



**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.**

**OBTENCIÓN DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS DE  
QUITOSANA ACOPLADOS A NOBILETINA**

Por:

Ana Guadalupe Luque Alcaraz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN REGIONAL GUAYMAS  
ASEGURAMIENTO DE CALIDAD Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS  
NATURALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

GUAYMAS, SONORA


NOVIEMBRE DE 2011

## DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.

Firmado

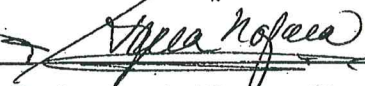


Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
Director General

## APROBACIÓN

Los miembros del comité para revisar la tesis de Ana Guadalupe Luque Alcaraz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Waldo Manuel Argüelles Monal  
Director de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Inocencio Higuera Ciapara  
Co-Director de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jaime Lizardi Mendoza  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco Martín Goycoolea Valencia  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Miguel Ángel Valdez Covarrubias  
Asesor

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme la beca durante los estudios del programa de doctorado en ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., por permitirme ser parte de su programa de posgrado.

Al Dr. Waldo M. Argüelles Monal, director de tesis, por su apoyo, dedicación y acertada dirección en la realización de este trabajo.

Al Dr. Inocencio Higuera Ciapara, co-director de tesis, mi más sincero agradecimiento por su invitación a participar en este trabajo y su apoyo en todo momento.

Al comité de tesis: Dr. Jaime Lizardi Mendoza, Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia, Dr. Miguel Ángel Valdez Covarrubias, mi agradecimiento por las facilidades brindadas para el uso de laboratorios, así como asesoría y dedicación en el seguimiento y revisión de este trabajo.

A la Dra. Yolanda L. López Franco, su apoyo en los laboratorios de Dispersión de Luz Dinámica y Microscopía de Fuerza Atómica, así como sus recomendaciones. A la Dra. Elizabeth Carvajal Millán, gracias sus atenciones y recomendaciones para este trabajo.

A la M.C. Alma Rosa Toledo Guillén, la M.C. Karla G. Martínez Robinson y la Q.B. Alma C. Campa Mada por su apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Maricarmen Thalía Recillas Mota, por sus acertadas recomendaciones y el apoyo brindado en el trabajo de laboratorio.

A la Dra. Adriana Leticia Navarro Verdugo, por su ayuda en la búsqueda de material bibliográfico y sus recomendaciones para este trabajo.

A la Q.B. Luisa Lorena Francisca Silva Gutiérrez, por las facilidades otorgadas para el uso de material y equipo de laboratorio necesarios para el desarrollo experimental de esta tesis.

Al M.C. Alfonso Martínez Borraz por su apoyo técnico en la búsqueda de artículos, así como por las facilidades para el establecimiento de las videoconferencias durante la realización de este trabajo.

M.C. María Elena Lugo Sánchez, M.C. Guillermina García Sánchez, M.C. Gisela Carvallo, por su apoyo técnico en el uso de laboratorios.

M.C. Ana Aurora Vidal Martínez, por las facilidades para el establecimiento de las videoconferencias durante la realización de este trabajo. Sr. Gerardo Reyna Cañez, por su ayuda en la búsqueda de artículos de investigación.

Dra. Goreti Campos y Silvia Andrade del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. por su colaboración en el análisis de muestras por microscopía electrónica de barrido.

A toda la comunidad CIAD Guaymas y CIAD Hermosillo por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

## DEDICATORIAS

*A Dios, por darme la fuerza para realizar esta etapa en mi formación profesional.*

*A mi familia, que estuvieron presentes en cada momento y me impulsaron siempre a avanzar.*

*A mis amigos, atentos siempre a mi persona e incitando al avance y terminación de esta meta.*

## Contenido

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>X</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2.- MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....	3
QUITOSANA Y NANOPARTÍCULAS A BASE DE QUITOSANA .....	5
MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	6
PROCESOS DE SEPARACIÓN DE FASES EN SISTEMAS POLIMÉRICOS .....	11
NOBILETINA .....	20
PATENTES SOBRE NANOTECNOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	23
<b>3.- OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	26
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS .....	27
<b>5.-RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1.- PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA MEDIANTE NANOPRECIPITACIÓN. ....	32
PREPARATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES BY NANOPRECIPITATION .....	33
5.2.- CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CARGADAS CON NOBILETINA. ....	62
<b>6.- REFERENCIAS</b> .....	<b>86</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Formación de bases de Schiff.	5
2.2	Diagrama de fases.	15
2.3	Diagrama de fases para un sistema ternario del tipo no solvente(1)-solvente(2)-polímero(3) asumiendo $\chi_{23}=0$ y $\chi_{13}=\chi_{12}=1.5$ y para distintos valores de $x$ , indicados en el gráfico. Valores calculados por Tompa. <sup>46</sup>	19
2.4	Nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona) una polimetoxiflavona cítrica. <sup>23</sup>	21
5.1.1	Effect of type of chitosan solution, polymer concentration and nonsolvent to solvent ratio on the mean size of nanoparticles. 2 mg/mL (squares), 0.5 mg/mL (circles). N-(methylsulfonic acid) chitosan (filled symbols) and 2 % aqueous acetic acid (open symbols).	45
5.1.2	Effect of type of chitosan solution on the characteristics of nanoparticles (DLS distribution, AFM image and line scan profile of the nanoparticle indicated in the image). Polymer concentration: 0.5 mg/mL; Nonsolvent to solvent ratio: 40:1. (a) 2 % aqueous acetic acid and (b) N-(methylsulfonic acid) chitosan.	46
5.1.3	Effect of replacing methanol by water in the suspension medium on the mean size of nanoparticles at different nonsolvent to solvent ratios. Original methanol (filled circles), water suspension (open circles). Polymer concentration: 0.5 mg/mL in 2 % aqueous acetic acid. (a) Without addition of surfactant and (b) with Tween 80 added to methanol before the nanoprecipitation. Surfactant concentration: 0.05 %.	48
5.1.4	Micrographs of re-suspended chitosan/Tween 80 system obtained by SEM. Polymer concentration: 0.5 mg/mL in 2 % aqueous acetic acid; nonsolvent to solvent ratio 40:1.	50



5.1.5	Effect of the resuspension of freeze-dried nanoparticles in water on the mean size of nanoparticles. Polymer concentration: 0.5 mg/mL in 2 % aqueous acetic acid; nonsolvent to solvent ratio 40:1. Inside the graph is the AFM image and line scan profile of the resuspended nanoparticle indicated in the image.	51
5.1.6	Effect of the nonsolvent employed during nanoprecipitation on the mean size of nanoparticles, as indicated in the figure. Left-hand panel: chitosan dissolved in 2 % aqueous acetic acid; Right-hand panel: chitosan hydrochloride dissolved in water. Polymer concentration: 0.5 mg/mL; nonsolvent to solvent ratio 10:1 (if labeled, surfactant was dissolved in the nonsolvent phase at 0.05 %).	53
5.2.1	Chemical structure of nobiletin (5,6,7,8,3',4' hexamethoxyflavone).	66
5.2.2	Particle sizes of (a) chitosan nanoparticles and (b) nobiletin-loaded chitosan nanoparticles as evaluated by dynamic light scattering.	74
5.2.3	AFM image and line scan profiles of two nobiletin-loaded chitosan nanoparticles as indicated in the figure.	75
5.2.4	FTIR spectra of nobiletin, chitosan and nobiletin loaded-chitosan nanoparticles as labeled.	76
5.2.5	Effect of nobiletin (in solution) on cell proliferation. The type of cell line is labeled in the figure.	78
5.2.6	Effect of chitosan nanoparticles on cell proliferation. The type of cell line is labeled in the figure.	78
5.2.7	Effect of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles on cell proliferation. The type of cell line is labeled in the figure. The cell proliferation is expressed versus the nobiletin concentration and the corresponding chitosan concentration, as parallel x-axes.	79

## RESUMEN

La quitosana es un polisacárido que presenta interesantes aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo en la producción de sistemas nanoparticulados de utilidad farmacéutica. Por su parte, la nobiletina es un flavonoide que se encuentra en la cáscara de los cítricos y que posee una probada actividad como agente anticancerígeno. El objetivo del presente trabajo fue obtener y caracterizar nanopartículas de quitosana mediante nanoprecipitación y evaluar la actividad anticancerígena de estos materiales acoplados a nobiletina. Con este fin se emplearon soluciones de quitosana en varios disolventes acuosos, y metanol como no solvente.

Los resultados obtenidos indican que al incrementar la proporción no solvente-solvente y al disminuir la concentración del polímero en la solución se observa un decremento en el tamaño de las partículas. La adición de surfactante al no solvente resulta en una disminución del tamaño de las nanopartículas, a la vez que se aprecia una tendencia a producir nanopartículas de un mismo tamaño independientemente de la relación no solvente - solvente. Como consecuencia, se obtienen sistemas con tamaños cercanos a los 300 nm cuando se emplean soluciones de quitosana al 0.05% en ácido acético y utilizando metanol con Tween 80. La fuerza iónica de las soluciones de quitosana no afectó en el tamaño de partícula. Sin embargo, el tipo de no solvente si posee una marcada influencia.

Fue posible atrapar nobiletina a las nanopartículas de quitosana mediante la formación de una base de Schiff, lográndose una buena eficiencia

de acoplamiento. Estas nanopartículas presentan un tamaño ligeramente mayor que sus contrapartes sin nobiletina. La nobiletina acoplada a las nanopartículas de quitosana exhibe un incremento significativo de la actividad anticancerígena, llegando a valores de  $IC_{50}$  del orden de 8  $\mu\text{g/mL}$ , en comparación con la nobiletina sola, cuyo valor asciende a cerca de 26  $\mu\text{g/mL}$ .

## 1.- INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas poliméricas representan un concepto que ha emergido en los recientes años y los rápidos avances en nanotecnología han permitido ampliar las oportunidades en el diseño y aplicación de las mismas.<sup>1</sup>Dentro del campo de la nanotecnología los polímeros son una importante clase de materiales para el diseño y aplicación en el área farmacéutica y biotecnológica. En años recientes muchos polímeros han sido objeto de experimentación para su aplicación en la entrega de fármacos incluyendo los naturales (celulosa, albúmina, colágeno, quitosana, etc.) y sintéticos (poliésteres, poli(alquilcianoacrilato, etc). Estos diferentes materiales proveen un amplio rango de propiedades, permitiendo con esto la selección de materiales idóneos para la aplicación en campos específicos.<sup>2</sup>

La producción de nanopartículas de polímeros es relevante en muchos campos de aplicación como el cosmético, el de metodologías analíticas, el biomédico y farmacéutico. Es conocido que al administrar ingredientes bioactivos en el cuerpo humano, algunos de ellos no se absorben de manera efectiva a través de superficies mucosas, dada la limitada permeabilidad de las barreras epiteliales, así como las características fisicoquímicas y morfológicas de las moléculas.

Lo anterior hace necesario el desarrollo de sistemas de administración que permitan una mejor absorción de estas moléculas. Actualmente es posible producir nanopartículas para este fin, y que puedan ser utilizadas en una variedad de formas innovadoras, aumentando la eficiencia del fármaco o ingrediente y reduciendo los efectos colaterales indeseados. Aunado a lo

anterior se ha demostrado que la incorporación de macromoléculas en sistemas de tamaño nanométrico facilita su penetración a través de las barreras epiteliales y las protege de ser degradadas. Así pues, el diseño de sistemas nanoparticulados capaces de interactuar con dichas barreras se presenta como una estrategia prometedora para conseguir la penetración de principios activos a través de mucosas.

El uso potencial de las nanopartículas poliméricas como portadores de fármacos ha permitido el desarrollo de diferentes vehículos de liberación. Las principales ventajas de este tipo de sistemas estriba en su capacidad para atravesar las barreras biológicas y proteger macromoléculas (péptidos, proteínas, oligonucleótidos, genes, etc.) de la degradación en medio biológico y para liberar fármacos o macromoléculas a un sitio específico.<sup>3</sup>

## 2.- MARCO TEÓRICO

### Nanopartículas Poliméricas

Las nanopartículas se definen como suspensiones particuladas o partículas sólidas con un tamaño en el rango de entre 10 a 1000 nm, las cuales pueden contener moléculas de sustancia activa en forma disuelta, atrapada, encapsulada o enlazada a la matriz de la nanopartícula. Dependiendo del método de preparación se pueden obtener nanopartículas, nanoesferas o nanocápsulas. Convencionalmente se han reportado dos tipos de técnicas para la obtención de nanopartículas: en el primero se realiza la polimerización directa de monómeros en forma de nanopartículas, mientras que el segundo se basa en la dispersión de polímeros ya formados. Los métodos que son ejemplos típicos del segundo grupo son: salting-out, emulsificación-difusión y nanoprecipitación.<sup>4</sup> La técnica de nanoprecipitación (o desplazamiento de solvente) presenta numerosas ventajas, ya que es rápida y fácil de realizar. Además, la formación de las nanopartículas es instantánea y todo el procedimiento se lleva a cabo en un solo paso.<sup>5</sup> Sin embargo, aunque aparenta ser un proceso simple, engloba complejos fenómenos hidrodinámicos en la interfase, a la par de la separación de fases del polímero, cuyo fenómeno es el que conduce en última instancia a la formación de las nanopartículas poliméricas. Para llevar a cabo la nanoprecipitación debe contarse con un sistema de tres componentes básicos: el polímero, el solvente del polímero y el no-solvente del polímero.<sup>6</sup>

El método de nanoprecipitación se ha utilizado exitosamente con diversos materiales poliméricos.<sup>4,5,7,2,8,9</sup> El origen del mecanismo de formación de nanopartículas puede explicarse en términos de turbulencia interfacial entre dos fases líquidas no equilibradas, envolviendo procesos de flujo, difusión y superficie.<sup>7</sup> Las variables que determinan el éxito del método y la efectividad en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas obtenidas son las asociadas con las condiciones de adición de la fase solvente en la no-solvente, flujo del goteo, velocidad de agitación y la proporción solvente/no-solvente.<sup>6</sup>

Las nanopartículas son partículas sólidas de tamaño dentro del rango de 10-1000 nm que pueden proteger sustancias activas contra los procesos digestivos, restringir el acceso en determinados sitios del cuerpo y liberar dosis indicadas en sitios específicos. Es también conocido que la capacidad de estos sistemas para atravesar las barreras externas y acceder al interior del organismo depende tanto de su tamaño como de su composición. Partículas de pequeño tamaño aumentarán el grado de transporte respecto a las de un mayor tamaño, ya que pueden ser capturadas por células especializadas del sistema inmune, que no pueden capturar partículas de tamaño mayor a los 1000 nm. Así mismo, este intervalo de tamaño la relación superficie/volumen es máxima, lo que incrementa el número de partículas capturadas por unidad de superficie y por ende la interacción con mucosas.<sup>10</sup> Entre los polímeros utilizados en la obtención de nanopartículas figuran el ácido poliláctico, poliglicólico y sus derivados, policianoacrilato, poliestireno, polipropileno, gelatina y quitosana, entre otros.

## Quitosana y Nanopartículas a Base de Quitosana

La quitosana se obtiene de la desacetilación química o enzimática de la quitina, polisacárido que se encuentra de manera natural en el exoesqueleto de crustáceos. La quitosana consiste de cadenas lineales con distintas proporciones de unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina. Es un polímero natural biocompatible, biodegradable y no tóxico, por lo que representa un material muy atractivo para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos y/o compuestos biológicamente activos.<sup>11</sup> La solubilización de la quitosana ocurre mediante la protonación de los grupos amino de las unidades de D-glucosamina, por lo que se comporta como un polielectrolito en medio ácido.<sup>12</sup> Los grupos amino presentes en la cadena de quitosana reaccionan con aldehídos y cetonas para dar lugar a bases de Schiff (aldiminas y cetiminas) como se muestra en la Figura 2.1. El grupo imino formado es estable en medio neutros y alcalinos, pero se hidroliza rápidamente en medios ácidos regenerando la amina libre.<sup>13</sup>

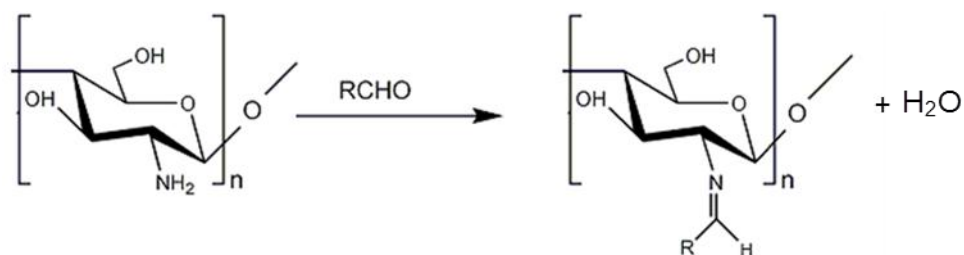


Figura 2.1.- Formación de bases de Schiff.



Debido a lo anterior, en los últimos años la literatura científica manifiesta un gran interés en la investigación de sistemas de micro/nanopartículas elaboradas a base de quitosana o sus derivados para su aplicación en el área farmacéutica, médica y cosmética. La quitosana ha sido empleada en muchas investigaciones con el objetivo de obtener nanopartículas interaccionando con diversas moléculas: cobre,<sup>14</sup> toxoide tetánico,<sup>15</sup> dextrorubicina,<sup>16</sup> ácido hialurónico,<sup>17</sup> ciclodextrina,<sup>18,19,20</sup> sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina,<sup>21</sup> también a flavonoides como quercetina<sup>22</sup> y nobiletina.<sup>23</sup>

### Métodos para la Obtención de Nanopartículas

Existen diferentes métodos para la elaboración de nanopartículas de quitosana y sus derivados. Sin embargo, la selección de alguno de éstos depende de factores como el tamaño requerido de la partícula, estabilidad química y térmica del agente activo, así como toxicidad residual asociada al producto final.<sup>24</sup>

### Formación de Partículas Mediante Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) Supercrítico

En la década pasada, la investigación en producción de partículas usando CO<sub>2</sub> supercrítico tuvo un rápido crecimiento debido a sus condiciones críticas ( $T_c=31.1$  °C,  $p_c=73.8$  bar). En este contexto, se ha dado particular atención al dióxido de carbono como fluido supercrítico debido a su estructura molecular, no es tóxico, no inflamable, químicamente inerte y además barato.<sup>25</sup>

Recientemente se han publicado métodos que utilizan CO<sub>2</sub> supercrítico para obtener nanopartículas en los cuales este puede actuar de cuatro diferentes formas: a) solvente, b) anti-solvente, c) co-solvente y finalmente d) soluto.<sup>26</sup> A consecuencia de la forma en que se utiliza el CO<sub>2</sub>, existen diferentes métodos: expansión rápida de soluciones supercríticas (RESS), impregnación con solvente supercrítico (SSI) partículas desde soluciones de gas saturado (PGSS), precipitación de antisolvente supercrítico (SAS), extracción de emulsiones por fluido supercrítico (SFEE).<sup>27</sup>

Entre los métodos más utilizados destacan: el método SAS, SAS-EM y el RESS. El SAS emplea en su operación un líquido solvente, el cual es completamente miscible en CO<sub>2</sub> supercrítico, para disolver el soluto que será micronizado.<sup>28</sup> El método SAS-EM (el cual es una modificación del método SAS) incluye un contenedor con vibración ultrasónica para aumentar la transferencia de masa. Este método se ha utilizado en la formación de nanopartículas de fosfato de dexametasona y posteriormente encapsularon estas nanopartículas en un polímero biodegradable, poli(láctico-co-glicólico).

A diferencia del SAS y el SAS-EEM, en el método RESS el fluido es presurizado y calentado hasta las condiciones supercríticas necesarias para el proceso y pasa a través del extractor que contiene un soluto para formar una solución en una sola fase. Después de esto, la solución es despresurizada en un inyector a presión atmosférica. La rápida despresurización conduce a la nucleación del soluto causado por el decremento en el poder de solvatación y la consiguiente formación de las partículas con tamaños entre 150 y 200 nm.<sup>29</sup>

## Mediante Gelificación Iónica

Las nanopartículas de quitosana pueden obtenerse de forma espontánea mediante un proceso de gelificación iónica y pueden retener en su estructura fármacos de estructuras químicas bien diferenciadas.<sup>16</sup> La formación se lleva a cabo por medio de interacciones electrostáticas entre las cadenas de quitosana cargadas positivamente y agentes entrecruzantes. El tripolifosfato (TPP) es el agente entrecruzante más utilizado.<sup>3</sup> Para llevar a cabo este procedimiento, la quitosana se disuelve en una solución acuosa ácida de manera que los grupos amino estén protonados, esta solución se añade gota a gota con agitación constante a la solución de TPP. Por ejemplo, en nanopartículas de quitosana obtenidas mediante gelificación iónica con TPP usando dos diferentes protocolos para la formación de partículas (bajo y alto contenido de TPP), los resultados indican que la cantidad de TPP en la formulación tiene mayor efecto que el peso molecular de la quitosana en la encapsulación de la proteína (insulina y toxoide tetánico).<sup>30</sup> Mediante este mismo método se han desarrollado y caracterizado nanopartículas de quitosana para liberación de siRNA, obteniendo un tamaño de partícula aproximado de 500 nm.<sup>31</sup>

Se han elaborado nanopartículas de un complejo formado por un copolímero de quitosana-N-trimetilaminoetilmetacrilato-polietilenglicol (CS-TM-PEG) y ha sido acoplado a insulina como molécula activa. La nanopartículas obtenidas mostraron un tamaño entre 200 y 400 nm.<sup>32</sup> Recientemente se han obtenido nanopartículas mediante gelificación iónica de quitosana con desoxicolato de sodio para encapsular pDNA, con tamaños de partícula entre 150 y 400 nm y potencial zeta entre +33.0 y +56.9 mV al utilizar relaciones de quitosana:desoxicolato de sodio de 1:4 a 1:0.6 (p/p). Los estudios de AFM

mostraron que las nanopartículas cargadas con pDNA presentaron una superficie más irregular debido a la interacción entre la quitosana de carga catiónica y la superficie cargada negativamente del pDNA que resulta en una estructura más compacta al compararla con las nanopartículas vacías.<sup>33</sup>

De igual manera, estudios realizados mostraron que es posible lograr sistemas no-virales biocompatibles para la entrega de genes<sup>34</sup> y virus<sup>35</sup> formulados con quitosana de alto y bajo peso molecular y plásmidos de DNA o dsDNA. Se han obtenido sistemas a base de quitosana mediante gelificación iónica con TPP, generando nanopartículas con un tamaño entre 160 y 200 nm.<sup>36</sup> De igual forma, se han producido nanopartículas de quitosana conteniendo *Naja naja oxiana* (un veneno obtenido de serpientes de India). Las partículas mostraron un diámetro de 120 a 150 nm y forma esférica, además de una eficiencia de atrapamiento entre 36-48 % utilizando una concentración inicial de 43 µg/mL.<sup>37</sup> Mediante esta misma técnica se han preparado nanopartículas mediante interacciones electrostáticas entre un complejo aniónico cisplatino-alginato con quitosana y trimetilquitosana.<sup>38</sup> Los resultados indican que las nanopartículas con el menor tamaño y el potencial zeta más bajo fueron más activas que el cisplatino sólo y mostraron una capacidad similar de inducir apoptosis en células humanas A2780.

Muchos son los estudios que demuestran el efecto de la estructura de la quitosana utilizada en la preparación de sistemas nanoparticulados.<sup>39,40,41</sup> Así como también el efecto del peso molecular de otras moléculas incluidas en la obtención de nanopartículas de quitosana. Por ejemplo, el alginato o pequeñas cadenas de ácido poligulurónico han sido usados para la formulación de micro/nanopartículas.<sup>42</sup> Este complejo se ha utilizado en un nuevo sistema

nanoparticulado a base de quitosana/TPP/alginato generado mediante entrecruzamiento iónico de quitosana/TPP y la formación del complejo polielectrolito concomitante entre quitosana y alginato.<sup>43</sup>

#### Mediante Nanoprecipitación

La técnica de nanoprecipitación (o desplazamiento de solvente) presenta numerosas ventajas, ya que es rápida y fácil de realizar. Sin embargo, aunque aparenta ser un proceso simple, puede englobar complejos fenómenos hidrodinámicos de interfase. Mediante este método ha sido posible obtener nanopartículas de almidón con rango de tamaño de 300-400 nm. El tamaño y forma de las partículas fue modulado variando los parámetros de elaboración incluyendo la adición de un surfactante.<sup>44</sup>

Para la obtención de nanopartículas mediante nanoprecipitación se requieren dos solventes que sean miscibles. Idealmente, ambos, el polímero y el compuesto bioactivo de interés, deben disolverse en el primero (el solvente). La nanoprecipitación ocurre por una rápida desolvatación del polímero cuando la solución del mismo se añade en el no-solvente. De hecho, tan pronto como el polímero contenido en el solvente difunde en el medio dispersante (no-solvente), ocurre la separación de fases a escala nanométrica, y como resultado el polímero precipita, atrapando inmediatamente al compuesto de interés. Por otra parte, se ha reconocido que junto con el proceso de separación de fases *per se* coexisten otros fenómenos tales como la turbulencia interfacial entre las dos fases líquidas no equilibradas, lo cual involucra procesos de flujo, difusión y superficie.<sup>7</sup>

Diversos factores contribuyen a la efectividad de este método, es decir, en la preparación de las nanopartículas con un rango aceptable de tamaño, forma y porcentaje de carga del compuesto activo. Entre éstos, cantidad de polímero, volumen de la fase orgánica y de la fase acuosa. También la velocidad de agitación, flujo de adición del solvente hacia el no-solvente<sup>45</sup> juegan un papel importante. Con frecuencia resulta difícil discernir el efecto de estas variables en forma individual o en combinación, para lo cual un diseño factorial puede ayudar a establecer una relación cuantitativa entre las variables de formulación y las variables de respuesta.<sup>7</sup>

## Procesos de Separación de Fases en Sistemas Poliméricos

### Teoría de Flory-Huggins

Como se mencionó anteriormente, la nanoprecipitación tiene sus fundamentos en las relaciones de fases entre los tres componentes involucrados en este proceso, las cuales se pueden deducir a partir de la energía libre de mezcla. En este sentido, la teoría termodinámica estadística de Flory-Huggins para un sistema binario polímero-disolvente ha sido empleada para analizar la separación de fases con un polímero de alto peso molecular. Es necesario, entonces, detenernos en la termodinámica de las disoluciones poliméricas, para entender bajo qué condiciones tienen lugar estos fenómenos críticos.

Una solución ideal es aquella en que la entalpía de mezcla es cero, es decir no existe cambio de energía ( $\Delta H_M = 0$ ) o volumen en el sistema ( $\Delta V_M = 0$ ) de acuerdo a la Ley de Raoult. Cuando la solución se forma por  $n_1$  moles de solvente y  $n_2$  moles de soluto (a T y p dados), el valor de  $\Delta S_M$  puede calcularse mediante la ecuación de Boltzmann, según la siguiente ecuación:

$$\Delta S_M = k \ln \Omega$$

donde,  $k$  es la constante de Boltzmann. En la solución ideal, el aumento de entropía de mezcla refleja el mayor número de arreglos que se pueden lograr en el estado de mezcla.

De esta manera, la energía libre de Gibbs y la entropía de mezcla adoptan expresiones en función de la concentración, expresadas en términos de la fracción molar:

$$\Delta G_M = RT(n_1 \ln x_1 + n_2 \ln x_2)$$

$$\Delta S_M = -R(n_1 \ln x_1 + n_2 \ln x_2)$$

En el caso de la mezcla ideal, el cambio entrópico siempre es positivo. Dicho aumento proviene del mayor número de configuraciones ( $\Omega$ ) o estados equiprobables del sistema.

El comportamiento de los polímeros con respecto a las disoluciones es característico y diferente al de las sustancias de bajo peso molecular. En el caso de polímeros se requiere la separación de largas cadenas.

Una teoría que permite evaluar la entropía configuracional de una macromolécula flexible en un solvente de bajo peso molecular fue formulada independientemente por Flory y Huggins en 1942 para las disoluciones poliméricas. En este caso, la entropía de mezcla viene dada según:

$$\Delta S = -k(N_1 \ln \varphi_1 + N_2 \ln \varphi_2)$$

donde

$$\varphi_1 = \frac{N_1}{N_1 + xN_2}, \text{ y } \varphi_2 = \frac{x N_2}{N_1 + xN_2},$$

representan las fracciones de volumen de los componentes 1 y 2 de la mezcla y  $x$  es la relación entre los volúmenes molares del soluto y del solvente, lo que lo hace proporcional al grado de polimerización.

Para un determinado polímero y una temperatura dada, algunos disolventes pueden dar lugar a disolución total, mientras que otros de forma parcial. Los primeros disolventes se clasifican como buenos mientras que los segundos como malos disolventes. Las soluciones macromoleculares se caracterizan por presentar una gran desviación del comportamiento ideal debido a la pérdida de entropía configuracional que resulta de la unión química de los segmentos en la cadena del polímero, en comparación con el caso de una configuración menos ordenada que se obtiene al dispersar un soluto de bajo peso molecular en un disolvente de bajo peso molecular.

En la práctica, son pocas las disoluciones de polímeros para las cuales la entalpía de mezcla es cero. Además, a causa de las interacciones polímero-disolvente surgen contribuciones entrópicas. Para ello se incluye una



contribución entálpica adicional, que depende del parámetro  $\chi$  (conocido como el parámetro de interacción de Flory), el cual contiene también una contribución entrópica adicional.

De esta forma, es posible llegar a la expresión:

$$\frac{\Delta G}{RT} = n_1 \ln \phi_1 + n_2 \ln \phi_2 + \chi n_1 \phi_2$$

que es la conocida ecuación de Flory-Huggins.

### Fenómenos de Separación de Fases

Si a una disolución polimérica se le disminuye progresivamente la temperatura, el disolvente se hace cada vez menos efectivo hasta que se alcanza una temperatura por debajo de la cual el polímero y el disolvente dejan de ser miscibles en todas proporciones y aparece la separación de fases. Lo anterior puede apreciarse en el diagrama de la Figura 2.2.

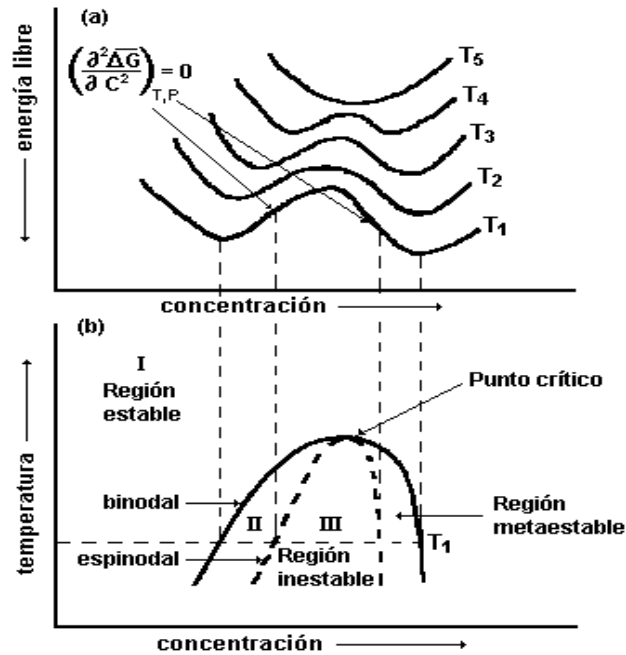


Figura 2.2.- Diagrama de fases.

En el diagrama puede apreciarse la presencia de tres regiones: I, Región estable; II Región metaestable, en la cual los cambios de fases ocurren mediante un mecanismo lento de nucleación; y III, región inestable, se presenta una rápida separación de fases. Mientras que el punto máximo de la binodal que coincide con la espinodal es el llamado punto crítico. El conocimiento del punto crítico de un sistema polímero-disolvente proporciona una buena información acerca de la mayor o menor solubilidad del polímero en el disolvente, ya que dicho punto crítico representa el máximo la curva que delimita la zona de temperaturas y composiciones dentro de la cual el sistema no es homogéneo y se separan las fases.

Una situación similar se presenta cuando a una disolución polimérica se le añade un no-solvente. El medio disolvente se hace cada vez más pobre termodinámicamente hablando, lo cual conduce a un fenómeno equivalente a cuando se empobrece el poder del disolvente por disminución de la temperatura.

Separación de fases en sistemas ternarios del tipo no solvente-solvente-polímero

Las relaciones de fase de cualquier número de componentes pueden deducirse de una expresión analítica para la energía libre de mezcla. Expresiones de este tipo han sido derivadas por varios autores, en particular Flory, Huggins y Guggenheim. Flory ha hecho un estudio basado en su expresión para la energía libre de mezcla. Dicho estudio se refiere a la separación de la solución de un polímero en dos fases son soluciones diluidas. Scott ha tratado el sistema no solvente- solvente- polímero bajo el supuesto que una mezcla de líquidos puede ser considerada como un líquido único y ha obtenido valiosos resultados cuantitativos.<sup>46</sup>

Las interacciones solvente-no solvente tienen un papel muy importante en el proceso de precipitación. Los parámetros de solubilidad son utilizados en la predicción de solubilidad de una sustancia en un solvente, ya que expresan la afinidad entre las moléculas. Un primer requerimiento es que los parámetros del soluto y del solvente no difieran demasiado, a menor diferencia mayor afinidad. Mediante los parámetros de solubilidad también es posible conocer el parámetro de interacción solvente-no solvente.<sup>4</sup>

$$\chi_{\text{solvente-no solvente}} = \frac{V_{\text{solvente}}}{RT} (\delta_{\text{solvente}} - \delta_{\text{no solvente}})^2$$

Donde  $v$  es el volumen molar del solvente,  $R$  la constante de los gases,  $T$  temperatura y  $\delta_{\text{solvente}}$  y  $\delta_{\text{no solvente}}$  son los parámetros de solubilidad del solvente y no solvente, respectivamente. La diferencia entre la proporción de solvente en las dos fases depende de parámetros de interacción, especialmente la diferencia entre  $\chi_{\text{polímero-solvente}}$  y  $\chi_{\text{polímero-no solvente}}$ . Cuando los valores de entre  $\chi_{\text{polímero-solvente}}$  y  $\chi_{\text{polímero-no solvente}}$  son casi iguales las líneas presentan una tendencia a ser paralelas a la línea de proporción del solvente. Además la composición del solvente será aproximadamente la misma en las dos fases en equilibrio.

Veamos en detalle las características de la separación de fases en sistemas ternarios del tipo: un polímero y una mezcla binaria de solventes. Para el equilibrio entre dos fases líquidas en un sistema de tres componentes deben satisfacerse las siguientes condiciones:<sup>47</sup>

$$\begin{cases} \mu_1 = \mu'_1 \\ \mu_2 = \mu'_2 \\ \mu_3 = \mu'_3 \end{cases}$$

El tratamiento de un sistema ternario no solvente-solvente-polímero puede basarse en la expresión de Flory-Huggins para la energía libre de mezcla para un sistema multicomponentes

$$\frac{\Delta G}{kT} = \sum_i n_i \ln y_i + \chi y_i (1 - y_i) \sum_i \gamma_i n_i$$

Donde  $n_i$  denota el número de moléculas del tipo  $i$ ,  $y_i$  es la fracción de sitios en retículo ocupado por el componente  $i$ , y que se define como:

$$y_i = \gamma_i n_i / \sum_i \gamma_i n_i$$

$\gamma_i$  es el número de sitios ocupados por el componente  $i$  y  $\chi$  es el parámetro de interacción de Flory.

En el Figura 2.3 se aprecia el diagrama de fases de un sistema ternario del tipo no solvente-solvente-polímero (componentes 1, 2 y 3 respectivamente), mostrando los límites de solubilidad de separación de fases para los valores diferentes valores de  $x$  y asumiendo valores de  $\chi_{23}=0$  y  $\chi_{13}=\chi_{12}=1.5$ . Las líneas de trazo corto son líneas de reparto para  $x=100$ , enlazan puntos que representan las composiciones de pares de fases en equilibrio. Las líneas de trazos largos presentan relaciones constantes solvente-no solvente, • puntos críticos y ◦ umbral de precipitación.

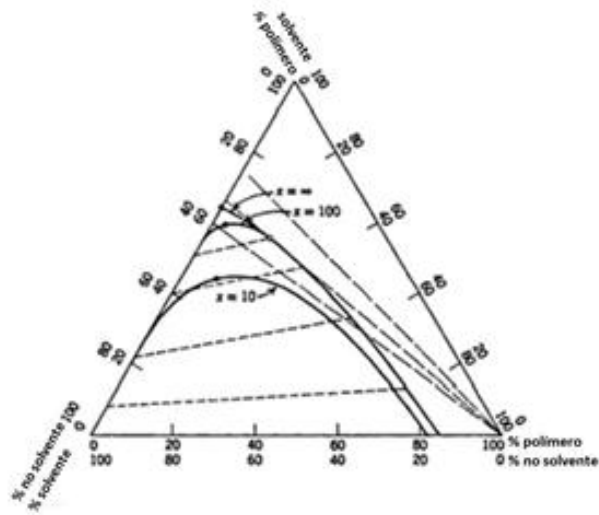


Figura 2.3.- Diagrama de fases para un sistema ternario del tipo no solvente(1)-solvente(2)-polímero(3) asumiendo  $\chi_{23}=0$  y  $\chi_{13}=\chi_{12}=1.5$  y para distintos valores de  $x$ , indicados en el gráfico. Valores calculados por Tompa.<sup>46</sup>

De esta figura se puede apreciar que la posición de la curva binodal, a lo largo de la cual las dos fases están en equilibrio, depende del peso molecular; el punto crítico límite a peso molecular infinito es el análogo de la condición  $\theta$  en un sistema de dos componentes.

En soluciones de polímeros polidispersos el umbral de precipitación no coincide con el punto crítico sino que está localizado en el extremo de la curva de nube y el punto crítico se encuentra localizado a la derecha de la espinodal. El umbral de precipitación marca la máxima temperatura (o composición en casos de sistemas ternarios) a la cual puede ocurrir la separación de fases.

En sistemas ternarios como el que nos ocupa, el umbral de precipitación es tangencial a la binodal y representa la mínima proporción solvente-no

solvente en la cual ocurre la separación de fases a una temperatura dada. Por encima de la línea de relación de solventes tangencial a la binodal, el polímero es miscible en cualquier proporción en el sistema solvente-no solvente. En la concentración designada por el umbral de precipitación (en la Figura 2.4), el sistema está en el borde de la no-homogeneidad. Un incremento en la proporción de no solvente en este punto trae consigo la separación en dos fases. Esta composición no coincide con el punto crítico, donde la composición de las fases en el equilibrio llega a ser idéntica. Esto ocurre a una mayor concentración del polímero y una menor proporción solvente-no solvente que el verdadero punto crítico. El desplazamiento del umbral de precipitación desde el punto crítico depende de los valores de los parámetros de interacción.

### Nobiletina

Los flavonoides son moléculas con una estructura de benzopirano fenólicos, las cuales sólo se producen en las plantas y se pueden dividir en seis subclases en función del tipo de heterociclo involucrado: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavonoides.<sup>48</sup>

La nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona) (Figura 4) se encuentra entre las flavonas polimetoxiladas de mayor presencia en pericarpio de cítricos (*Citrus reticulata* Blanco cv *ponkan*).<sup>49</sup> Se han identificado flavonas polimetoxiladas extraídas de pericarpio de naranja (*Citrus sinensis*), sinensetina, tetrametilescutellareina, tangeretina y principalmente nobiletina.<sup>50</sup>

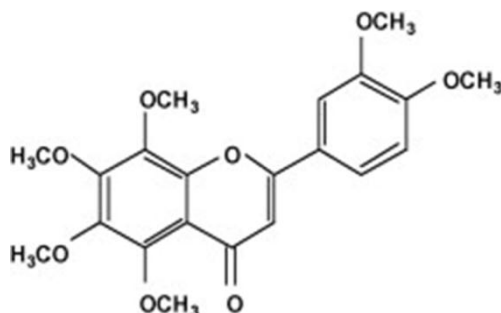


Figura 2.4.- Nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona) una polimetoxiflavona cítrica.<sup>23</sup>

Este compuesto ha tomado interés debido a sus múltiples aplicaciones en el área farmacéutica ya que posee una reconocida actividad farmacológica. Ejemplo de ello es que puede suprimir la expresión ciertos genes previniendo la iniciación y progresión de aterosclerosis.<sup>51</sup> La nobiletina ha demostrado beneficios inmunomoduladores, anticancerígenos, así como reducir las concentraciones de colesterol en plasma y prevenir la aterosclerosis a nivel de la pared vascular, entre otros beneficios.<sup>52,53</sup> La preparación de microemulsiones de nobiletina como sistemas de entrega de compuestos biactivos es una alternativa viable para aumentar la permeabilidad intestinal de nobiletina y su absorción.<sup>23</sup> Otro beneficio atribuible a la nobiletina es que mejora la producción de la proteína adiponectina, la cual es una proteína adiposito-derivada con actividad insulina-sensible, antidiabética y antiaterogénica.<sup>54</sup>



Los flavonoides cítricos exhiben capacidad de modular la respuesta inflamatoria y carcinogénesis por vía de diferentes mecanismos. En particular, la nobiletina participa en la síntesis espontánea de óxido nítrico (NO), en la actividad de succinato dehidrogenasa (SDH) y el estado redox de cobre de la citocromo C oxidasa en linfocitos de sangre humana. Existen resultados que muestran una correlación positiva entre la producción de NO y el nivel de oxidación del cobre en la citocromo oxidasa y una correlación inversa con la actividad la SDH en linfocitos de sangre humana después del tratamiento con nobiletina, demostrando así los beneficios inmunomoduladores y anticancerígenos de este flavonoide.<sup>55</sup>

#### Actividad Antiproliferativa de Nobiletina

Las flavonas polimetoxiladas, y entre éstas la nobiletina, presentan actividad antiproliferativa y pro-apoptosis en células provenientes de cáncer de seno.<sup>56</sup> Existen resultados de evaluación de actividad antiproliferativa en células cancerosas y sus respectivos valores de IC<sub>50</sub> para diversas flavonas polimetoxiladas. En el caso de la nobiletina se obtuvieron los siguientes valores de IC<sub>50</sub>, en las diferentes líneas celulares evaluadas: para A5903 1.9±2.5, MCF-7 31.7±1.8, HL-60 28.2±1.5 y HO8910 16.8±1.2 µM.<sup>49</sup> Además, al combinar nobiletina con un tratamiento de quimioterapia convencional puede presentar mejores beneficios que el fármaco solo, esto ha sido probado con células TMK-1 y MKN-45.<sup>57</sup> De igual forma, se ha detectado actividad antiproliferativa y apoptosis en células cancerosas de pulmón *in vivo* e *in vitro*.<sup>58</sup> Se ha demostrado una potencia muy fuerte de la nobiletina hacia los efectos inhibitorios de la viabilidad de células cancerosas AGS. Al comparar un grupo control con otro tratado por 24 y 48 horas con concentraciones de 1 y 2 µM, la

viabilidad de las células no se vio alterada. Sin embargo al tratarlas con 2.5-4.5  $\mu\text{M}$  se disminuyó considerablemente la viabilidad celular. Por lo tanto, se concluyó que la nobiletina es citotóxica a concentraciones mayores que 2  $\mu\text{M}$ .<sup>59</sup>

### Patentes sobre Nanotecnología y Nanopartículas de Quitosana

Un análisis sobre patentes en nanotecnología identifica a más de 400,000 registros en la Web of Science - Science Citation Index (WoSSCI) y cerca de 54,000 resúmenes de patentes concedidas en el periodo de 1990-2006, que se obtuvieron de la base de datos MicroPatents.<sup>60</sup> Otro estudio compara el número y contenidos de patentes en la Unites States Patent and Trademark Office (USPTO), la European Patent Office (EPO) y la Japan Patent Office (JPO) y muestra que en la USPTO y EPO ha habido un incremento exponencial en el número de patentes otorgadas desde 1980 mientras que en la JPO el crecimiento se ha mantenido constante.<sup>61</sup> Una búsqueda realizada en la base de datos de Patents Lens del término “chitosan AND nanoparticles” en el campo reivindicaciones arrojó un número de 61 patentes otorgadas y 271 solicitudes en Estados Unidos. De igual forma en la base de datos de la EPO se obtuvo un total de 21 patentes otorgadas en Europa.

En este contexto, los resultados de una investigación en patentes sobre nanotecnología en América Latina, centrada en Brasil, México y Argentina, indican que estos tres países contribuyeron con el 85 % del total de publicaciones en nanotecnología en la región, durante el periodo de 1990 a

2006. Si bien en estos países la actividad en investigación en nanotecnología empezó a principios de los 90's, fue hasta mediados de esa década que se empezaron a publicar sus investigaciones.<sup>60</sup>

### 3.- OBJETIVOS

Producir y caracterizar sistemas nanoparticulados de quitosana acoplados a bioflavonoides

1.-Producir nanopartículas de quitosana y de quitosana acopladas a nobiletina

2.- Caracterizar los sistemas nanoparticulados por medio de dispersión de luz, microscopía electrónica de barrido, microscopía de fuerza atómica y espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier

3.- Probar *in vitro* la capacidad antiproliferativa en células cancerosas de los sistemas nanoparticulados

## 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de las Nanopartículas

Para la preparación de las nanopartículas se utilizó quitosana marca Novamatrix (Protasan UP B 80/20, Batch BP-0806-03), peso molecular viscosimétrico  $1.1 \times 10^5$ , estimado a 25 °C (en ácido acético 0.3 M y acetato de sodio 0.2 M)<sup>62</sup> y grado de N-acetilación (DA=0.178) determinado por espectroscopía RMN <sup>1</sup>H. De acuerdo al proveedor la muestra tiene las siguientes características: cenizas 0.06 %, proteína 0.13 % y endotoxinas <43 EU/g.

El hidrocloreuro de quitosana fue preparado in situ disolviendo quitosana en agua y agregando cuidadosamente HCl en cantidades estequiométricas. Todos los reactivos y solventes (Sigma-Aldrich) fueron usados sin purificación adicional. Se utilizó agua destilada (conductividad menor a  $3 \mu\text{S cm}^{-1}$ ).

La quitosana se disolvió en cantidades adecuadas de solvente en concentraciones de 0.5 a 2 mg/mL para formar la fase solvente. Esta fase (con volúmenes en un rango de 1 a 10 mL) fue adicionada a la fase no solvente (25 ó 40 mL) mediante una aguja posicionada dos centímetros encima de la superficie a 0.86 mL/min usando una bomba peristáltica, bajo agitación magnética moderada. Este procedimiento permitió obtener proporciones no solvente:solvente entre 5:1 a 40:1. La fase no solvente fue metanol, un solvente orgánico miscible con agua en el cual la quitosana es insoluble, conteniendo o no un surfactante no iónico (Tween 80, 0.05 %) y nobiletina (0.01 %).

## Caracterización y Evaluación de Actividad Antiproliferativa y Citotoxicidad de las Nanopartículas

Las nanopartículas formadas se caracterizaron mediante los métodos descritos a continuación.

### Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

El tamaño de partícula fue estimado usando un ALV-5000 sistema de correlación digital (Langen-GmbH, Germany) equipado con láser de Argón (30 mW) a una longitud de onda  $\lambda=632$  nm, fijado a una temperatura de  $25\pm 0.1$  °C. El radio hidrodinámico promedio de las partículas en solución se midió por triplicado, cada uno en un intervalo de tiempo de 60 s y promediado con el software ALV 5000/E/WIN.

El radio hidrodinámico  $R_H$ , se obtuvo a un ángulo de incidencia de  $90^\circ$  a través de la relación Stokes–Einstein:

$$D_o = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

Donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta,  $\eta$  la viscosidad del solvente y  $D_o$  es el coeficiente de difusión a dilución finita.<sup>63</sup>

### Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Para obtener información sobre la morfología y tamaño de las nanopartículas, se empleó microscopía de fuerza atómica. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, en modo no-contacto usando un microscopio de fuerza atómica JEOL Microscope (Scanning Probe Microscope, Model JSPM 4210, Japan). Equipado con un cantiléver NSC15 MikroMasch (MikroMasch, Portland, USA). Se tomó una gota de suspensión de nanopartículas y fue secada a ambiente antes de proceder al análisis.

Las mediciones de altura y sección transversal se llevaron a cabo utilizando las imágenes obtenidas por AFM y se procesaron con el software WSxM, versión 4.0, de Nanotec Electronica S.L. (Madrid, España).<sup>64</sup>

### Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para determinar la morfología de las nanopartículas obtenidas a partir de quitosana y quitosana-nobiletina se usó un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5400, USA). Se colocaron 5 mL de cada muestra en un vial de 10 mL, los viales se colocaron en un baño de ultrasonido (20 min, 60 °C). En cada portamuestra se añadió pintura de carbon (Conductive Graphite paint Marca Ladd). Después con una pipeta pasteur se colocaron 3 gotas de muestra en cada portamuestras. Se dejó evaporar por 24 hrs. Las muestras se observaron empleando un microscopio electrónico de barrido JEOL 6360LV en alto vacío a una aceleración de voltaje de 20 KV y un spot size de 11.

## Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

Para evaluar la interacción de la quitosana y nobiletina se utilizó un espectrómetro Nicolet Protégé 460 E.S.P (Nicolet Instrument Corp. Madison, WI). Se tomó 1 mg de muestra seca de nanopartículas y se mezcló con KBr en una proporción 1:100. Las pastillas se formaron en forma manual en una prensa hidráulica a 6000 psi de presión (International Crystal Laboratories, 12 Ton E-Z Press). Los espectros se colectaron en modo de transmisión desde 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$ , con un total de 64 scans.

## Eficiencia de Encapsulamiento

Las muestras obtenidas fueron concentradas en un rotavapor Marca IKA RV 10 Basic, a una temperatura de 36 °C, hasta obtener una suspensión opalescente. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron en una centrifuga Thermo Scientific Sorval Biofuge Straros, Germany, utilizando un rotor 24x1.5 mL thermoscientific 3331 a 10,000  $\times g$ , 30 minutos a 25 °C, posteriormente se separó el sobrenadante para evaluar la cantidad de nobiletina no asociada a la quitosana. La determinación de nobiletina se analizó usando un equipo HPLC Marca Varian proStar, Modelo 210, equipado con una columna Varian Microsob-MV 100-5 C18 de 10 cm x 4.6 mm de D.I., y un detector UV Visible proStar para la identificación y cuantificación de nobiletina. Los solventes usados fueron agua grado HPLC (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La relación de solventes fue de 60 % de A y 40 % de B, la duración del análisis 8 minutos.<sup>65</sup> La columna se operó a temperatura ambiente y el flujo se estableció en 1.25 mL/min con un volumen de inyección de la muestra de 20  $\mu\text{l}$ . Los



compuestos fueron analizados a una longitud de onda de 340 nm. La curva de calibración de nobiletina fue en el rango de 0-100 µg/mL (  $r=0.999$ ).

#### Actividad Antiproliferativa y Citotoxicidad

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron las líneas celulares de ratón: RAW 264.7 (Abelson murine leukemia virus-induced tumor) y L-929 (subcutaneous connective tissue). Los cultivos se mantuvieron en el medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado al 5 % con suero fetal bovino (SIGMA St. Louis, MO), inactivado mediante calentamiento.

Las líneas celulares fueron incubadas a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 80-90 % en una incubadora BINDER Inc (North America). Se evaluó el efecto antiproliferativo del estándar de nobiletina, nanopartículas de quitosana y nanopartículas de quitosana/nobiletina. Se realizaron ensayos de proliferación celular partiendo de cultivos en fase de crecimiento logarítmico; se obtuvieron suspensiones celulares de 200,000 células/mL, las cuales fueron incubadas en placas de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. USA) en presencia de diferentes concentraciones de las muestras a evaluar. Los cultivos celulares se incubaron a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 80-90 % en una incubadora BINDER Inc (North America) por un periodo de 48 horas. En las últimas 4 horas de incubación se añadió MTT a una concentración final de 5.0 mg/mL para determinar la proliferación celular.<sup>66</sup>

## **5.-RESULTADOS**

## 5.1.- Preparación de Nanopartículas de Quitosana mediante Nanoprecipitación.

## Preparation of Chitosan Nanoparticles by Nanoprecipitation

A.G. Luque-Alcaraz<sup>1</sup>, J. Lizardi<sup>2</sup>, F.M. Goycoolea<sup>3</sup>, M. Valdez<sup>4</sup>, I. Higuera-Ciapara<sup>5</sup>, W. Argüelles-Monal<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, Coordinación Regional Guaymas, Carret. al Varadero Nacional Km 6.6, Guaymas, Sonora, Mexico

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, Coordinación Hermosillo, Carret. a la Victoria Km 0.6, Hermosillo, Sonora, Mexico

<sup>3</sup> Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Westfälische Wilhelms Universität - Münster, Münster, Germany

<sup>4</sup> Universidad de Sonora, Depto. de Física, Hermosillo, Sonora, Mexico

<sup>5</sup> Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, Mexico

\* To whom correspondence should be addressed. Fax: +52 (622) 225 28 20 Tel. +52 (622) 225 28 28 E-mail: waldo@ciad.mx

## ABSTRACT

Chitosan nanoparticles were prepared by nanoprecipitation and the influence of the process parameters on their characteristics studied. With this aim chitosan was dissolved in water as N-(methylsulfonic acid) chitosan or directly in aqueous acetic acid. Methanol was used as the nonsolvent diffusing phase. Nanoparticles became smaller as the polymer concentration decreased or the nonsolvent to solvent ratio increased. Particles prepared in acidic media are slightly larger than those precipitated from N-(methylsulfonic acid) chitosan. Replacement of methanol by water in the suspension medium resulted in a notorious increase in their size. On the other hand, very little additions of Tween-80 to the nonsolvent phase render smaller nanoparticles, with a mean-size value very similar at every ratio between the phases. Nanoparticles precipitated in methanol have roughly the same dimensions, regardless of the ionic strength of the chitosan solution.

**Keywords:** chitosan; nanoprecipitation; nanoparticles; particle-size distribution

## **1. Introduction**

During the past few years, there has been a considerable interest in the use of polymeric nanoparticles as carriers of bioactive molecules. These systems have the ability to cross biological barriers and to protect the active molecules such as peptides, proteins, oligonucleotides or genes from degradation in the biological milieu, while delivering the bioactive molecules to the proper specific site (López-León, Carvalho, Seijo, Ortega-Vinuesa, & Bastos-González, 2005). Nanoparticles have been described as colloidal solids with a diameter ranging from 1 to 1000 nm consisting of macromolecules on which drugs may be adsorbed or chemically-bound (Rao & Geckeler, 2011).

There is an increasing interest in investigating these submicron particles due to their potential capacity for carrying drugs, targeting systems and overcoming the typical problems of conventional drug delivery systems due to the stability, dissolution, gastrointestinal mucosa irritation or the disagreeable organoleptic properties of the active substances used. Consequently, the preparation method is a key step for ensuring that particles behave according to the intended use (C E Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2011). The properties of polymeric nanoparticles have to be optimized depending on the particular

application. In order to achieve the properties of interest, the mode of preparation plays a vital role. Thus, it is highly advantageous to have preparation techniques at hand to obtain polymeric nanoparticles with the desired properties for a particular application. Although some information regarding preparation techniques of polymeric nanoparticles is available, it is scattered in the literature and restricted to a few areas (Rao & Geckeler, 2011).

Two main physicochemical routes have been reported for the preparation of nanoparticles. The first technique comprises the polymerization of monomers, while the second relies on the dispersion of previously-synthesized polymers. Typical examples of this group comprise ionic gelation, salting-out, emulsification-difusion and nanoprecipitation procedures (Calvo, Remunan-Lopez, Vila-Jato, & Alonso, 1997; C E Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010).

Nanoprecipitation, also known as solvent-displacement technique, provides numerous advantages over other methods. It is rapid and easy to carry out. Nanoparticle formation is instantaneous and the procedure takes place in one-step approach (Bilati, Allémann, & Doelker, 2005). However, nanoprecipitation involves complex hydrodynamic and phase separation processes. The mechanism of nanoparticle formation can be explained in terms of interphase turbulence between two liquid phases involving flow processes,

diffusion and surface interactions at a non-equilibrium stage (Derakhshandeh, Erfan, & Dadashzadeh, 2007). The formation of submicron particles depends on the combination of operating conditions, the composition of the organic and aqueous phases (since it determines their physicochemical properties) and the physicochemical interactions between phases. The extent of their participation is still unclear, though it appears that one prevails over another depending on their interrelationship (C E Mora-Huertas, Fessi, et al., 2011; Claudia Elizabeth Mora-Huertas, Garrigues, Fessi, & Elaissari, 2011).

During the nanoparticle formation process the bioactive molecule is dissolved, entrapped, encapsulated or bounded to a matrix. Such a matrix can be obtained from various natural or synthetic polymers including, for example, anionic copolymers based on methacrylic acid and ethyl acrylate (Galindo-Rodriguez, Allémann, Fessi, & Doelker, 2004), poly-D-L-lactide-co-glicolide polymers (Bilati et al., 2005; Derakhshandeh et al., 2007), dextran hydrophobic derivatives (Aumelas, Serrero, Durand, Dellacherie, & Leonard, 2007), poly-D-L-lactic acid (Legrand et al., 2007), polyvinyl alcohol (Wu et al., 2008), chitosan-poly-D-L-lactic acid (PLA) (X.-B. Yuan et al., 2008), among others.

Polysaccharide-based nanoparticles nowadays represent a very promising drug delivery platform, particularly for the transmucosal delivery of



bioactive macromolecules. Their usefulness relies on a number of interesting properties, namely, muco- and bioadhesiveness, a high capacity to associate and release therapeutic macromolecules in their bioactive form, as well as their ability to enhance the transport of bioactive compounds across well-organized epithelial barriers, such as the ocular, nasal and intestinal routes (Goycoolea, Lollo, Remuñan Lopez, Quaglia, & Alonso, 2009).

Chitosan is obtained from the chemical or enzymatic deacetylation of chitin, the major polysaccharide component of crustacean exoskeleton. Chitin is comprised by chains with different proportions of glucosamine and N-Acetylglucosamine (Roberts, 1992). Chitosan has been shown to be a biocompatible, biodegradable and non-toxic natural polymer which possesses various desirable properties for the manufacture of drug-release systems (Kurita, 2006). Chitosan has the ability to interrupt the intercellular connections thus increasing their permeability (Smith, Wood, & Dornish, 2004). Furthermore, Huang *et al.* assessed the mechanism of cellular penetration by chitosan molecules and chitosan nanoparticles and found that they easily penetrate A549 cells without cytotoxic properties. They concluded that the degree of deacetylation had more influence than the molecular weight on cellular penetration (M. Huang, Khor, & Lim, 2004).

Recently, researches have attempted to study chitosan nanoparticles as follows: preparation, modification, properties of loading various drugs and their physiological characters. Goycoolea *et al.* obtained a new type of hybrid chitosan-tripolyphosphate-alginate nanoparticle generated by the concomitant ionic cross-linking of chitosan to tripolyphosphate, this system was able to associate insulin, with efficiencies up to 50.7 % and release it *in vitro* (Goycoolea et al., 2009).

Wilson *et al.* prepared tacrine-loaded chitosan nanoparticles by spontaneous emulsification. Nanoparticles prepared by this method showed good drug-loading capacity and the *in vitro* release studies indicated that after the initial burst, all the drug-loaded batches provided a continuous and slow release of the drug (Wilson et al., 2010).

The aim of this paper is to revisit the nanoprecipitation processes for preparing chitosan nanoparticles and to evaluate the influence of the preparation conditions on their characteristics.

## **2. Experimental part**

### *2.1. Materials*

A commercial chitosan sample was supplied by NovaMatrix (Protasan UP B 80/20, Batch BP-0806-03). Its viscosity-average molecular weight was  $1.1 \times$

$10^5$ , estimated at 25 °C in 0.3 M acetic acid/0.2 M sodium acetate (Rinaudo, Milas, & Le Dung, 1993) and the degree of N-acetylation (DA = 0.178) was determined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. According to the supplier, this sample has the following characteristics: Ash content 0.06 %, protein content 0.13 % and endotoxins < 43 EU/g.

Chitosan hydrochloride was prepared *in situ* by dissolving chitosan in water after carefully adding a stoichiometric amount of hydrochloric acid.

All other reagents and solvents (Sigma-Aldrich) were used without further purification. Experiments were carried out with distilled water (conductivity lower than  $3 \mu\text{S cm}^{-1}$ ).

## *2.2. Nanoparticle preparation*

The polymer was dissolved in a suitable solvent at concentrations from 0.5 to 2 mg/mL to form the diffusing phase. This phase (with volumes typically ranging from 1 to 10 mL) was then added to the dispersing phase (25 or 40 mL) by means of a needle positioned just two centimeters above the surface at 0.86 mL/min using a peristaltic pump, under moderate magnetic stirring. This procedure allowed nonsolvent to solvent ratios between 5:1 to 40:1. The dispersing phase was methanol, an organic solvent miscible with water in which

the polymer is insoluble –the nonsolvent– optionally containing a nonionic surfactant (Tween 80 at a concentration 0.05 %). The freshly formed nanoparticles were characterized by various means described hereafter. The above procedure was used, unless otherwise stated.

### 2.3. Dynamic Light Scattering (DLS)

Particle size and polydispersity were determined by Dynamic Light Scattering (DLS). A digital correlation system ALV-5000 (ALV-GmbH, Langeln, Germany) equipped with an Argon laser (30 mW;  $\lambda_0 = 632$  nm) was used at  $25 \pm 0.1$  °C.

The Refractive Index was measured in a refractometer Model RE4OD (Mettler Toledo). The hydrodynamic radius  $R_H$ , was obtained at an incident angle of  $90^\circ$  using the Stokes–Einstein equation:

$$D_0 = k_B T / 6\pi\eta R_H,$$

where  $D_0$  is the diffusion coefficient,  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the absolute temperature and  $\eta$  is the viscosity of the solvent.

#### *2.4. Atomic Force Microscopy (AFM)*

The experiments were conducted at room temperature in a non-contact mode using a JEOL microscope equipped with a silicon cantilever NSC15 from MikroMasch (MikroMasch, Portland, USA). A drop of chitosan nanoparticle suspension was placed on mica and dried under atmospheric conditions before proceeding for analysis. The experiment was carried out using an Atomic Force JEOL Microscope (Scanning Probe Microscope, Model JSPM 4210, Japan).

Height and cross-sectional size measurements were carried out from AFM images with WSxM software, version 4.0, from Nanotec Electronica S.L. (Madrid, Spain) (Horcas et al., 2007).

#### *2.5. Scanning Electron Microscopy (SEM)*

Five milliliters of each sample were placed in a 10-mL vial and sonicated for 20 minutes at 60 °C. Three drops of the sample were placed on the sample holder using highly conductive graphite paint as adhesive to fix the sample and allowed to dry for 24 hours. The morphology of the samples was studied by scanning electron microscopy in a JEOL 6360LV microscope (Jeol Inc., Peabody, MA, USA) in high vacuum mode, operating at 20 KV and a spot size 11.

### 3. Results and discussion

Chitosan is normally insoluble in water at neutral pH. Thus, it requires the addition of acid for solubility. Under these conditions, chitosan behaves as a cationic polyelectrolyte as the free amine groups are protonated giving rise to the corresponding salt. In recent years, Roberts has proposed a novel “solvent system”, which permits chitosan to be readily dissolved in water (Roberts, 2003). By this approach, chitosan reacts with sodium formaldehyde bisulfite in aqueous media and is converted into a strong anionic polyelectrolyte N-(methylsulfonic acid) chitosan, which chemical structure is  $\text{Chit-NHCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ . In our case, chitosan was dissolved in both, 2 % aqueous acetic acid and in 3 % sodium formaldehyde bisulfite.

Figure 5.1.1 shows the average particle size obtained, when chitosan nanoparticles were prepared as N-(methylsulfonic acid) chitosan using polymer solutions at 0.5 and 2 mg/mL and different nonsolvent to solvent ratios. It could be appreciated that the higher the polymer concentration, the greater the average particle size. This effect is particularly evident when nanoparticles were prepared from a chitosan solution with concentration of 2 mg/mL. In this case particles were markedly large ranging between 980 and 1900 nm. It is also

noted that, regardless of the polymer concentration, there is a tendency in the mean size to slightly diminish with increases in the amount of nonsolvent during the precipitation. This behavior is apparent for both, chitosan dissolved in acetic acid and N-(methylsulfonic acid) chitosan in aqueous solution at neutral pH. In the same Figure it could be perceived that under same experimental conditions (polymer concentration and nonsolvent to solvent ratio), particles prepared in acidic media are larger than those precipitated from N-(methylsulfonic acid) chitosan.

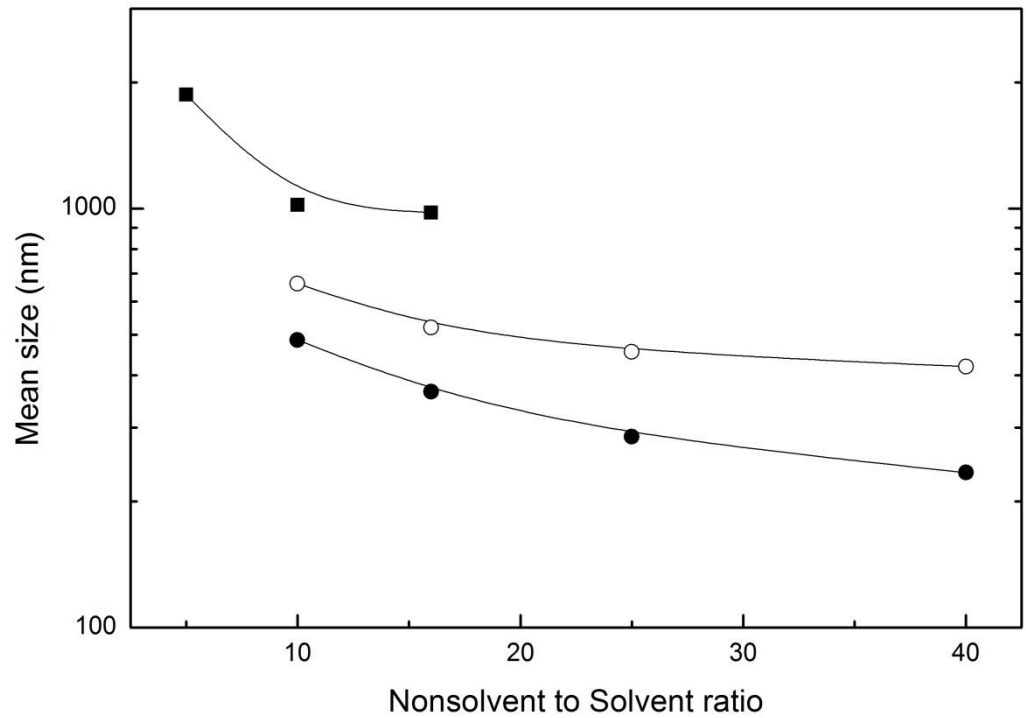


Figure 5.1.1.- Effect of type of chitosan solution, polymer concentration and nonsolvent to solvent ratio on the mean size of nanoparticles. 2 mg/mL (squares), 0.5 mg/mL (circles). N-(methylsulfonic acid) chitosan (filled symbols) and 2 % aqueous acetic acid (open symbols).

Figure 5.1.2a and 5.1.2b show the DLS profiles, AFM images, and line-scan profiles of nanoparticles obtained from acetic acid and N-(methylsulfonic acid) chitosan, respectively. The differences in size and shape are evident. The sample previously dissolved in acetic acid gives almost



spherical-shape particles with satisfactory size dispersion. These particles are seen as round objects with diameter of 290 nm and height of 13 nm, probably due to the drying effect. On the other hand, N-(methylsulfonic acid) chitosan particles are steeper in shape with diameter of 230 nm and height of 23 nm. They present a narrower size distribution.

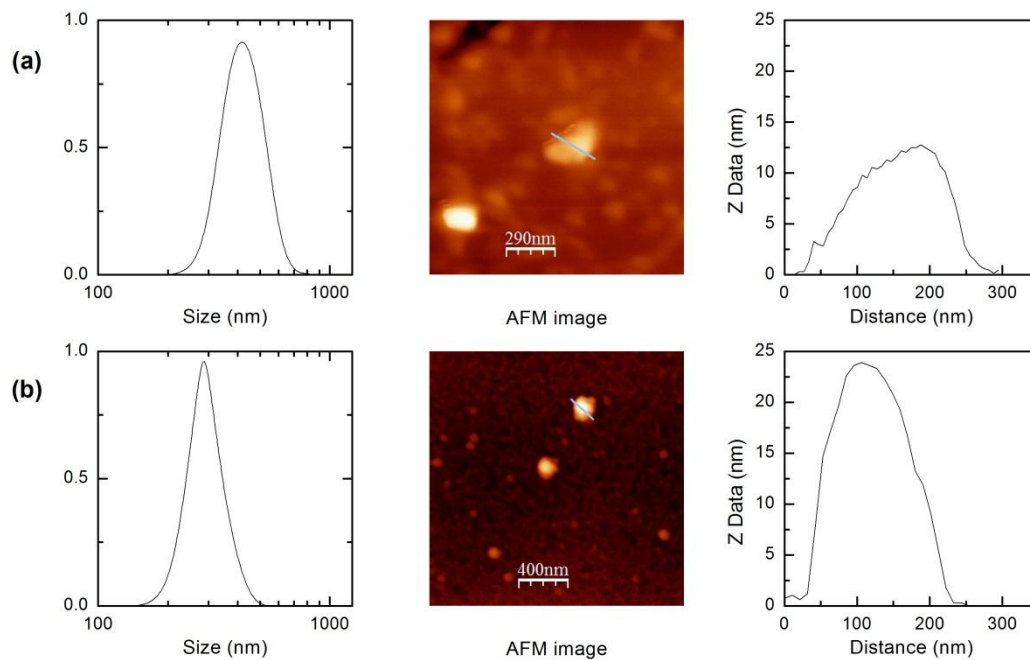


Figure 5.1.2.- Effect of type of chitosan solution on the characteristics of nanoparticles (DLS distribution, AFM image and line scan profile of the nanoparticle indicated in the image). Polymer concentration: 0.5 mg/mL; Nonsolvent to solvent ratio: 40:1. (a) 2 % aqueous acetic acid and (b) N-(methylsulfonic acid) chitosan.

Given the similarity in behavior of both nanoparticulate systems, thereafter the work was carried out only with chitosan dissolved in dilute acetic acid at 0.5 mg/mL. This is a cleaner and lower-cost process.

One of the drawbacks of preparing chitosan nanoparticles for biomedical purposes by this method is the presence of methanol in the suspension. In order to avoid it, an attempt was made to replace methanol by water. It was accomplished by a simple rotatory evaporation under vacuum at 55 °C and further re-suspended with water up to the original volume. This procedure was repeated four times for each sample. Figure 5.1.3a shows the effect of this process on the characteristics of the final particles. There is a notorious increment in the particle size, irrespective of the nonsolvent to solvent ratio employed during the precipitation.

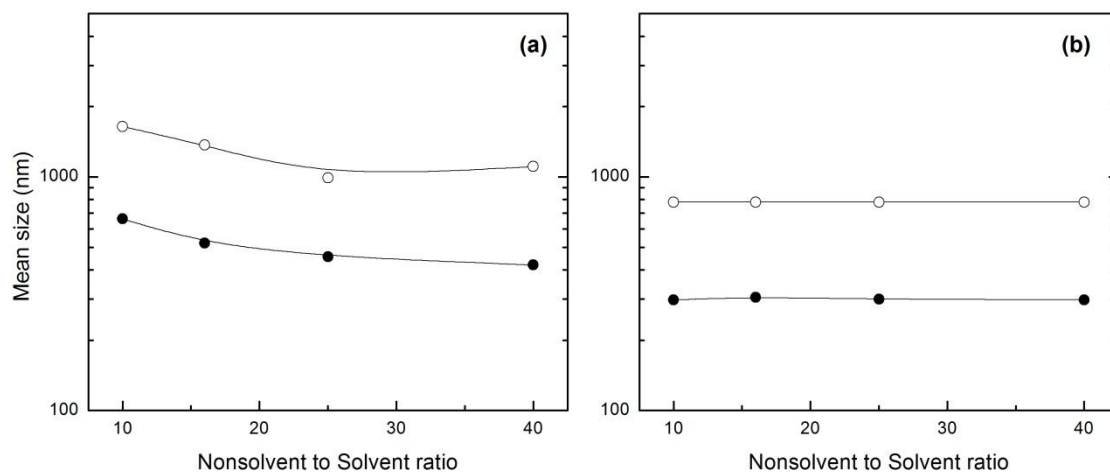


Figure 5.1.3.- Effect of replacing methanol by water in the suspension medium on the mean size of nanoparticles at different nonsolvent to solvent ratios. Original methanol (filled circles), water suspension (open circles). Polymer concentration: 0.5 mg/mL in 2 % aqueous acetic acid. (a) Without addition of surfactant and (b) with Tween 80 added to methanol before the nanoprecipitation. Surfactant concentration: 0.05 %.

The addition of surfactants to the nonsolvent phase has been reported to provide stability to nanoparticulate systems. Thus, Tween 80 was added to the methanol phase at a 0.05% concentration. Results from these experiments are

summarized in Figure 3b, where a decrease in particle size could be seen, and at the same time, a clear tendency to render the same particle size regardless of the amount of nonsolvent used for the precipitation. A similar behavior has been observed for other polymer nanoparticles prepared by nanoprecipitation (C E Mora-Huertas, Fessi, et al., 2011), e.g., poly(D,L-lactide)/Pluronic F-68 (Chorny, Fishbein, Danenberg, & Golomb, 2002), hydrophobic molecules (Lannibois, Hasmy, Botet, Aguerre Chariol, & Cabane, 1997) and starch/Tween 80 (Chin, Pang, & Tay, 2011). Nevertheless there are some other systems in which the addition of surfactants has no effect on the particle size as is the case of poly(lactic-co-glycolic acid) (Bilati et al., 2005). It has also been recognized that surfactants improve the stability of nanoparticulate systems (Vauthier & Bouchemal, 2009). The apparent contradictory role of surfactant indicates that their effect depends of the type of specific surfactant-polymer binding. In our case, it should occur mainly through hydrogen-bonding interactions between oxyethylene moieties of the surfactant and hydroxyl groups of chitosan.

Re-suspended chitosan/Tween 80 system renders nanoparticles with diameters around 600-700 nm, spherical in shape and smooth surface as evidenced from the scanning electron microscopy (Figure 5.1.4).

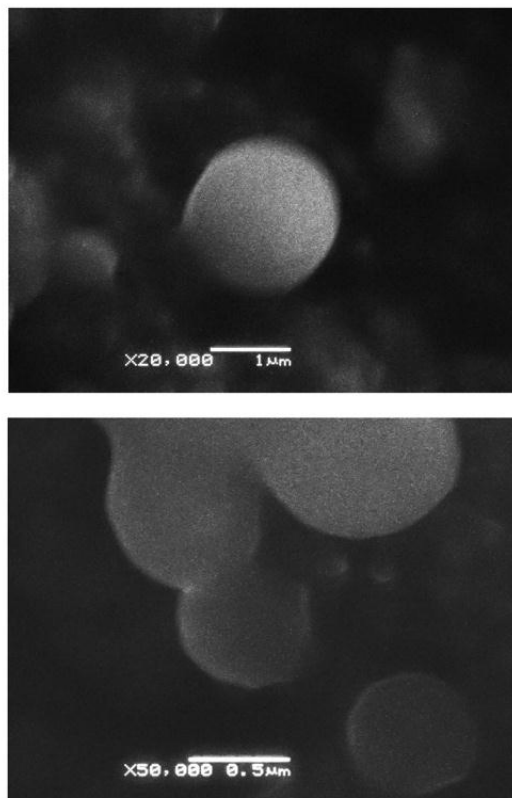


Figure 5.1.4.- Micrographs of re-suspended chitosan/Tween 80 system obtained by SEM. Polymer concentration: 0.5 mg/mL in 2 % aqueous acetic acid; nonsolvent to solvent ratio 40:1.

Frequently it is necessary to keep the nanoparticulate system during long periods and the most suitable way to achieve it is to freeze-dry the sample. With this aim, the influence of this process was also evaluated. Samples, in which methanol was replaced with water by the abovementioned procedure were lyophilized. Prior to being characterized, the dried sample was resuspended in

the same volume of water and sonicated (five one-minute cycles, 42 kHz). There is a slight tendency to increase the mean size of the particles (Figure 5.1.5). AFM image and line profile evidences that these particles are more irregular with sizes of 600 nm and height of 38 nm.

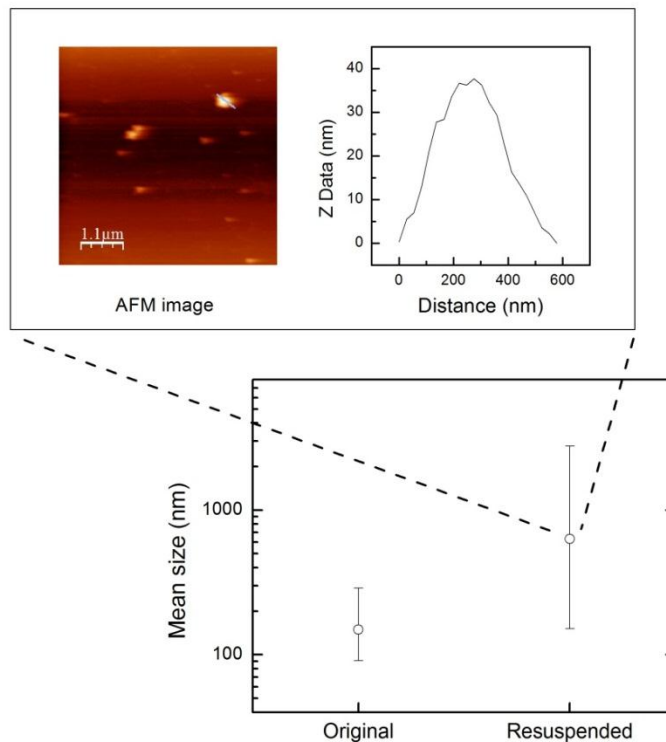


Figure 5.1.5.- Effect of the resuspension of freeze-dried nanoparticles in water on the mean size of nanoparticles. Polymer concentration: 0.5 mg/mL in 2 % aqueous acetic acid; nonsolvent to solvent ratio 40:1. Inside the graph is the AFM image and line scan profile of the resuspended nanoparticle indicated in the image.

Figure 5.1.6 summarizes the results obtained to assess the influence of the ionic strength of chitosan solutions, as well as the type of the nonsolvent used during the precipitation. The differences between nanoparticles obtained when using different nonsolvent phases are evident (left and right panels in Figure 6). In general, nanoparticles prepared by precipitation in acetone result in sizes up to 6  $\mu\text{m}$ , which are far from the nanoscale region. Galindo-Rodríguez *et al.* provide a serious discussion about the role of nonsolvent-solvent interaction parameter on the phase-separation processes that take place during the complex nanoprecipitation procedure (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004). According to their analysis, the lower the  $\chi_{\text{organic solvent-water}}$  value, the smaller the particle size during the nanoprecipitation. Even when our system was the opposite to theirs (organic soluble polymer precipitated in water), the  $\chi_{\text{water-organic solvent}}$  keeps the same value and physical meaning. The acetone-water pair presents the higher value of the interaction parameter and renders the larger chitosan particles.

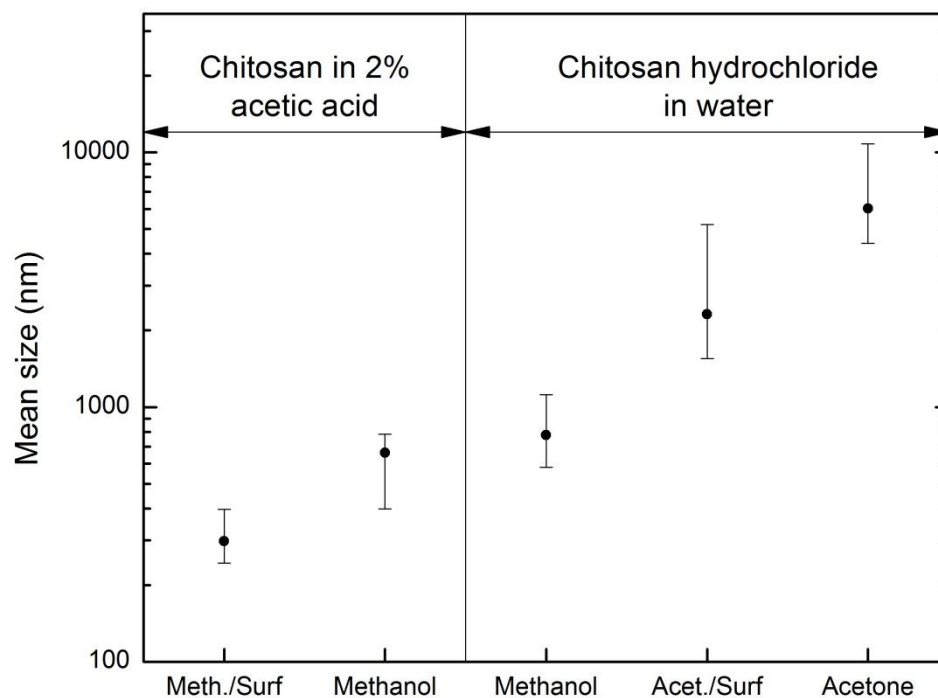


Figure 5.1.6.- Effect of the nonsolvent employed during nanoprecipitation on the mean size of nanoparticles, as indicated in the figure. Left-hand panel: chitosan dissolved in 2 % aqueous acetic acid; Right-hand panel: chitosan hydrochloride dissolved in water. Polymer concentration: 0.5 mg/mL; nonsolvent to solvent ratio 10:1 (if labeled, surfactant was dissolved in the nonsolvent phase at 0.05 %).

It is known that the polymer-solvent interaction parameter characterizes the energy of interaction of polymer segments with solvent molecules within the Flory-Huggins theory. It is the only way to take into account the specific



chemical nature and interactions between polymer and solvent. This parameter allows the thermodynamic treatment of the polymer-solvent mixing process, and also the phase separation phenomena (Flory, 1953; Tompa, 1949).

A chitosan solution in 2 % aqueous acetic acid has a high ionic strength as result of a substantial excess of acetic acid: the concentration of chitosan amine groups is 2.4 mM, while that of acetic acid is 333 mM. This condition screens the electrostatic repulsions between the ionic groups of chitosan and should induce a strong reduction of the hydrodynamic volume of the polyelectrolyte. Nevertheless, nanoparticles precipitated in methanol have roughly the same dimensions, regardless of the ionic strength of the chitosan solution (left and right panels in Figure 5.1.6).

The value of  $\chi$  for chitosan in 2 % acetic acid has been experimentally estimated as -0.01, and it is interesting to note that the addition of salt does not change the value of  $\chi$  and therefore, it does not affect the excluded volume interaction (Safronov, 2002). According to our results, there are no differences between nanoparticles obtained from low or high ionic strength chitosan solution, using methanol as the nonsolvent phase. Even though there is no information about the precise role of the polymer-solvent interaction parameter on the nanoprecipitation, the coincidence between the behavior of the Flory's

interaction parameter and the dimensions of nanoparticles at different salt concentrations is clearly seen.

Finally, as has already been discussed, the effect of the surfactant – reducing the particle size when using either methanol or acetone as the nonsolvent (Figure 5.1.6)– is also clear.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Silvia Andrade and Goreti Campos, from the Scanning Electron Microscopy Laboratory at CICY, for their contribution to the SEM studies. This work was financed by CONACYT-SALUD-2008-C01-87324 project, Mexico. ALA thanks CONACYT for her PhD grant.

## REFERENCES

- Aumelas, A., Serrero, A., Durand, A., Dellacherie, E., & Leonard, M. (2007). Nanoparticles of hydrophobically modified dextrans as potential drug carrier systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59, 74-80.
- Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 67-75.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125-132.
- Chin, S. F., Pang, S. C., & Tay, S. H. (2011). Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1817-1819.
- Chorny, M., Fishbein, I., Danenberg, H. D., & Golomb, G. (2002). Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of Controlled Release*, 83, 389-400.

- Derakhshandeh, K., Erfan, M., & Dadashzadeh, S. (2007). Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66, 34-41.
- Flory, P. J. (1953). *Principles of Polymer Chemistry* (p. 688). Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428-1439.
- Goycoolea, F. M., Lollo, G., Remuñan Lopez, C., Quaglia, F., & Alonso, M. J. (2009). Chitosan-Alginate Blended Nanoparticles as Carriers for the Transmucosal Delivery of Macromolecules. *Biomacromolecules*, 10(7), 1736-1743.
- Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J. M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., & Baro, a M. (2007). WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *The Review of scientific instruments*, 78(1), 013705.

- Huang, M., Khor, E., & Lim, L.-yong. (2004). Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles : Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 344-353.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 8(3), 203-26.
- Lannibois, H., Hasmy, A., Botet, R., Aguerre Chariol, O., & Cabane, B. (1997). Surfactant Limited Aggregation of Hydrophobic Molecules in Water. *Journal de Physique II France*, 7(2), 319-342.
- Legrand, P., Lesieur, S., Bochot, A., Gref, R., Raatjes, W., Barratt, G., & Vauthier, C. (2007). Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*, 344, 33-43.
- López-León, T., Carvalho, E. L. S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J. L., & Bastos-González, D. (2005). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283, 344-351.
- Mora-Huertas, C E, Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142.

- Mora-Huertas, C E, Fessi, H., & Elaissari, A. (2011). Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science*, 163, 90-122.
- Mora-Huertas, Claudia Elizabeth, Garrigues, O., Fessi, H., & Elaissari, A. (2011). Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: Comparative study. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, *In Press*, 5 pp.
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887-913. Elsevier Ltd.
- Rinaudo, M., Milas, M., & Le Dung, P. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International journal of biological macromolecules*, 15(5), 281-285.
- Roberts, G. A. F. (1992). *Chitin Chemistry* (1st ed., p. 368). London: The Macmillan Press Ltd.
- Roberts, G. A. F. (2003). Chitosan condensation products, their preparation and their uses.

- Safronov, A. (2002). Flory–Huggins parameter of interaction in polyelectrolyte solutions of chitosan and its alkylated derivative. *Polymer*, 43(3), 743-748.
- Smith, J., Wood, E., & Dornish, M. (2004). Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. *Pharmaceutical Research*, 21(1), 43-49.
- Tompa, H. (1949). Phase relationships in polymer solutions. *Transactions of the Faraday Society*, 45, 1142-1152.
- Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 26(5), 1025-58.
- Wilson, B., Samanta, M. K., Santhi, K., Kumar, K. P. S., Ramasamy, M., & Suresh, B. (2010). Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 6(1), 144-152.
- Wu, T.-H., Yen, F.-L., Lin, L.-T., Tsai, T.-R., Lin, C.-C., & Cham, T.-M. (2008). Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 346, 160-168.
- Yuan, X.-B., Yuan, Y.-B., Jiang, W., Liu, J., Tian, E.-J., Shun, H.-M., Huang, D.-H., et al. (2008). Preparation of rapamycin-loaded chitosan/PLA

nanoparticles for immunosuppression in corneal transplantation.  
*International journal of pharmaceutics*, 349(1-2), 241-8.



## 5.2.- Caracterización y Actividad Antiprolifativa de Nanopartículas de Quitosana Cargadas con Nobiletina.

Characterization and Antiproliferative Activity of Nobiletin-Loaded Chitosan  
Nanoparticles

Ana G. Luque-Alcaraz<sup>1</sup>, Jaime Lizardi<sup>2</sup>, Francisco M. Goycoolea<sup>3</sup>, Miguel A. Valdez<sup>4</sup>, Ana L. Acosta<sup>5</sup>, Simón B. Iloki<sup>5</sup>, Lidianys M. Lewis<sup>5</sup>, Inocencio Higuera-Ciapara<sup>6</sup>, Waldo Argüelles-Monal<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, Coordinación Regional Guaymas, Carret. al Varadero Nacional Km 6.6, Guaymas, Sonora, Mexico

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, Coordinación Hermosillo, Carret. a la Victoria Km 0.6, Hermosillo, Sonora, Mexico

<sup>3</sup> Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Westfälische Wilhelms Universität - Münster, Münster, Germany

<sup>4</sup> Universidad de Sonora, Depto. de Física, Hermosillo, Sonora, Mexico

<sup>5</sup> Laboratorio de Investigación en Bioactivos y Alimentos Funcionales, Hermosillo, Sonora, Mexico

<sup>6</sup> Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, Mexico

Correspondence to: W. Argüelles-Monal (E-mail: [waldo@ciad.mx](mailto:waldo@ciad.mx))

## **ABSTRACT**

Nobiletin is a citrus polymethoxyflavonoid which possesses an extensive range of pharmacological activities particularly a remarkable anti-proliferative effect. In order to overcome its low aqueous solubility and chemical instability, the use of nanoparticles as carriers has been proposed. Chitosan is a cationic polysaccharide with mechanical and functional properties that allow the preparation of suitable nanoparticles for biomedical applications. Thus, this investigation was intended to explore the possibility to bound nobiletin to chitosan nanoparticles, as well as to evaluate their anti-proliferative activity. The association and loading efficiencies of nobiletin in chitosan nanoparticles are 69.1 % and 7.0 %, respectively. The formation of imine bond between chitosan amine groups and the carbonyl group of nobiletin, via Schiff base, is proposed based on FTIR spectroscopy analysis. Nobiletin-loaded chitosan nanoparticles exhibit considerable inhibition ( $IC_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$ ) of cancerous cells which reveals the great potential for applications of this new nobiletin system in cancer chemotherapy.

**KEYWORDS** chitosan; nobiletin; nanoparticles; anti-proliferative activity

## INTRODUCTION

Flavonoids are a large class of compounds that have a common chemical structure. They occur widely in nature and most of them possess biological and pharmacological activities.<sup>1</sup> Due to this, flavonoids have attracted a great interest as potential therapeutic agents against a large variety of diseases.<sup>2-5</sup>

Nobiletin (5,6,7,8,3',4' hexamethoxyflavone, Figure 5.2.1) is a citrus polymethoxylated flavone, which possesses an extensive range of pharmacological activities including antioxidant, antitumor properties, and as an enhancer of adiponectin secretion, among others.<sup>2,6-9</sup> The anti-proliferative activity is one of the most studied pharmaceutical applications of this flavonoid. Nobiletin has shown to be very efficient at inhibiting invasion, migration and adhesion in four representative cell lines of brain tumour.<sup>10</sup> It has also proved that nobiletin exhibits anti-proliferative activity in ovarian and breast cancer cells, showing IC<sub>50</sub> values between 31.9 and 16.8  $\mu$ M.<sup>11</sup> By this way, it has been recognized that nobiletin may help prevent cervical cancer and may potentially be a useful agent for the treatment of certain malignancies.<sup>12</sup>

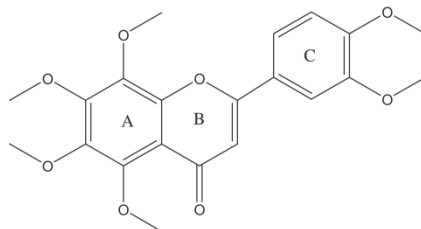


Figure 5.2.1.- Chemical structure of nobiletin (5,6,7,8,3',4' hexamethoxyflavone).

Despite the fact that flavonoids possess a wide spectrum of pharmacological properties, their use is limited by its low aqueous solubility and chemical instability.<sup>13</sup> One approach to avoid these drawbacks is to include them into polymeric matrices, as is the case of nanoparticles. In fact, the use of polymeric nanoparticles as carriers of active pharmaceutical molecules allows to protect them from degradation, while delivering the bioactive molecules to the proper specific site.<sup>14</sup> In particular, quercetin has recently been entrapped in polymeric nanoparticles as a drug delivery system for controlled release.<sup>15</sup>

Chitosan is a linear cationic polysaccharide, which at low pH can be dissolved behaving as a stiff worm-like chain and composed by two kinds of  $\beta(1\rightarrow4)$ -linked monosaccharide residues, namely N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine.<sup>16</sup> Chitosan is a very interesting polymer for biomedical applications because of its biocompatibility, biodegradability and low toxicity, that exhibits the capacity to promote the absorption of poorly absorbed

macromolecules across epithelial barriers.<sup>17-19</sup> Due to these properties, chitosan and its derivatives have found many pharmaceutical and biomedical applications.<sup>20</sup>

Zhang et al. used chitosan nanoparticles to improve the bioavailability of quercetin and demonstrated that the antioxidant activity and reducing power of this flavonoid could be preserved in this type of nanosystem.<sup>21</sup>

Thus, the objective of this investigation was to explore the possibility to bind nobiletin to chitosan nanoparticles, as well as to evaluate their antiproliferative activity. Such a strategy could be advantageous to protect nobiletin from degradation keeping its biological activity.

## **EXPERIMENTAL**

### **Materials**

A commercial chitosan sample was supplied by NovaMatrix (Protasan UP B 80/20, Batch BP-0806-03). Its viscosity-average molecular weight was  $1.1 \times 10^5$ , estimated at 25 °C in 0.3 M acetic acid/0.2 M sodium acetate<sup>22</sup> and the degree of N-acetylation (DA = 0.178) was determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy.

According to the supplier, this sample has the following characteristics: Ash content 0.06 %, protein content 0.13 % and endotoxins < 43 EU/g. Nobiletin was acquired from Wako (Lot LTQ 5168).

All other reagents and solvents (Sigma-Aldrich) were used without further purification. Experiments were carried out with distilled water (conductivity lower than 3  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ).

### **Nanoparticle preparation**

Chitosan was dissolved in 2 % acetic acid at 0.5 mg/mL to form the diffusing phase. This phase (1 or 2.5 mL) was then added to the dispersing phase (25 or 40 mL) by means of a needle positioned just two centimeters above the surface at 0.86 mL/min using a peristaltic pump, under moderate magnetic stirring. This procedure allowed nonsolvent to solvent ratios between 10:1 to 40:1. The dispersing phase was methanol, an organic solvent miscible with water in which the polymer is insoluble –the nonsolvent– optionally containing nobiletina (0.01 %). The freshly formed nanoparticles were employed directly for characterization.

## **Nobiletin Association Efficiency and Loading Capacity**

The quantity of nobiletin entrapped in the nanoparticles was calculated by the difference between the total nobiletin incorporated in the nanoparticles formation medium and the quantity of unbound nobiletin remaining in the suspending medium. Association and loading efficiencies of the nanoparticles were determined after a simple rotatory evaporation under vacuum at 35 °C and further re-suspended with water. Glycerin (2.4 µL per milliliter) was added to the suspension and nanoparticles were separated by centrifugation (10,000 x *g*, 25 °C, 40 min).

Nobiletin concentration was measured in the supernatant by HPLC on a Varian proStar 201 equipped with a Varian Microsorb-MV 100-5 C18 column and an UV-Vis proStar detector. The analysis was carried out using the following conditions: 20 µL of the supernatant was injected to the system and an eluent composed by water HPLC grade (60 %) and acetonitrile (40 %) at room temperature. Flow rate: 1.25 mL/min. Nobiletin was monitored by absorbance at 340 nm. Concentrations of nobiletin were quantified from integrated peak areas and calculated by interpolation from a standard curve (0-100 µg/mL).



The association and loading efficiencies of nobiletin were calculated as follows:

$$\text{Association efficiency} = \frac{\text{Total nobiletin} - \text{Unbound nobiletin}}{\text{Total nobiletin}} \times 100$$

$$\text{Loading efficiency} = \frac{\text{Total nobiletin} - \text{Unbound nobiletin}}{\text{Nanoparticles weight}} \times 100$$

## Dynamic Light Scattering

Particle size and polydispersity were determined by Dynamic Light Scattering (DLS). A digital correlation system ALV-5000 (ALV-GmbH, Langeln, Germany) equipped with an Argon laser (30 mW;  $\lambda_0 = 632$  nm) was used at  $25 \pm 0.1$  °C.

The Refractive Index was measured in a refractometer Model RE4OD (Mettler Toledo). The hydrodynamic radius  $R_H$ , was obtained at an incident angle of  $90^\circ$  using the Stokes–Einstein equation:

$$D_0 = k_B T / 6 \pi \eta R_H,$$

where  $D_0$  is the diffusion coefficient,  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the absolute temperature and  $\eta$  is the viscosity of the solvent.

## Atomic Force Microscopy (AFM)

The experiments were conducted at room temperature in a non-contact mode using a JEOL microscope equipped with a silicon cantilever NSC15 from MikroMasch (MikroMasch, Portland, USA). A drop of chitosan nanoparticle suspension was placed on mica and dried under atmospheric conditions before

proceeding for analysis. The experiment was carried out using an Atomic Force JEOL Microscope (Scanning Probe Microscope, Model JSPM 4210, Japan).

Height and cross-sectional size measurements were carried out from AFM images with WSxM software, version 4.0, from Nanotec Electronica S.L. (Madrid, Spain).<sup>23</sup>

### **Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)**

Infrared spectra were recorded with a Nicolet Protégé 460 E.S.P. spectrometer (Madison, WI) by accumulation of 64 scans, with a resolution of  $2\text{ cm}^{-1}$ . Samples were prepared in KBr pellets. Measurements were performed on duplicate.

### **Cell Lines**

The following cell lines were used: RAW 264.7 (Abelson murine leukemia virus-induced tumor) and L-929 (normal subcutaneous connective tissue) purchased from the American Type Culture Collection (ATCC).

### **Antiproliferative assay**

Cell proliferation was determined using the standard 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay,

which is based on the conversion of MTT to formazan crystals by mitochondrial dehydrogenases.<sup>24</sup> In a few words, cell suspensions (200,000 cells/mL) were placed in each well of a flat bottom 96 well plate and incubated at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>. After 18-24 hours of incubation, 50 µL of the samples (nobiletin solution, chitosan nanoparticles and nobiletin-loaded chitosan nanoparticles) at various concentrations were added to the cells, and the incubation was continued for another 48 hours. In the last 4 hours of incubation, 10 µL of MTT solution (5 mg/mL) were added to each well. Formed formazan crystals were dissolved with 0.05 N HCl in isopropanol (100 µL), and the absorbance was read at 570 nm on a microplate reader (Thermo Scientific Multiskan Spectrum), using a reference wavelength of 655 nm. Data were processed using SkanIt Software 2.4.2. All measurements were carried out by triplicate in three different replicates.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

In a previous publication, we have reported the influence of the process parameters on the characteristics of chitosan nanoparticles obtained by nanoprecipitation.<sup>25</sup> Taking into account these results, nobiletin-loaded chitosan nanoparticles were prepared starting from a chitosan solution in aqueous acetic

acid using methanol as nonsolvent, at a nonsolvent to solvent ratio 10:1. It is usual to consider that the bioactive substance should be dissolved with the polymer component in the solvent phase.<sup>26</sup> Nevertheless, in this case it was not possible, since nobiletin is sparingly soluble in aqueous media. Then, in our protocol nobiletin was added to the nonsolvent phase.

Figure 5.2.2 shows the particle size distribution of chitosan nanoparticles and nobiletin-loaded chitosan nanoparticles, giving approximate values of average size around 280 and 500 nm, respectively. It is evident that both systems present similar distribution profiles, with monomodal pattern.

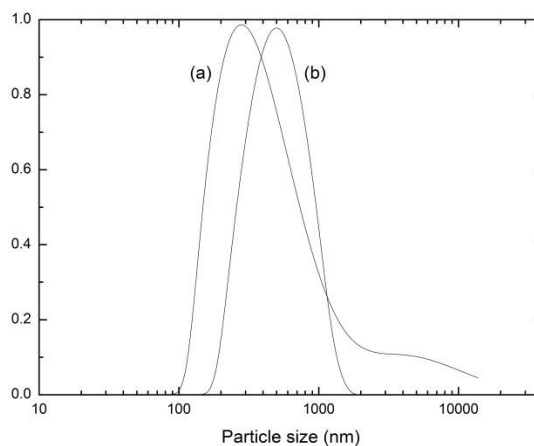


Figure 5.2.2.- Particle sizes of (a) chitosan nanoparticles and (b) nobiletin-loaded chitosan nanoparticles as evaluated by dynamic light scattering.

Figure 5.2.3 presents the AFM image of two nobiletin-loaded chitosan nanoparticles, and their line-scan profiles. The similarities in size and shape are

evident. These particles are seen as round objects with diameter between 700 and 800 nm and height around 50 nm.

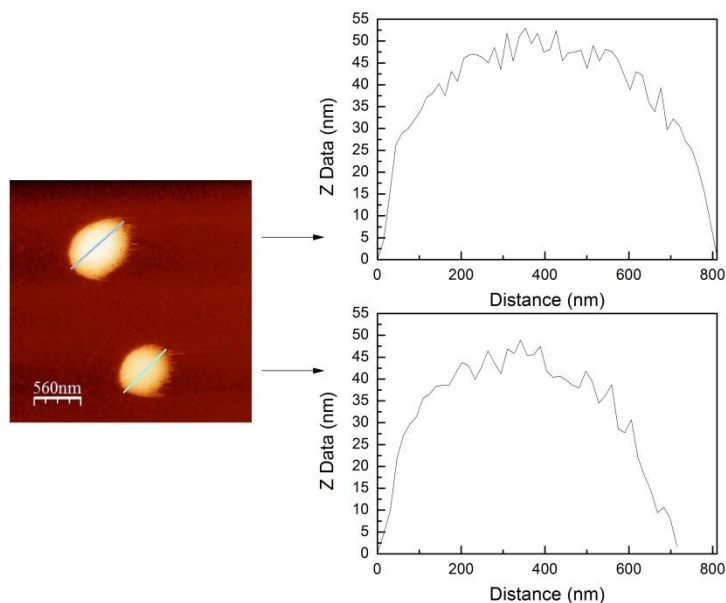


Figure 5.2.3.- AFM image and line scan profiles of two nobiletin-loaded chitosan nanoparticles as indicated in the figure.

In order to evaluate the inclusion of nobiletin into the nanoparticulate system, the infrared spectrum was recorded. In Figure 5.2.4 it could be appreciated that nobiletin-loaded nanoparticles shows important bands at  $1645\text{ cm}^{-1}$  (carbonyl stretching band) and a couple of signals at  $1588$  and  $1519\text{ cm}^{-1}$  (C=C stretching in aromatic rings).<sup>27</sup>

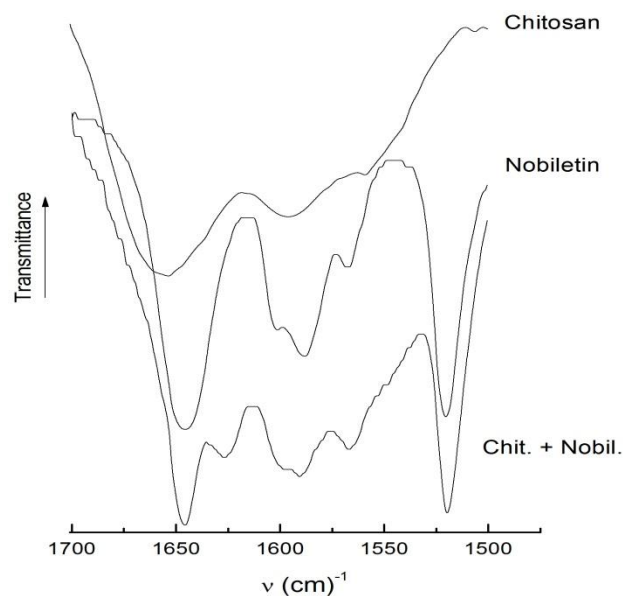
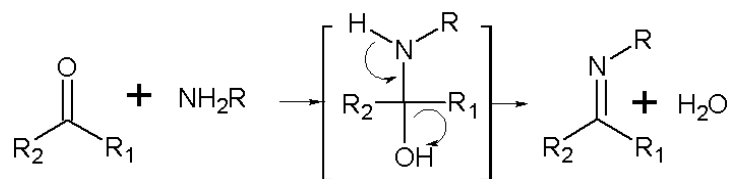


Figure 5.2.4.- FTIR spectra of nobiletin, chitosan and nobiletin loaded-chitosan nanoparticles as labeled.

All these bands are common with the nobiletin standard, and almost all are absent on the chitosan spectrum. Moreover, there is a band at  $1626\text{ cm}^{-1}$ , which is associated with the probable formation of imine bond between chitosan amine groups and the carbonyl group of nobiletin, via Schiff base. The suggested reaction is:



These results confirm the entrapment of the flavonoid within chitosan nanoparticles. Thus, it could be concluded that nobiletin became chemically bonded with chitosan. It is interesting, additionally, to underline that this chemical bond is weak enough to give back the reactants under mild changes in the medium, favoring the release of nobiletin from the nanoparticles. Quantitative analysis also confirms these results. The association and loading efficiencies were 69.1 % and 7.0 %, respectively. These figures are high enough, and demonstrate that the proposed process yields an adequate nanovehicle to encapsulate nobiletin.

Giving these conclusions, the anti-proliferative activity of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles was also evaluated in order to assess if the biological action had been preserved. To this end, two cell lines were chosen: one murine cancer and the other a normal subcutaneous connective tissue. Figures 5.2.5, 5.2.6 and 5.2.7 show the results obtained when both cell cultures were treated with nobiletin solution, chitosan nanoparticles and nobiletin-loaded chitosan nanoparticles, respectively.



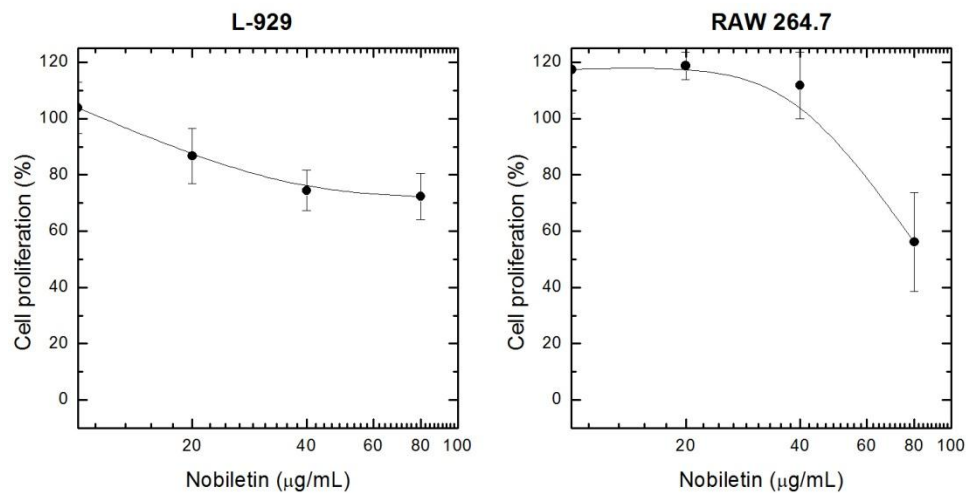


Figure 1.2.5.- Effect of nobiletin (in solution) on cell proliferation. The type of cell line is labeled in the figure.

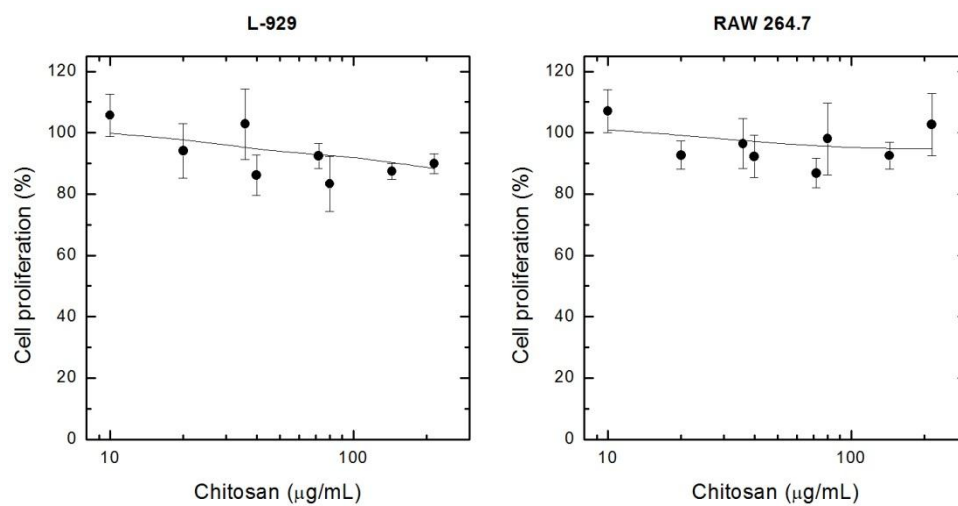


Figure 5.2.6.- Effect of chitosan nanoparticles on cell proliferation. The type of cell line is labeled in the figure.

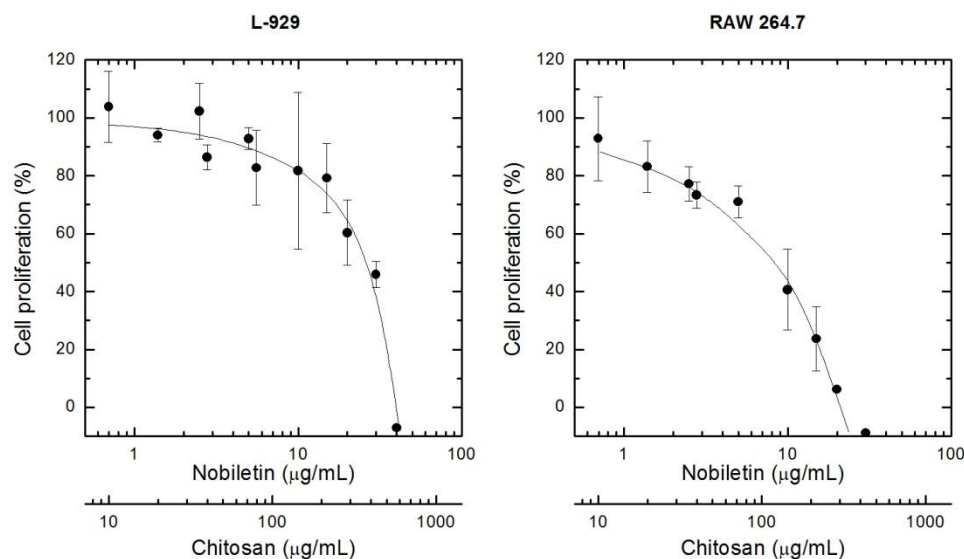


Figure 5.2.7.- Effect of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles on cell proliferation. The type of cell line is labeled in the figure. The cell proliferation is expressed versus the nobiletin concentration and the corresponding chitosan concentration, as parallel x-axes.

On the one hand, chitosan nanoparticles do not show any anti-proliferative activity over all the concentration range studied for neither cell lines (Figure 5.2.6). On the other hand, nobiletin alone does not exhibit any response against the connective tissue cells, but there is an incipient effect versus the cancer cells, particularly at concentrations above 40 µg/mL (Figure 5.2.5). Regarding nobiletin-loaded chitosan nanoparticles, there is an inhibition of cellular growth in both cases (Figure 5.2.7). Nevertheless, nobiletin

concentrations required to achieve this effect are lower for the murine cancer cells.

Table 5.2.1 summarizes the IC<sub>50</sub> values calculated for all systems. In fact, there is a higher anti-proliferative activity of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles against the tumor culture than the connective tissue: 8.3 vs. 26.0 µg/mL. The former value corresponds to a concentration of 20.1 µM, which compares satisfactorily with the IC<sub>50</sub> values obtained by Du and Chen (between 31.9 and 16.8 µM) for four different cancer cell lines with nobiletin.<sup>11</sup> Another important effect becomes apparent when analyzing figures summarized in Table 5.2.1: nobiletin-loaded chitosan nanoparticles display a more pronounced anti-cancer activity than nobiletin alone. It means that the nanoencapsulation of nobiletin in chitosan particles leads to a significant enhancement of the biological effect of nobiletin. This synergistic anti-tumoral activity reveals the great potential for future applications of this new nobiletin release system in cancer chemotherapy. Further investigation on this topic is required.

Table 5.2.1. IC<sub>50</sub> values (expressed as µg/mL) estimated from Figures 5.2.5, 5.2.6 y 5.2.7.

Sample	L-929 cells	RAW cells
Nobiletin	> 80	> 80
NP with nobiletin	26.0	8.3
NP without nobiletin	> 200	> 200

## **CONCLUSIONS**

It was possible to encapsulate nobiletin in chitosan nanoparticles harnessed via nanoprecipitation with high association efficiency. Nobiletin-loaded chitosan nanoparticles are slightly greater than those without the flavonoid, showing a rounded shape profile. Nobiletin becomes chemically bonded to nanoparticles via Schiff reaction. This nanoparticulate system exhibits improved antitumoral effect in comparison with nobiletin alone, which opens great possibilities to employ this kind of nano-vehicle in chemotherapeutic techniques.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was financed by CONACYT-SALUD-2008-C01-87324 project, Mexico. AGLA thanks CONACYT for her PhD grant. We would like to thank to *Rubio Pharma y Asociados SA de CV*, to Dr. J.L. Rubio and to *Laboratorio de Investigación en Bioactivos y Alimentos Funcionales*, for the experimental facilities to carry out this investigation.

## REFERENCES

- (1) Beecher, G. R. *The Journal of Nutrition* **2003**, 133, 3248S-3254S.
- (2) Yi, Z. Yu, Y. Liang, Y.; Zeng, B. *LWT - Food Science and Technology* **2008**, 41, 597-603.
- (3) Xiao, H. Yang, C. S. Li, S. Jin, H. Ho, C.-T.; Patel, T. *Molecular nutrition & food research* **2009**, 53, 398-406.
- (4) Wang, W. *Nutrition Research* **1999**, 19, 191-202.
- (5) Wu, T.-H. Yen, F.-L. Lin, L.-T. Tsai, T.-R. Lin, C.-C.; Cham, T.-M. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 346, 160-168.
- (6) Kunimasa, K. Kuranuki, S. Matsuura, N. Iwasaki, N. Ikeda, M. Ito, A. Sashida, Y. Mimaki, Y. Yano, M. Sato, M. Igarashi, Y.; Oikawa, T. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009**, 19, 2062-2064.
- (7) Wu, Y.-Q. Zhou, C.-H. Tao, J.; Li, S.-N. *Life sciences* **2006**, 78, 2689-96.
- (8) Miyata, Y. Tanaka, H. Shimada, A. Sato, T. Ito, A. Yamanouchi, T.; Kosano, H. *Life Sciences* **2011**, 88, 613-618.

- (9) Kunimasa, K. Ikekita, M. Sato, M. Ohta, T. Yamori, Y. Ikeda, M. Kuranuki, S.; Oikawa, T. *Cancer science* **2010**, *101*, 2462-2469.
- (10) Rooprai, H. K. Kandaneeratchi, A. Maidment, S. L. Christidou, M. Trillo-Pazos, G. Dexter, D. T. Rucklidge, G. J. Widmer, W.; Pilkington, G. J. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **2001**, *27*, 29-39.
- (11) Du, Q.; Chen, H. *Food Chemistry* **2010**, *119*, 567-572.
- (12) Kim, H. Moon, J. Y. Mosaddik, A.; Cho, S. K. *Food and chemical toxicology* **2010**, *48*, 2435-42.
- (13) Pralhad, T.; Rajendrakumar, K. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2004**, *34*, 333-9.
- (14) *Biological and Pharmaceutical Nanomaterials*; Challa S. S. R. Kumar, Ed. Wiley-VCH, Weinheim: Weinheim, 2006; p. 428.
- (15) Barreto, A. C. H. Santiago, V. R. Mazzetto, S. E. Denardin, J. C. Lavín, R. Mele, G. Ribeiro, M. E. N. P. Vieira, I. G. P. Gonçalves, T. Ricardo, N. M. P. S.; Fachine, P. B. A. *Journal of Nanoparticle Research* **2011**.

- (16) Roberts, G. A. F. *Chitin Chemistry*, 1st ed. The Macmillan Press Ltd: London, 1992; p. 368.
- (17) Hirano, S. Tsuchida, H.; Nagao, N. *Biomaterials* **1989**, *10*, 574-576.
- (18) Aiba, S.-ichi *International Journal of Biological Macromolecules* **1992**, *14*, 225-228.
- (19) Kumar, M. N. V. R. Muzzarelli, R. A. A. Muzzarelli, C. Sashiwa, H.; Domb, A. J. *Chemical reviews* **2004**, *104*, 6017-84.
- (20) Sashiwa, H.; Aiba, S.-ichi *Progress in Polymer Science* **2004**, *29*, 887-908.
- (21) Zhang, Y. Yang, Y. Tang, K. Hu, X.; Zou, G. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *107*, 891-897.
- (22) Rinaudo, M. Milas, M.; Le Dung, P. *International journal of biological macromolecules* **1993**, *15*, 281-285.
- (23) Horcas, I. Fernández, R. Gómez-Rodríguez, J. M. Colchero, J. Gómez-Herrero, J.; Baro, a M. *The Review of scientific instruments* **2007**, *78*, 013705.

- (24) Mosmann, T. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- (25) Luque-Alcaraz, A. Lizardi, J. Goycoolea, F. M. Valdez, M. Higuera-Ciapara, I.; Argüelles-Monal, W. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *Submitted*.
- (26) Bilati, U. Allémann, E.; Doelker, E. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *24*, 67-75.
- (27) Manthey, J. A. *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, *54*, 3215-8.



## 6.- REFERENCIAS

1. Pinto Reis, C.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2006**, 2 (1), 8-21.
2. Aumelas, A.; Serrero, A.; Durand, A.; Dellacherie, E.; Leonard, M., Nanoparticles of hydrophobically modified dextrans as potential drug carrier systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, 59 (1), 74-80.
3. López-León, T.; Carvalho, E. L. S.; Seijo, B.; Ortega-Vinuesa, J. L.; Bastos-González, D., Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 283 (2), 344-351.
4. Galindo-Rodriguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E., Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharmaceutical Research* **2004**, 21 (8), 1428-1439.
5. Bilati, U.; Allémann, E.; Doelker, E., Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, 24 (1), 67-75.
6. Rao, J. P.; Geckeler, K. E., Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* **2011**, 36 (7), 887-913.
7. Derakhshandeh, K.; Erfan, M.; Dadashzadeh, S., Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, 66 (1), 34-41.
8. Legrand, P.; Lesieur, S.; Bochot, A.; Gref, R.; Raatjes, W.; Barratt, G.; Vauthier, C., Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 344 (1-2), 33-43.

9. Wu, T.-H.; Yen, F.-L.; Lin, L.-T.; Tsai, T.-R.; Lin, C.-C.; Cham, T.-M., Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *346* (1-2), 160-168.
10. Wilson, B.; Samanta, M. K.; Santhi, K.; Kumar, K. P. S.; Ramasamy, M.; Suresh, B., Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, *6* (1), 144-152.
11. Artursson, P.; Lindmark, T.; Davis, S. S.; Illum, L., Effect of Chitosan on the Permeability of Monolayers of Intestinal Epithelial Cells (Caco-2). *Pharmaceutical Research* **1994**, *11* (9), 1358-1361.
12. Marguerite, R., Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* **2006**, *31* (7), 603-632.
13. Nakamatsu, J.; Rodriguez, N., Quimica de la quitina y el quitosano. In *Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*, primera ed.; Ana, P. d. A., Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú: Perú, 2004; Vol. 1, p 312.
14. Qi, L.; Xu, Z.; Jiang, X.; Hu, C.; Zou, X., Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* **2004**, *339* (16), 2693-2700.
15. Vila, A.; Sánchez, A.; Janes, K.; Behrens, I.; Kissel, T.; Jato, J. L. V.; Alonso, M. a. J., Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *57* (1), 123-131.
16. Janes, K. A.; Fresneau, M. P.; Marazuela, A.; Fabra, A.; Alonso, M. a. J., Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *Journal of Controlled Release* **2001**, *73* (2-3), 255-267.
17. de la Fuente, M.; Raviña, M.; Paolicelli, P.; Sanchez, A.; Seijo, B.; Alonso, M. J., Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (1), 100-117.

18. Krauland, A. H.; Alonso, M. J., Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *340* (1-2), 134-142.
19. Teijeiro-Osorio, D.; Remuñán-López, C.; Alonso, M. J., Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *71* (2), 257-263.
20. Jingou, J.; Shilei, H.; Weiqi, L.; Danjun, W.; Tengfei, W.; Yi, X., Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and in vitro release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, *83* (1), 103-107.
21. Mahmoud, A. A.; El-Feky, G. S.; Kamel, R.; Awad, G. E. A., Chitosan/sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *413* (1-2), 229-236.
22. Zhang, Y.; Yang, Y.; Tang, K.; Hu, X.; Zou, G., Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, *107* (2), 891-897.
23. Yao, J.; Zhou, J. P.; Ping, Q. N.; Lu, Y.; Chen, L., Distribution of nobiletin chitosan-based microemulsions in brain following i.v. injection in mice. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *352* (1-2), 256-262.
24. Agnihotri, S. A.; Aminabhavi, T. M., Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. *Journal of Controlled Release* **2004**, *96* (2), 245-259.
25. Kikic, I., Polymer–supercritical fluid interactions. *The Journal of Supercritical Fluids* **2009**, *47* (3), 458-465.
26. Gimeno, M.; Ventosa, N.; Boumghar, Y.; Fournier, J.; Boucher, I.; Veciana, J., Micronization of the chitosan derivatives d-Glucosamine Hydrochloride and d-Glucosamine Sulphate salts by dense gas anti-solvent precipitation techniques. *The Journal of Supercritical Fluids* **2006**, *38* (1), 94-102.

27. Cocero, M. J.; Martín, Á.; Mattea, F.; Varona, S., Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *The Journal of Supercritical Fluids* **2009**, *47* (3), 546-555.
28. Mohanraj, V. J.; Barnes, T. J.; Prestidge, C. A., Silica nanoparticle coated liposomes: A new type of hybrid nanocapsule for proteins. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *392* (1-2), 285-293.
29. Thote, A. J.; Gupta, R. B., Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2005**, *1* (1), 85-90.
30. Janes, K. A.; Alonso, M. J., Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science* **2003**, *88* (12), 2769-2776.
31. Katas, H.; Alpar, H. O., Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release* **2006**, *115* (2), 216-225.
32. Zhu, D.; Zhang, H.; Bai, J.; Liu, W.; Leng, X.; Song, C.; Yang, J.; Li, X.; Jin, X.; Song, L.; Liu, L.; Li, X.; Zhang, Y.; Yao, K., Enhancement of transfection efficiency for HeLa cells via incorporating arginine moiety into chitosan. *Chinese Science Bulletin* **2007**, *52* (23), 3207-3215.
33. Cadete, A.; Figueiredo, L.; Lopes, R.; Calado, C. C. R.; Almeida, A. J.; Gonçalves, L. M. D., Development and characterization of a new plasmid delivery system based on chitosan-sodium deoxycholate nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (0).
34. Csaba, N.; Köping-Höggård, M.; Alonso, M. J., Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *382* (1-2), 205-214.
35. Prego, C.; Paolicelli, P.; Díaz, B.; Vicente, S.; Sánchez, A.; González-Fernández, Á.; Alonso, M. J., Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine* **2010**, *28* (14), 2607-2614.

36. Chen, J.-P.; Yang, P.-C.; Ma, Y.-H.; Wu, T., Characterization of chitosan magnetic nanoparticles for in situ delivery of tissue plasminogen activator. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84* (1), 364-372.
37. Mohammadpourounghi, N.; Behfar, A.; Ezabadi, A.; Zolfagharian, H.; Heydari, M., Preparation of chitosan nanoparticles containing Naja naja oxiana snake venom. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, *6* (1), 137-143.
38. Cafaggi, S.; Russo, E.; Stefani, R.; Leardi, R.; Caviglioli, G.; Parodi, B.; Bignardi, G.; De Toter, D.; Aiello, C.; Viale, M., Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin–alginate complex. *Journal of Controlled Release* **2007**, *121* (1-2), 110-123.
39. Xu, Y.; Du, Y., Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *250* (1), 215-226.
40. Tang, E. S. K.; Huang, M.; Lim, L. Y., Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *265* (1-2), 103-114; Huang, X.; Du, Y.-Z.; Yuan, H.; Hu, F.-Q., Preparation and pharmacodynamics of low-molecular-weight chitosan nanoparticles containing insulin. *Carbohydrate Polymers* **2009**, *76* (3), 368-373.
41. Santander-Ortega, M. J.; Peula-García, J. M.; Goycoolea, F. M.; Ortega-Vinuesa, J. L., Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, *82* (2), 571-580.
42. Lee, D. W.; Yun, K.-S.; Ban, H.-S.; Choe, W.; Lee, S. K.; Lee, K. Y., Preparation and characterization of chitosan/polyguluronate nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release* **2009**, *139* (2), 146-152.
43. Goycoolea, F. M.; Lollo, G.; Remuñán-López, C.; Quaglia, F.; Alonso, M. a. J., Chitosan-Alginate Blended Nanoparticles as Carriers for the Transmucosal Delivery of Macromolecules. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (7), 1736-1743.

44. Chin, S. F.; Pang, S. C.; Tay, S. H., Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86 (4), 1817-1819.
45. Ali, H. S. M.; York, P.; Blagden, N., Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, 375 (1-2), 107-113.
46. Tompa, H., Phase relationships on polymer solutions. *Transactions of The Faraday Society* **1949**, (45).
47. Flory, P. J., *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press: 1953.
48. El Gharras, H., Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science & Technology* **2009**, 44 (12), 2512-2518.
49. Du, Q.; Chen, H., The methoxyflavones in Citrus Reticulata Blanco cv. ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells. *Food chemistry* **2010**, 119, 567.
50. Toledo-Guillén, A. R.; Inocencio, H.-C.; Gilberto, G.-n.; C, D. I. F. J., Extraction of Bioactive Flavonoid Compounds from Orange (*Citrus sinensis*) Peel Using Supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Biotechnology* **2010**, 150, 314.
51. Eguchi, A.; Murakami, A.; Ohigashi, H., Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses phorbol ester-induced expression of multiple scavenger receptor genes in THP-1 human monocytic cells. *FEBS Letters* **2006**, 580 (13), 3321-3328.
52. Tripoli, E.; Guardia, M. L.; Giammanco, S.; Majo, D. D.; Giammanco, M., Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry* **2007**, 104 (2), 466-479.
53. Whitman, S. C.; Kurowska, E. M.; Manthey, J. A.; Daugherty, A., Nobiletin, a citrus flavonoid isolated from tangerines, selectively inhibits class A scavenger receptor-mediated metabolism of acetylated LDL by mouse macrophages. *Atherosclerosis* **2005**, 178 (1), 25-32.

54. Kunimasa, K.; Kuranuki, S.; Matsuura, N.; Iwasaki, N.; Ikeda, M.; Ito, A.; Sashida, Y.; Mimaki, Y.; Yano, M.; Sato, M.; Igarashi, Y.; Oikawa, T., Identification of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, as an enhancer of adiponectin secretion. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (7), 2062-2064.
55. Dabrundashvili, N. G.; Kvaratskhelia, E. B.; Gagua, M.; Maisuradze, E.; Chkhikvishvili, I.; Zhuravliova, E. I.; Mikeladze, D. G., NOBILETIN TRANSIENTLY INCREASES THE PRODUCTION OF NITRIC OXIDE AND CHANGES THE ACTIVITY OF SUCCINATE DEHYDROGENASE IN HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES. *Journal of Food Biochemistry* **2011**, *35* (2), 638-649.
56. Sergeev, I. N.; Li, S.; Colby, J.; Ho, C.-T.; Dushenkov, S., Polymethoxylated flavones induce Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Life Sciences* **2006**, *80*, 245-253.
57. Yoshimizu, N.; Otani, Y.; Saikawa, Y.; Kubota, T.; Yoshida, M.; Furukawa, T.; Kumai, K.; Kameyama, K.; Fujii, M.; Yano, M.; Sato, T.; Ito, A.; Kitajima, M., Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. In *Aliment Pharmacol Ther*, England, 2004; Vol. 20 Suppl 1, pp 95-101.
58. Luo, G.; Guan, X.; Zhou, L., Apoptotic effect of citrus fruit extract nobiletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy* **2008**, *7* (6), 966-973.
59. Lee, Y.-C.; Cheng, T.-H.; Lee, J.-S.; Chen, J.-H.; Liao, Y.-C.; Fong, Y.; Wu, C.-H.; Shih, Y.-W., Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2011**, *347* (1), 103-115.
60. Kay, L.; Shapira, P., Developing nanotechnology in Latin America. *Journal of Nanoparticle Research* **2009**, *11* (2), 259-278.
61. Li, X.; Lin, Y.; Chen, H.; Roco, M., Worldwide nanotechnology development: a comparative study of USPTO, EPO, and JPO patents (1976–2004). *Journal of Nanoparticle Research* **2007**, *9* (6), 977-1002.

62. Rinaudo, M.; Milas, M.; Dung, P. L., Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules* **1993**, *15* (5), 281-285.
63. Juárez, J.; Galaz, J. G.; Machi, L.; Burboa, M.; Gutiérrez-Millán, L. E.; Goycoolea, F. M.; Valdez, M. A., Interfacial Behavior of N-Nitrosodiethylamine/Bovine Serum Albumin Complexes at the Air–Water and the Chloroform–Water Interfaces by Axisymmetric Drop Tensiometry. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (10), 2727-2735.
64. Horcas, I.; Fernandez, R.; Gomez-Rodriguez, J. M.; Colchero, J.; Gomez-Herrero, J.; Baro, A. M., WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum* **2007**, *78* (1), 013705.
65. Wang, Z.; Li, S.; Ferguson, S.; Goodnow, R.; Ho, C. T., Validated reversed phase LC method for quantitative analysis of polymethoxyflavones in citrus peel extracts. *J Sep Sci* **2008**, *31* (1), 30-7.
66. Denizot, F.; Lang, R., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* **1986**, *89* (2), 271-277.

<http://www.patentlens.net/patentlens/structured.html>