla (1:1) de etanol al 12%: SA de fosfatos pH 7.34 y someter a la luz solar durante 8 h (Camont y col. 2009), una vez transcurrido el tiempo elaborar la curva patrón de 0.50-8.0 µg/ml y leer a una longitud de 208nm.

### Determinación del isómero-cis y trans resveratrol en el aceite de semilla de uva.

Se transfieren 10ml del aceite de semilla de uva y se realiza una extracción con solución de hidróxido de potasio 1M, en una proporción 1:1 alejado de la luz y con agitación constante, dejar reposar y separar las fases, leer el extracto resultante a las longitudes de onda de 288 y 308 nm.

### Elaboración del gel base que funcionará como vehículo para la dispersión de las microcápsulas

En la tabla 1 se muestran los componentes para el desarrollo de la formulación de gel base, como posible vehículo para las microcápsulas.

### Determinación de la fuerza adhesión del gel base neutralizado con trietanolamina

Pesar 2.0 g de la muestra y colocar en el centro de la placa que queda fija a la superficie plana, sobreponiendo la placa superior, posteriormente añadir agua al contrapeso hasta la separación de ambas placas, se calcula la fuerza necesaria con la siguiente fórmula:

$$F = 0.00981 \frac{W}{2} \quad (1)$$

Donde F es la fuerza necesaria para separar ambas placas en Newtons (N) y W es la cantidad de agua en gramos requerida para originar la separación de las placas, ver fig. 1 (Chary y col. 1999).

### Método de coacervación compleja para la elaboración de las microcápsulas con aceite de semilla de uva

Preparar soluciones de gelatina B y goma arábica al 7.5%, ajustar el pH de la solución de gelatina B a las mismas condiciones de pH de la goma arábica, calentar ambas soluciones a 40° C; añadir 5 ml de aceite de uva a la solución de goma arábica, mezclar hasta obtener una solución homogénea. Mantener la temperatura, añadir la solución de gelatina B, agitar hasta que se enfríe a temperatura ambiente, agregar 2 ml de una solución de cloruro de calcio y agitar por una hora, ver fig.2 (Agüero y col. 2007)

### Caracterización de a microcápsula elaborada por el método de coacervación compleja

### Determinación de la forma y tamaño de la micropartícula por microscopía

Secar las microcápsulas en una superficie plana a temperatura ambiente para eliminar el exceso de disolvente, raspar para colocar la muestra sobre un barril de oro, adherido a una cinta de carbón.

### **Determinación de la no interacción de la micropartícula con aceite de semilla de uva por Calorimetría Diferencial de Barrido**

Pesar aproximadamente de 3 a 5 mg de la microcápsula vacía en cápsulas de aluminio selladas y correr a un intervalo de temperatura de 0 a 300 ° C a una velocidad de 10 ° C/min, determinar la huella térmica Bajo las mismas condiciones, determinar la huella térmica del resveratrol y de las microcápsulas cargadas con aceite de semilla de uva.

### **Determinación de la capacidad de carga de la microcápsula con resveratrol**

Pesar aproximadamente 50 mg de microcápsula, agregar 10 ml de una mezcla de etanol al 12%: SA de fosfatos pH 7.34 (1:1) y agitar. Reposar durante 5 min y filtrar, empleando papel filtro Whatman No. 1, leer el filtrado a las longitudes de onda 288 y 308 nm con la finalidad de determinar la cantidad de resveratrol que no fue encapsulado.

### **Estudio de liberación in vitro del resveratrol de la microcápsula**

Pesar 50 mg de microcápsulas, colocar sobre una cinta adhesiva doble cara, adherir está en una de las paredes del recipiente de prueba, empleando como medio de disolución 30 ml de una mezcla de etanol al 12%: SA de fosfatos pH 7.34 (1:1), previamente desgasificado, con tiempos de muestreo a los 5, 15, 30,60,120,180, 240, y 300 minutos con una velocidad de agitación de 20 rpm, tomar alícuotas de 4 ml con reposición del medio.

### **Resultados**

#### **Determinación de los isómeros cis- y trans-resveratrol en el aceite de semilla de uva**

Para 10 ml de extracto de aceite, se tiene una concentración de 2.76 µg/ml para el isómero-trans, con CV 6.98%, mientras para el isómero-cis, una concentración de 5.85 µg/ml, con CV 3.07%; contando con un total de resveratrol de 8.61 µg/ml.

### **Determinación del pH de máxima adhesión**

Se determinó que hay una relación lineal entre la cantidad de trietanolamina añadida y la variable de respuesta de pH en el intervalo de 0 a 0.5 mL, obteniéndose la ecuación de la recta  $pH = 4.33 + 7.02 (\text{ml de TEA})$  con un coeficiente de determinación de 0.9941. Con base a los resultados, se determinó que la cantidad necesaria para llegar a un punto cercano a la neutralidad del gel base es de 0.3 ml de TEA con un pH de 6.87, ver tabala 2.

### **Determinación de la fuerza adhesiva del gel base**

Con relación a la curva de adhesión se observa que a intervalos de pH 6.73 a pH 7.34 la fuerza adhesiva es de 1.96 N, mientras que a partir del pH de 7.57 su fuerza adhesiva disminuye como se muestra en el gráfico 1.

### **Determinación de la forma y tamaño de la microcápsula por microscopia**

Para el Lote 1 (pH 7.99) se observan partículas pequeñas separadas, como lo muestra la fig. 3

Para el lote 3 (pH 8.33) se observan ramificaciones por microscopía SEM, mostrando la microcápsula de una manera incipiente. Ver Fig. 4.

### **Determinación de la no interacción de la micropartícula con aceite de semilla de uva por Calorimetría Diferencial de Barrido**

El punto de fusión del resveratrol es de 265.47 ° C, en la fig. 5 se muestra el termograma con la huella térmica.

En el análisis térmico del lote 1 (pH7.99) de la microcápsula cargada, se observa una endoterma a 278.06 ° C que corresponde al resveratrol, ver fig. 6.

En la determinación por calorimetría del lote 3 (pH 8.33) se observó la presencia de una endoterma a 276 ° C en la micropartícula cargada con resveratrol, ver fig. 7

### Determinación de la capacidad de carga de resveratrol de la microcápsula

En el análisis de carga del resveratrol de la micropartícula del lote 1 (pH 7.99) se obtuvo una capacidad de carga de 56.39%, para el lote 3 (pH 8.33) se determinó una capacidad de carga de 53.63%. Para esta determinación se empleó la siguiente ecuación.

$$CPC = \frac{\text{peso experimental}}{\text{peso teórico}} \times 100 \quad (2)$$

### Estudio de liberación in vitro del resveratrol de la microcápsula

Para llevar a cabo los estudios de liberación del activo se seleccionaron los lotes: Lote 1 (pH 7.99) y Lote 3 (pH 8.33) los cuales mostraron contener resveratrol como se pone de manifiesto en los análisis por DSC; obteniéndose a los tiempos de muestreo de 5,15,30,60,120,180,240 y 300 min, ver fig. 8.

En la fig. 8 podemos observar que en el lote 1 (pH 7.99), el resveratrol presente en la microcápsula se libera gradualmente durante la prueba llegando a un máximo de 79.67%. En el lote 3 (pH 8.33) presenta una fase de latencia durante los primeros 15 minutos, después de este tiempo, se liberan 90.42%.

### Conclusiones

El método analítico espectrofotométrico diseñado en el intervalo de concentración de 0.625 a 10.0 µg/ml de trans-resveratrol resultó ser lineal, con un coeficiente de determinación de 0.9980. Para el cis-resveratrol en un intervalo de concentración de 0.50 – 8.0 µg/ml resultó ser lineal con un coeficiente de determinación 0.9982.

La cuantificación del resveratrol en el aceite de semilla de uva fue de 8.61 µg/ml. El pH óptimo para la adhesión es de 7.01 ± 0.24 con una fuerza de adhesión 1.96N.

Se logró la microencapsulación del aceite de semilla de uva con gelatina y goma arábica por el método de coacervación compleja, empleando lactosa como agente reticulante. Asimismo se determinó que los parámetros críticos de la coacervación son: el pH final que adquiere la micropartícula durante el proceso, el tiempo de agitación y la estequiometría del proceso.

### Agradecimientos

Instituto de Física de la UNAM por su apoyo en el manejo e interpretación del microscopio electrónico de barrido, así como la preparación de muestras.

### Referencias

Agüero, L., García, J., Valdés O., Zaldivar D., Pérez, I. (2007). Soporte polimérico en macropartículas para la liberación de cefazolina. VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería.

Camont L., Cottart C.H., Rhayem Y., Nivet-Antoine V., Djelidi R., Collin F (2009). Simple spectrophotometric assessment of the trans/cis resveratrol ratio in aqueous solutions. *Analytical Chimica Acta*. 634:121-128.

Chary R.B.R., Vani G., Rao Y.M. (1999) In vitro and in vivo adhesión testing of mucoadhesive drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*; 25(5):685-690.

Likhtenshtein (2010). *Stilbenes. Application in Chemistry, Life Sciences and Materials Science*. Alemania. Editorial Wiley-VCH

Rodriguez, D.A. (2008). Utilización de señales fluorescentes para el análisis y caracterización de vinos. Mejora de la sensibilidad y selectividad mediante derivatización fotoquímica. (tesis). Universidad Extremadura. Departamento de Química Analítica España.