



FACULTAD DE FARMACIA

LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

**BIODISPONIBILIDAD CEREBRAL DE POLIFENOLES DE MIRTÁCEAS  
NATIVAS CONTENIDOS EN NANOPARTÍCULAS BIODEGRADABLES**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

**PEDRO JONATHAN CORONADO CHACANA**

Directores de Tesis

Dr. Elisa Zúñiga Garay

Dr. Pablo Muñoz Carvajal

2012

## **INDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>2</b>
<b>GLOSARIO DE ABREVIACIONES UTILIZADAS.....</b>	<b>3</b>
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Epidemiología y enfermedades neurodegenerativas.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Antioxidantes (AOx) y neurodegeneración.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Radicales libres y estrés oxidativo (EO) / nitrosativo (EN) en envejecimiento.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 PF y mirtáceas nativas.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Biodisponibilidad de los PF.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Quitosano como nanocontenedor.....</b>	<b>14</b>
<b>II HIPÓTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>III OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Objetivo General.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>IV MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Materiales.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.1 Reactivos y Soluciones.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.2 Estándares.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.3 Instrumentos y equipos.....</b>	<b>18</b>

4.1.4 Material biológico.....	19
4.2 Metodología.....	19
4.2.1 Preparación y análisis de las soluciones de PF de mirtáceas.....	19
4.2.2 Estudios de biodisponibilidad en ratas.....	19
4.2.3 Obtención de cerebros de ratas.....	20
4.2.4 Extracción de PF desde cerebro de rata.....	21
4.2.5 Determinación del contenido de PF en homogenizado de tejido cerebral.....	23
4.2.6 Análisis Estadísticos.....	24
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1 Determinación del rango lineal de respuesta de los PF estudiados por HPLC.....	25
5.1.1 Curva de calibración de AG.....	25
5.1.2 Curva de calibración de Q.....	26
5.2 Biodisponibilidad de PF AOx de ratas.....	28
VI CONCLUSIONES.....	41
VII BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXO I.....	50
ANEXO II.....	51
ANEXO III.....	52
ANEXO IV.....	53
ANEXO V.....	54

**ANEXO VI.....56**

**ANEXO VII.....57**

## RESUMEN

El creciente aumento de patologías neurodegenerativas asociadas a la edad, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, ha sido un tema de preocupación en las últimas décadas. Estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de determinados alimentos de origen vegetal, tales como frutas y verduras, se asocian con un menor riesgo de desarrollar estas enfermedades, llevando a la tendencia global de fomentar el consumo de alimentos que contengan compuestos bioactivos, como los PF, ya que podrían ejercer un efecto preventivo. En particular, dos especies de mirtáceas nativas utilizadas en la medicina mapuche: el Arrayán y la Murta, poseen frutos con altos niveles de polifenoles; sin embargo, la biodisponibilidad cerebral de estos compuestos es muy baja tras la administración oral, debido a los procesos farmacocinéticos de metabolización y la poca permeabilidad a la barrera hematoencefálica al paso de estos compuestos.

En este trabajo de tesis se evaluó la biodisponibilidad cerebral de compuestos polifenólicos comerciales (ácido gálico, quercetina y ácido elágico), encontrados en mirtáceas nativas y contenidos en nanopartículas de quitosano. Para ello estos compuestos, solos y contenidos en las nanopartículas, fueron administrados por 14 días a ratas envejecidas a través de dosis diarias líquidas, con una concentración final de 3,9 mg/mL de polifenoles totales. Luego se determinó su concentración cerebral mediante técnicas cromatográficas, encontrándose 7,6 veces mayor concentración de polifenoles en el cerebro de las ratas suplementadas con los polifenoles antioxidantes contenidos en nanopartículas, demostrando una alta biodisponibilidad y potenciando el uso de estos sistemas como agentes preventivos de enfermedades neurodegenerativas.

## SUMMARY

The large number of neurodegenerative diseases associated with aging, including Alzheimer's disease and Parkinson's disease, has been a major concern in the last decades. Epidemiological studies have shown that the consumption of certain foods such as fruits and vegetables, are associated with a lower risk of developing these diseases. Global trend of promoting the consumption of foods containing bioactive compounds such as polyphenols, as they may produce a preventive effect. Two species of native Myrtaceae used in Mapuche medicine such as Arrayán and Murta, have fruits with high levels of polyphenols, nevertheless, cerebral bioavailability of these compounds are very low after oral administration, due to the processes of pharmacokinetic metabolism and the low permeability to the blood-brain barrier to the passage of these compounds.

It was we evaluated in this thesis the brain`s bioavailability of commercial polyphenolic compounds (gallic acid, quercetin and ellagic acid), found in native Myrtaceae and content in chitosan nanoparticles. These compounds, alone and the ones contained in the nanoparticles, were administered to elderly rats aged for 14 days by daily liquid doses with a final concentration of 3.9 mg / mL of total polyphenols.

Then its concentration was determined by chromatographic techniques, 7.6 times higher concentration of polyphenols were found in the brain of rats that were supplemented with antioxidant polyphenols contained in nanoparticles, showing a high bioavailability and enhancing the use of these systems as preventive agents of neurodegenerative disease.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

**BHE** Barrera HematoEncefálica

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**EA** Enfermedad de Alzheimer

**EP** Enfermedad de Parkinson

**AOx** Compuestos AntiOxidantes

**ECNT** Enfermedades Crónicas No Transmisibles

**ERO** Especies Reactivas de Oxígeno

**ERN** Especies Reactivas de Nitrógeno

**EO** Estrés Oxidativo

**EN** Estrés Nitrosativo

**SOD** SuperÓxido Dismutasa

**ADN** Ácido Desoxirribonucleico

**PF** Polifenol

**AG** Ácido Gálico

**Q** Quercetina

**AE** Ácido Elágico

**TGI** Tracto GastroIntestinal

**HPLC** Sigla en inglés de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (*High Performance Liquid Chromatography*)

## **I INTRODUCCIÓN**

El creciente aumento de patologías neurodegenerativas en la población ha sido un tema de preocupación en las últimas décadas; por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha puesto en marcha iniciativas mundiales en neurología y salud pública en un esfuerzo por aumentar la conciencia acerca de la prevalencia, gravedad y costos de los trastornos neurológicos degenerativos, con el propósito de identificar potenciales estrategias de prevención y dilucidar los mecanismos de iniciación, desarrollo y progresión de estas enfermedades (Janca, 2002).

### **1.1 Epidemiología y enfermedades neurodegenerativas**

La prevalencia de la Enfermedad de Alzheimer (EA) según estadísticas de Estados Unidos, se estima en aproximadamente entre el 1% al 3% de la población hasta los 65 años de edad y aumenta de 30% a 50% en adultos mayores de 85 años (Kukull y Ganguli, 2000), sin incluir otros tipos de demencias por daños isquémicos (Cantuti-Castelvetri y col., 2000). En Chile, existe poca información estadística acerca de este tipo de demencia senil, así como estudios parcializados; por ejemplo, en la región del Maule, se observó que en personas mayores de 65 años la prevalencia de la EA es del 6%, considerando el censo del año 2002 donde se registraron 1.217.576 adultos mayores de 65 años de los cuales, si se realizará una proyección del caso de la región del Maule al país entero, en Chile habría 71.350 casos aproximadamente sólo de EA, sin considerar el resto de las demencias (Behrens y Vergara, 2007).

Otra patología neurodegenerativa asociada al envejecimiento, es la Enfermedad de Parkinson (EP), cuyas tasas de prevalencia aumentan dramáticamente con la edad, afectando aproximadamente al 2% de la población mayor de 65 años (Van Den Eeden y col., 2003; Twelves y col., 2003).

La carga social y económica de ambas enfermedades es catastrófica, ya que no sólo afectan al individuo sino a toda su familia y entorno social (Huse y col., 2005). Recientemente, se estudió el costo en salud asociado a este tipo de enfermedades neurodegenerativas y se estimó un costo anual de atención por paciente cercano a un equivalente de 4,5 millones de pesos chilenos en el Reino Unido, llegando en los Estados

Unidos a un gasto total anual que alcanza al equivalente a 10 trillones de pesos chilenos (Findley y col., 2003).

La etiología de estas enfermedades neurodegenerativas, es multifactorial con una combinación compleja de componentes genéticos y no genéticos (Ramassamy, 2006). Las formas no genéticas o esporádicas representan la mayoría de estos casos y van aproximadamente del 90% al 95% del total (Diéterlen y Lucotte, 2010; Singh y col., 2008). Se pueden implicar a esta patogenia reacciones tóxicas, incluyendo inflamación, toxicidad glutamatérgica (Maher y Davis, 1996), disfunción de la actividad mitocondrial (Beal, 1998) y del sistema ubiquitina/proteosoma (Subhankar, 2008), activación de las vías de apoptosis (Friedlander, 2003) y óxido nítrico (Calibrase y col., 2004), alteración de la homeostasis antioxidantes/oxidación (Uttara y col., 2009), entre otros.

## **1.2 Antioxidantes (AOx) y neurodegeneración**

Estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de determinados compuestos AOx contenidos en frutas y verduras, se asocia fuertemente a un menor riesgo de desarrollar EP y EA (Zhao, 2009; Cantuti-Castelvetri y col., 2000), lo que plantea la idea que el consumo de compuestos bioactivos específicos podrían ejercer un efecto beneficioso, preventivo y neuroprotector ante estas enfermedades (Aruoma y col., 2003), pudiendo incluso ser potenciales moduladores de funciones cerebrales (Spencer, 2008). Por lo tanto, una alimentación saludable enriquecida en AOx podría prevenir e incluso disminuir la prevalencia de Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) (Boyer y Liu, 2004).

A pesar de su amplia distribución en la naturaleza, el auge de la investigación acerca de los efectos beneficiosos de los compuestos bioactivos para la salud humana sólo comenzó a mediados de la década del 90 (Scalbert, 2005 A). En este contexto, los compuestos polifenólicos han recibido un creciente interés por parte de consumidores y fabricantes de alimentos procesados y secos (Vinson y col., 2005), debido a que se han realizado estudios epidemiológicos que sugieren asociaciones entre el consumo de alimentos ricos en polifenoles (PF) y la prevención de ciertas enfermedades del envejecimiento (Scalbert, 2005 B). En el último tiempo, la investigación sobre los efectos neuroprotectores de los PF de la dieta se ha desarrollado considerablemente, utilizando

distintos modelos *in vivo* (Ritz y col. 2008) e *in vitro* (Campos-Esparza y col., 2009; Gottlieb y col., 2006).

### 1.3 Radicales libres y estrés oxidativo (EO) / nitrosativo (EN) en envejecimiento

Un radical libre es un átomo o molécula que tiene en su capa más externa uno o más electrones desapareados, siendo especies más reactivas que las correspondientes no-radicalarias. Los radicales libres de oxígeno conocidos comúnmente como Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), así como, las Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN), pueden ser productos necesarios del metabolismo celular normal, ejerciendo un doble papel como especies tanto perjudiciales como beneficiosas para los sistemas vivos (Valko y col., 2006; Circu, 2010). Dentro de los efectos beneficiosos, se encuentra que actúan como mensajeros de señalización, actuando como mediadores de respuestas biológicas, incluyendo expresión génica, proliferación celular, angiogénesis, inmunidad innata, muerte celular programada y en la senescencia (Dowling y Simmons, 2009; Scherz-Shouval, 2011).

El desequilibrio entre las ERO/ERN, formadas mayoritariamente en la mitocondria, y las especies atenuadoras (AOx endógenos y exógenos) conduce a daño celular y tisular convirtiéndose en la causa de muchas patologías, y en los seres humanos se asocia con enfermedades de diferentes maneras. El EO y EN se podrían generar como efecto secundario de una condición patológica preexistente o podrían ser la causa central de una enfermedad en sí misma (Shukla y col., 2011).

Las macromoléculas biológicas (ácidos nucleicos, lípidos y proteínas) son ampliamente reconocidas como dianas susceptibles a daños directos por los altos niveles de ERO y ERN, tales como el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el radical hidroperoxilo ( $\text{HOO}\cdot$ ), el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el radical óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), entre otros (Blumberg 2004).

La formación de ERO se produce por la reducción de oxígeno molecular catalizada por metales ( $\text{Fe}^{+2}$  o  $\text{Cu}^+$ ), la cual da lugar a  $\text{O}_2^{\cdot-}$  que puede ser protonado a pH levemente ácido para generar el radical  $\text{HOO}\cdot$ , quien luego se transforma en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Nathan, 2010). La superóxido dismutasa (SOD), un AOx endógeno, también puede catalizar la transformación de anión radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por otra parte, la dismutación de superóxido

no enzimática es muy rápida y se produce en compartimentos biológicos cuando la concentración de SOD es baja; sin embargo, esto puede generar oxígeno singlete, que puede dañar el Ácido Desoxirribonucleico (ADN). El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno por sí mismos no son especies altamente oxidantes, pero en la reacción de Fenton, a partir del  $H_2O_2$  y la catálisis de iones metálicos ( $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$ , por ejemplo) forman radicales hidroxilo ( $OH\bullet$ ) altamente reactivos (Powers y Jackson, 2008).

Por otra parte las ERN, especialmente el peroxinitrito, pueden iniciar una reacción en cadena que potencialmente genere daño al ADN. El peroxinitrito se deriva de la reacción de óxido nítrico (un radical libre común en sistemas biológicos que actúa como señalizador) con el anión radical superóxido (Koppenol, 2001). La protonación rápida del anión peroxinitrito en las células genera ácido peroxinitroso (ONOOH), que es un buen agente nitrante para las cadenas laterales de tirosina y triptófano provocando daño a las proteínas. El ácido peroxinitroso puede también reaccionar con el ADN y causar el rompimiento de una o de las dos hebras de desoxirribosa. Además, puede causar nitración o desaminación de bases nucleotídicas del ADN. Guanina, por ejemplo, en la desaminación produce xantina, y adenina de una forma similar, genera hipoxantina. El desapareamiento de estas formas oxidadas recién generadas de ácidos nucleicos puede resultar en mutaciones de tipo transversión. El radical hidróxilo también reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN, dañando tanto la bases de purina y pirimidina, como la cadena de ADN provocando su escisión. La lesión del ADN más ampliamente estudiada es la formación de la molécula 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-G) la cual es producida por la reacción entre un nucleótido de guanina y un radical  $OH\bullet$  (Valko y col., 2007).

La modificación permanente del material genético, resultante de estos "daños oxidativos", representa el primer paso en la mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento. Se ha observado que los niveles de 8-OH-G están elevados en cerebros humanos viejos, con un incremento de 4 veces, en comparación a los cerebros jóvenes, lo cual apoya la teoría del envejecimiento mediado por los radicales libres. Entonces, el envejecimiento cerebral y de otros órganos puede ser asociado a la acumulación de daños oxidativos y nitrosativos (Giustarini y col., 2009; Kregel y Zhang, 2007).

Por lo tanto, en forma análoga al EO, una sobreproducción de ERN o cuando los mecanismos AOx son superados o bien estos están disminuidos, se produce EN. El EN puede conducir a reacciones no deseadas como la nitrosilación de aminoácidos que pueden alterar la estructura y función de las proteínas.

En particular, el cerebro es un órgano susceptible al EO debido a los siguientes fenómenos: a) el cerebro contiene altos niveles de ácidos grasos insaturados, que son vulnerables a la oxidación (particularmente ácidos grasos 22:6 y 20:4); b) el cerebro consume grandes cantidades de oxígeno (alrededor del 20% del total utilizado por el organismo) y se ha estimado que aproximadamente del 2 al 5% del oxígeno consumido por las células es subsecuentemente convertido en radicales libres; c) las concentraciones de enzimas AOx como la SOD es bastante alta, pero las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa son relativamente más bajas en cerebro en comparación a otros tejidos; y d) el cerebro contiene altas concentraciones de metales de transición como el  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Fe}^{2+}$  que son catalizadores clave de los daños inducidos por oxidación, como ya se ha descrito (Madsen y Gitlin, 2007).

#### **1.4 PF y mirtáceas nativas**

Entre los compuestos bioactivos que más han incentivado investigación en relación a las neuropatologías degenerativas, se encuentran los PF (Ebrahimi, 2012). Estos compuestos son moléculas orgánicas, principalmente pequeñas (peso molecular, en el rango de 200 a 800 Da) con uno o más anillos fenólicos en su estructura química (Scheepens y col., 2010). Estos fitoquímicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, pero no todos ellos han sido estudiados. Por su parte los flavonoides son el grupo más conocido y se han descrito cerca de 8.000 compuestos, pudiéndose dividir en varias clases según su estructura molecular (Figura 1). De la misma forma, ácidos orgánicos simples como el ácido gálico (AG) se cuentan entre los PF más estudiados.



todos alimentos ricos en PF, mostraron mejorar las funciones de transducción de señales neuronales y cognitivas (Sutherland y col., 2006).

El reconocimiento de los PF, como compuestos bioactivos saludables, abundantes en dietas que incluyen alimentos de origen natural como: frutas, verduras y bebidas como el vino y el té; ha generado el interés de elaborar alimentos procesados enriquecidos con ellos, para obtener un alimento con características saludables e incluso potencialmente funcional.

En particular, la familia de las mirtáceas, está constituida por variedades productoras de frutos o bayas contenedoras de PF, de alta capacidad AOx como son las antocianinas y ácidos orgánicos. Esta familia está constituida por 133 géneros y más de 3.800 especies, con distribución en América del Sur, Sudeste Asiático y Australia (Wilson y col. 2001), encontrándose en Chile representantes como el Arrayán (*Luma apiculata*) y la Murta (*Ugni molinae* Turcz) dentro de las variedades productoras de *berries* consumidas en el sur del país, especialmente por la comunidad mapuche, quien además utiliza las hojas y la corteza como parte de su medicina ancestral (Hoffmann y col., 1992) Dentro de los compuestos PF contenidos en la Murta y el Arrayán (Figura 2) se encuentran la quercetina (Q), los ácidos gálico (AG) y elágico (AE) (Rubilar y col, 2011).



Figura 2. Berries de mirtáceas nativas. A la izquierda el Arrayán (*Luma apiculata*) y a la derecha la Murta (*Ugni molinae*).

El AG (ácido 3,4,5-tri-hidroxi-benzoico) (Figura 3) y sus derivados están ampliamente presentes en el reino vegetal y son reconocidos por las siguientes

propiedades: capacidad AOx (antirradicales libres), actividad apoptótica de células cancerosas, actividad inhibitoria de la escualeno epoxidasa, capacidad de interferir en señales de vías de participación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estudios *in vitro* han demostrado las propiedades neuroprotectoras del AG (Lu y col. 2006). Por otra parte, estudios *in vivo*, mostraron altas concentraciones sanguíneas de este ácido, hasta 1  $\mu\text{M}$ , y una de vida media de 1,3 horas cuando consumieron (Stevenson y Hurst, 2007).

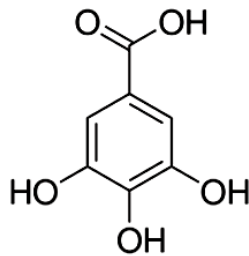


Figura 3. Estructura química del AG (Manach y col., 2004)

La Q, por su parte es un flavonoide natural, un potente AOx como captador de radicales libres, con una alta abundancia en frutas y verduras (Figura 4). Es particularmente abundante en cebollas (0,3 mg/g de peso fresco) y en té (10-25 mg/L). Este compuesto tiene propiedades biológicas, tales como actividad antiinflamatoria, anticoagulante, efectos antiisquémicos y acción antimetaloproteinasas (Moon y col., 2003). También se ha descrito un efecto neuroprotector (Ossola y col, 2009) En estudios *in vitro* de otros fitoquímicos bioactivos en líneas celulares PC12, quercetina mostró efecto inhibitorio contra el daño celular (Gelinias y Martinoli, 2002). Por otro lado, estudios *in vivo* de Q, demostraron efectos atenuadores de daño neuronal después de la isquemia cerebral focal (Pandey y col, 2011). Además, se comprobó que Q podría atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) en un modelo *in vitro* (Youdim y col., 2004).

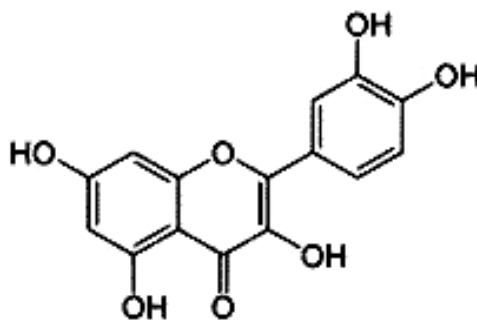


Figura 4. Estructura química de la Q.(Singh y col., 2008)

El AE (Figura 5) ha sido objeto de estudio debido a su alta capacidad AOx *in vitro*. Un variado número de alimentos contienen conjugados de AE, como por ejemplo, granadas, fresas, arándanos, frambuesas, moras, nueces, castañas, bellotas y pistachos (Espín y col, 2007). El AE ha demostrado tener actividad antiviral y proporcionar protección contra el cáncer de colon, pulmón y esófago (Scheepens y col., 2010; Nassiri-Asl y Hosseinzadeh, 2010).

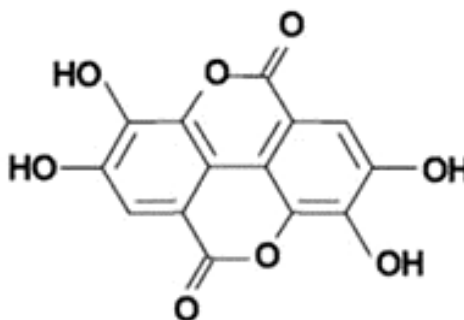


Figura 5. Estructura química del AE (Espín y col., 2007)

## 1.5 Biodisponibilidad de los PF

A pesar del impacto en la salud de los PF, es necesario considerar que la biodisponibilidad sistémica de los PF, en particular en el cerebro, puede ser muy baja tras la administración oral (D'Archivio y col. 2010), principalmente, porque para lograr una concentración suficiente en el órgano, tejido o célula objetivo y de esta forma producir algún efecto, los PF consumidos deben superar una serie de obstáculos, especialmente la Barrera Hematoencefálica (BHE) (Manach y col. 2004). La concentración plasmática máxima en humanos raramente sobrepasa 1  $\mu\text{M}$  después del consumo de 10-100 mg de un único compuesto PF; sin embargo, se ha encontrado que la concentración plasmática de compuestos PF totales es mayor debido a la presencia de metabolitos formados en los tejidos corporales o por la microflora del colon (Scalbert y Williamson, 2000).

Para lograr ser biodisponibles los PF, deben primero resistir el medio fuertemente ácido del estómago y en el tracto gastrointestinal (TGI), luego deben ser sometidos a procesos de degradación asociado a enzimas intestinales, como la glicosidasas, esterases, oxidasas, hidrolasas, etc. Finalmente, deben ser sometidas a múltiples procesos metabólicos de la variada microbiota que habita el tracto gastrointestinal (Sousa y col. 2008). La mayor parte de la microbiota gastrointestinal reside en el intestino grueso y la velocidad y grado de metabolización por las bacterias está influenciada por la cantidad de PF que alcance el intestino distal.

Por otro lado, el metabolismo de PF por enzimas del GI puede en algunos casos ser responsable de la destrucción de su bioactividad (Scheepens y col., 2010) Estos aspectos deben ser considerados cuando se extrapolan los efectos de los PF en estudios *in vitro* para la aplicabilidad en *in vivo*. Además, se debe considerar la capacidad de estos compuestos para atravesar la BHE (Youdim y col. 2003), quien controla estrictamente el ingreso al cerebro de los metabolitos y nutrientes, así como de otros compuestos químicos (Rossi y col. 2008). Sólo algunos estudios se han enfocado en este tema, mostrando que los PF de arándanos, suplementados en la dieta de ratas, pueden ser detectados, aunque en muy bajas concentraciones, en algunas regiones del cerebro que son importantes para la memoria, como el hipocampo (Shukitt-Hale y col., 2008).

Por lo tanto, se han planteado diversas estrategias para aumentar la biodisponibilidad cerebral de compuestos con bioactividades, que van desde la

modificación de estos compuestos bioactivos y/o la modificación a la permeabilidad de la BHE, hasta sistemas de liberación controlada (Zhang y Kosaraju, 2007). Entre los sistemas de liberación que actúan como transportadores se encuentran partículas (micro- y nano- partículas) normalmente asociadas a polímeros biodegradables, los cuales han resultado ser sistemas muy eficientes para que un compuesto bioactivo o principio activo farmacéutico alcance su diana farmacológica (Akta y col., 2005).

### 1.6 Quitosano como nanocontenedor

El segundo polisacárido natural más abundante del planeta después de la celulosa es la quitina. Este polisacárido de origen natural está compuesto mayoritariamente por unidades repetitivas de 2-acetamida-2-deoxi- $\alpha$ -D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Figura 6), es estructuralmente similar a la celulosa, diferenciándose por la presencia de grupos acetamida (-NHCOCH<sub>3</sub>) en el C-2. El tratamiento alcalino de este polisacárido provoca la *N*-desacetilación de la molécula para dar origen a quitosano, un polisacárido lineal compuesto por unidades 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Figura 7). La cantidad de quitina que se produce anualmente es muy similar a la cantidad de celulosa, generando un gran interés como recurso no tradicional y subexplotado, potenciándose como un polisacárido aplicable en nuevos biomateriales funcionales de alto potencial en diversos campos. En forma paralela, se ha observado un progreso en el área de su derivatización química con el fin de desarrollar nuevas aplicaciones, llegando a relevancia a nivel internacional (Kumar y col. 2004).

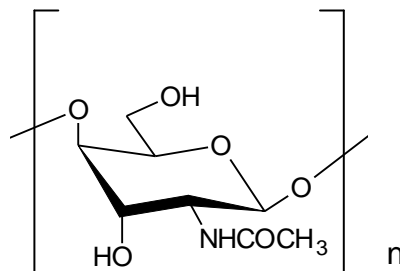


Figura 6. Estructura química de la Quitina

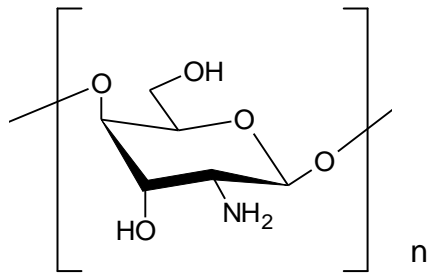


Figura 7. Estructura química del Quitosano

La quitina y el quitosano se proyectan como biomateriales inocuos, ya que no causarían reacciones biológicas adversas presentando un bajo costo como materia prima, lo que potencia su uso como una forma de dosificación y/o sistema de liberación de distintas drogas y principios activos (Bhattarai y col., 2010).

Por lo tanto, considerando la necesidad de prevenir y generar posibles tratamientos a enfermedades neurodegenerativas, en esta tesis se propone utilizar nanopartículas poliméricas como vehículos de compuestos bioactivos con efectos neuroprotectores para aumentar su biodisponibilidad en tejido cerebral.

## **II HIPÓTESIS**

El consumo de polifenoles contenidos en nanopartículas de quitosano aumenta la biodisponibilidad en tejido cerebral de ratas.

### **III OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Determinar la biodisponibilidad en tejido cerebral de ratas *in vivo* de polifenoles comerciales presentes en mirtáceas nativas (ácido gálico, ácido elágico y quercetina) contenidos en nanopartículas de quitosano.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- 3.2.1 Evaluar la biodisponibilidad de polifenoles (AG, AE y Q) luego de un período de consumo de estos compuestos en tejido cerebral de ratas envejecidas cuantificada a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por su sigla en inglés).
- 3.2.2 Evaluar la biodisponibilidad de polifenoles (AG, AE y Q) luego de un período de consumo de nanopartículas de quitosano contenedoras de estos polifenoles en tejido cerebral de ratas envejecidas cuantificada a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- 3.2.3 Comparar la biodisponibilidad de polifenoles (AG, AE y Q) cuando están contenidos y no contenidos en nanopartículas de quitosano en tejido cerebral de ratas envejecidas.

## IV MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Reactivos y Soluciones

- Solventes calidad HPLC: metanol (Merck), ácido acético (Merck), agua UP.
- Reactivos P.A. Merck: HCl al 37%, NaOH, NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, D-glucosa, Sacarosa, Etanol, NaHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Halotano.
- Solución de Perfusión: sacarosa 110 mM, NaCl 60 mM, KCl 3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 28 mM, D-glucosa 5mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 7mM y 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.1.2 Estándares

- Estándares: Ácido Gálico (Sigma), Ácido Elágico (Merck), Quercetina (Sigma).

#### 4.1.3 Instrumentos

- Balanza analítica, pH-metro, agitador magnético, baño ultrasonido
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) constituido por: Desgasificador, Bomba, Inyector manual con loop incorporado de 50 µL, Horno, Detector de arreglo de diodo, manta termorreguladora para columna de HPLC. Modelo y marca
- Columnas de Sílica Sep - Pak (Waters)
- Columna HPLC Inertsil ODS-3 C 4,6 ID x 150 mm (5 µm)
- Guillotina para ratas

#### 4.1.4 Material biológico

- Ratas *Sprague Dawley* hembras envejecidas (1 año dos meses). Las ratas fueron adquiridas al bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

## 4.2 Metodología

### 4.2.1 Preparación y análisis de las soluciones de PF de mirtáceas

Se eligieron tres PF (AG, AE y Q) adquiridos de forma comercial, presentes en semillas de frutos de la familia de mirtáceas nativas (Murta y Arrayán) para preparar la suspensión de PF AOx y la suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano.

Las soluciones se prepararon como una mezcla de una solución hidroalcohólica y los PF con una concentración total de 3,9 mg/mL (AG, AE y Q) y una concentración equivalente contenida en las nanopartículas de quitosano. Dichas soluciones fueron elaboradas mediante protocolos implementados y mantenidos bajo confidencialidad, debido a las patentes involucradas en el proyecto número 8C055 de la fundación COPEC-UC, en el cual se encuentra enmarcada esta tesis.

### 4.2.2 Estudios de biodisponibilidad en ratas

Los estudios de biodisponibilidad se llevaron a cabo en ratas hembras *Sprague Dawley* (n=9), de 350 g de peso promedio aproximadamente, 14 meses de edad, divididos en 3 grupos de experimentación:

- **Grupo I** (n=3): ratas a las cuales se les administró suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano.
- **Grupo II** (n=3): ratas a las cuales se les administró solución de PF AOx libres.

- **Grupo III** (n=3): ratas control a las cuales no se les administró PF AOx (ni libres, ni contenidos en nanopartículas de quitosano).

Los tres grupos de ratas recibieron un tratamiento de suplementación por 14 días, según el grupo de estudio al que pertenecían, a través de administración oral con una única dosis diaria de 200 µL a través de una jeringa de tuberculina de 1 mL. Todas las ratas se mantuvieron en un ambiente entre 23-24 °C y una humedad relativa del 50%, agua y *pellet* normales de alimentación *ad libitum*, sometiéndolas a ciclos circadianos de 12:12 horas/luz:oscuridad. Los animales se encontraban libres de patógenos y con análisis microbiológicos entregados por el bioterio. Se alojaron en jaulas de fondo sólido con viruta como ropa de cama, tapa de rejilla de acero inoxidable y bandeja plástica para la colección de heces y orina. Cada caja se identificó con tarjetas, las cuales contenían el grupo de estudio y detalle de los tratamientos.

El estudio se realizó cumpliendo los requerimientos establecidos por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Anexo I).

#### **4.2.3 Obtención de cerebros de ratas**

Al terminar el tratamiento de suplementación por un período de 14 días, las ratas a las que se les administró: suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano (Grupo I), suspensión de PF AOx (Grupo II) y alimentación normal (Grupo III), fueron anestesiados con una solución de halotano al 99% en un recipiente de plástico con tapa hermética. Luego, fueron perfundidas con la solución de perfusión a fin de desplazar indicios de sangre en el cerebro y disminuir la temperatura cerebral.

Posteriormente las ratas fueron guillotinas. El corte fue realizado en la zona cervical, para acceder a la región cefálica. Con una hoja de doble filo se realizó un corte sagital en el cuero cabelludo de las ratas. El cráneo fue abierto con una tijera quirúrgica y las meninges con pinzas quirúrgicas, el encéfalo se extrajo con una espátula curva y se realizó un corte para eliminar el cerebelo.

Los cerebros así extraídos fueron almacenados en placas de cultivo celular correctamente etiquetados a - 80 °C hasta la extracción de los compuestos y su posterior análisis cromatográfico.

#### **4.2.4 Extracción de PF desde cerebro de rata**

Los cerebros fueron tratados en base al procedimiento descrito por Van Praag y cols. (2007). Las muestras congeladas fueron pulverizadas en un mortero de cerámica previamente enfriado con nitrógeno líquido. Se extrajeron los tejidos pulverizados con 10 mL de metanol preenfriado a -20 °C. Los homogeneizados de cerebro fueron depositados en tubos de centrifugación de 15 mL y llevados a 7500 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se recolectó en tubos de ensayo de vidrio y posteriormente las 9 muestras se sometieron a secado a través de corriente de nitrógeno (N<sub>2</sub>). Las muestras se reconstituyeron con 2 mL de agua UP (previamente filtradas en membranas de 0,22 µm) las cuales fueron pasadas a través de columnas de separación. A continuación, se procedió a utilizar la metodología de separación de PF ácidos y PF neutros (Kim y Lee, 2002). En la Figura 8 se muestra la metodología utilizada.

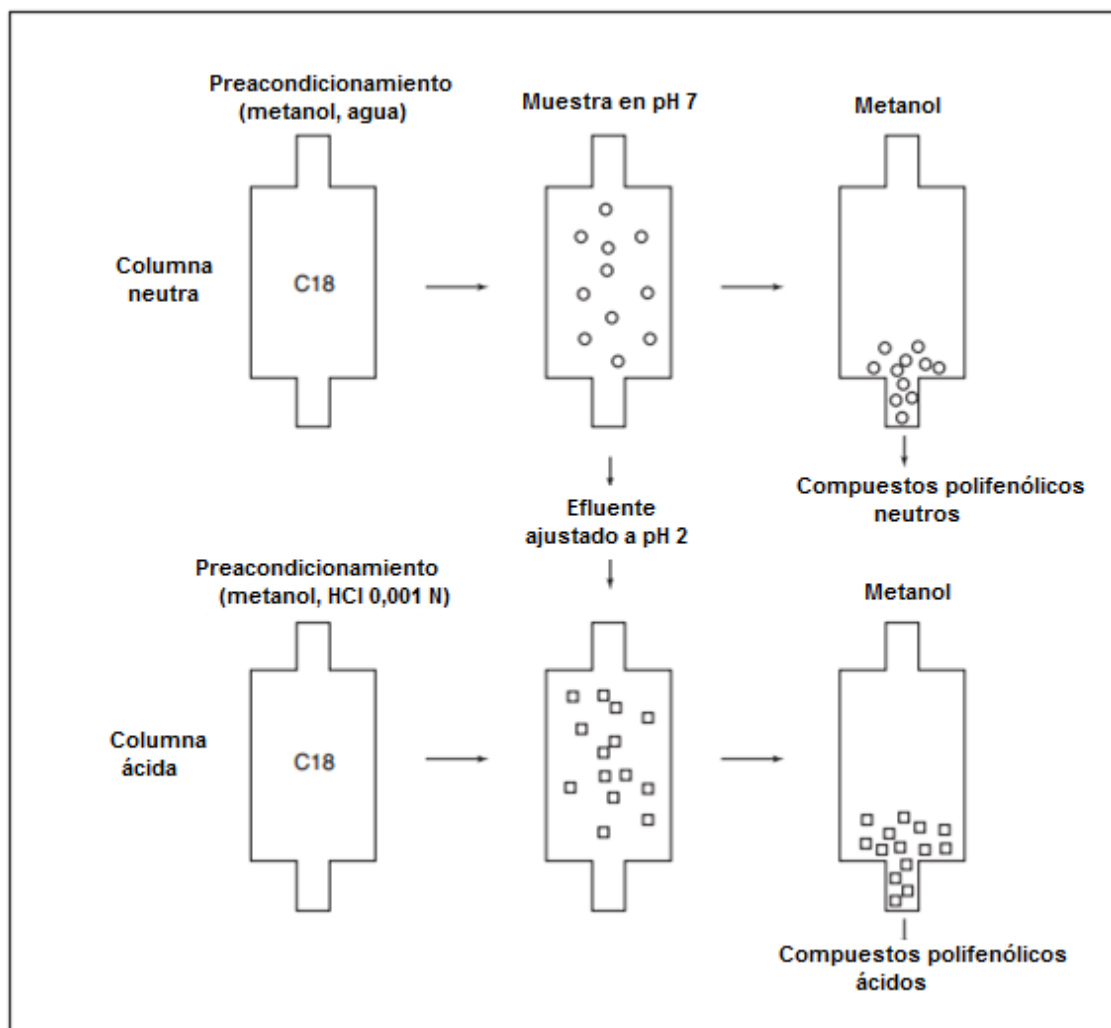


Figura 8. Fraccionamiento de compuestos PF ácidos y neutros utilizando columnas C18 Fase Reversa (FR) (círculos: compuestos PF neutros; cuadrados: compuestos PF ácidos). (Kim y Lee, 2002)

La columna C18 FR Sep-Pak se acondicionó para retener los compuestos PF neutros con 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de agua destilada UP. Se filtró el extracto PF acuoso en membranas 0,22  $\mu\text{m}$  y se ajustó el pH a 7 con una solución de NaOH 5 N. El extracto se sembró en la columna preconditionada de tal modo de absorber los compuestos PF neutros, recolectándose la fracción no retenida. Luego se sembró en una segunda columna preconditionada con 2 mL de metanol seguido de 2 mL de HCl 0,01

M. Se ajustó el pH de la porción de efluente de la primera columna a pH 2 usando HCl 1 M y se pasó a través de la segunda columna, denominada ácida, para absorber los PF ácidos. Tanto los PF neutros y como los ácidos se eluyeron de sus respectivas columnas C18 Sep-Pak con 5 mL de metanol.

#### 4.2.5 Determinación del contenido de PF en homogenizado de tejido cerebral

Las fracciones obtenidas (PF neutros y PF ácidos) se secaron en corriente de N<sub>2</sub>. Las muestras fueron reconstituidas y concentradas con 5 mL de metanol, para luego ser analizadas en un HPLC acoplado a detector con arreglo de diodos (HPLC-DAD) (Tabla 1).

Las condiciones utilizadas en el HPLC se describen a continuación:

Volumen de inyección:	50 µL
Temperatura:	30° C
Longitud de onda:	272 nm para AG y 376 nm para Q
Fase móvil:	Solvente A: Ácido Acético 1% v/v
	Solvente B: Metanol

Tabla 1. Gradiente de elución para la determinación cromatográfica de PF AOx extraídos del tejido cerebral.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Flujo (mL/min)
0	0	100	1,5
2	0	100	1,5
3	40	60	1,5
10	40	60	1,5
12	60	40	1,5
30	60	40	1,5
35	0	100	1,5

La determinación de la cantidad de PF en los tejidos de rata se realizó a través de las curvas de calibración de los estándares, realizando las muestras por triplicado y con dos replicas. La ecuación de la recta de regresión lineal se determinó a partir de la curva de calibración, donde se obtuvo la pendiente (m) y el intercepto con la ordenada (b) para los compuestos PF estudiados (AG, Q y AE). A partir de los parámetros anteriormente mencionados, se corrigieron, extrapolaron y calcularon las concentraciones de los PF AOX presentes en el extracto del tejido cerebral.

#### **4.2.6 Análisis Estadísticos**

Los análisis estadísticos para determinar diferencias significativas entre muestras de extractos de tejido cerebral de ratas suplementadas con una suspensión de PF AOX contenidos en nanopartículas de quitosano, con suspensión de PF AOX y muestras de ratas control, se realizaron mediante la prueba estadística ANOVA, con un nivel de significancia  $p < 0,05$ , utilizando el software *Statgraphics Centurion XVI*.

## V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de la biodisponibilidad de los PF AOx contenidos o no en nanopartículas de quitosano depende de poder determinar la cantidad de PF AOx en el tejido estudiado, por lo que en primer lugar se determinaron rangos de respuesta lineal, a través de la elaboración de curvas de calibración con PF estándares.

### 5.1 Determinación del rango lineal de respuesta de los PF estudiados por HPLC

#### 5.1.1 Curva de calibración de AG

Se estableció un tiempo de retención del AG en la columna de 4,6 minutos (Fig. 9) y una correlación lineal entre la cantidad de AG y su área de respuesta por cromatografía líquida (Fig. 10). Las medidas se realizaron en el máximo de absorción (272 nm) de este compuesto, encontrándose una respuesta lineal entre 11,2 a 112,0  $\mu\text{g/mL}$ , con un coeficiente de correlación lineal de 0,9993 (Anexo II).

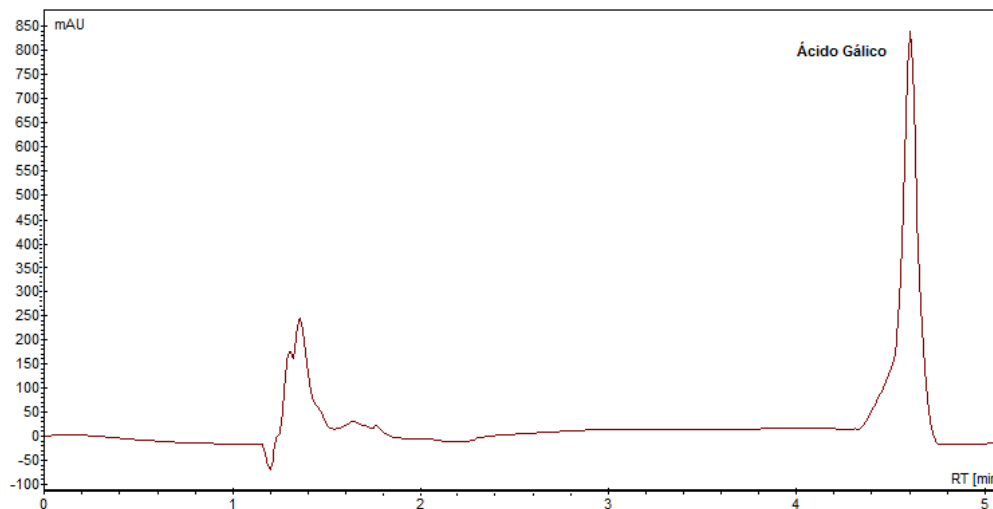


Figura 9. Cromatograma de elución de AG a 100 ppm a una longitud de onda de 272 nm.

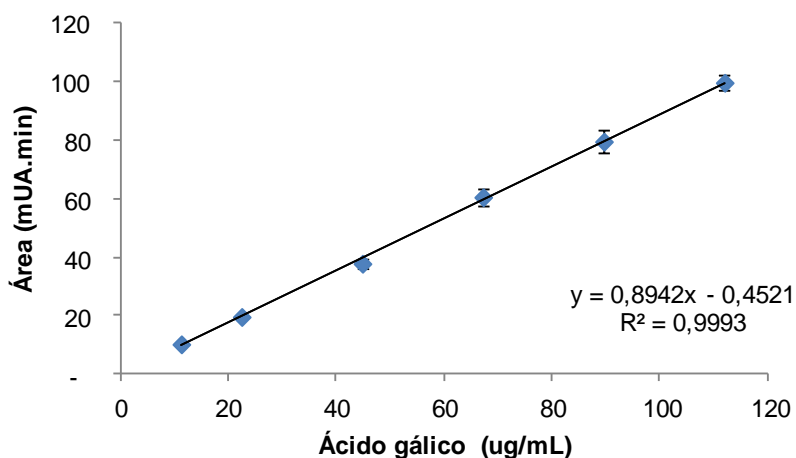


Figura 10. Curva de calibración entre la concentración de AG y el área de respuesta a una longitud de onda de 272 nm.

El rango lineal de respuesta permitió determinar las concentraciones de AG presentes en el tejido cerebral de los animales estudiados.

### 5.1.2 Curva de calibración de Q

Para Q se estableció un tiempo de retención en la columna de 14,6 minutos (Fig. 11) y una correlación lineal entre la concentración del analito y el área de respuesta, encontrándose una buena correlación entre los 13,1 a 131,0  $\mu\text{g/mL}$ , presentando un coeficiente de correlación de lineal de 0,9898 (Fig. 12) (Anexo III). A diferencia del AG la longitud de onda de máxima absorción fue de 376 nm, Q presenta 2 máximos de absorción (376 y 252 nm), exhibiendo un coeficiente de extinción molar mayor a 376 nm, asignable a la banda I del anillo del sistema cinamoil de su estructura química (Patel y col., 2012).

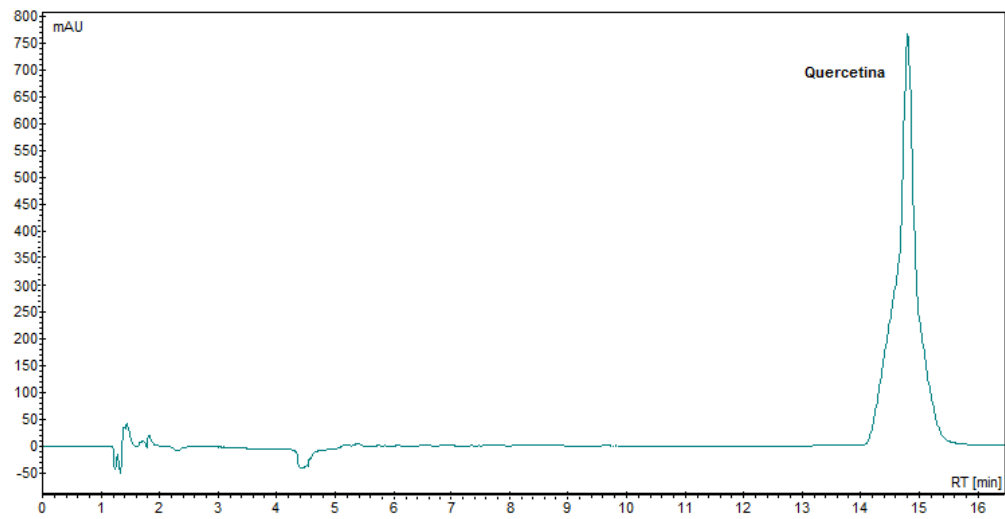


Figura 11. Cromatograma de elución de Q a 100 µg/mL a una longitud de onda de 376 nm.

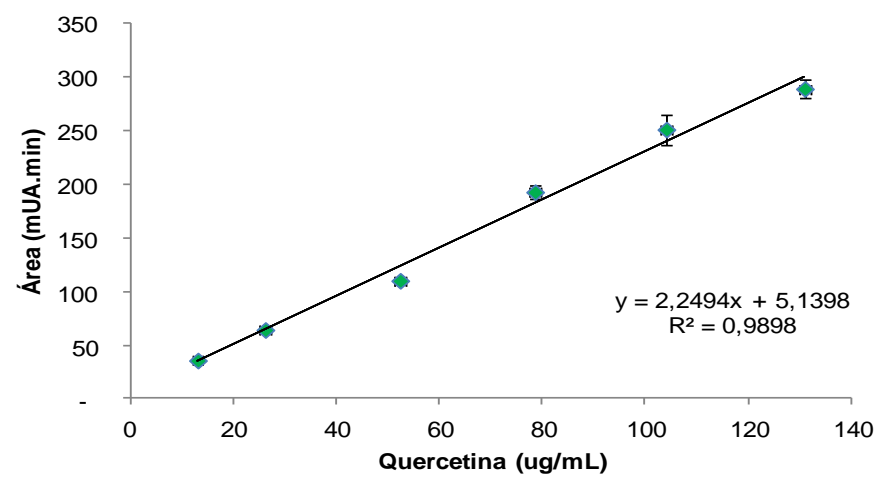


Figura 12. Curva de calibración entre la concentración de Q y el área de respuesta a una longitud de onda de 376 nm.

Dada la metodología utilizada en la extracción de PF desde el tejido cerebral, la cual implicaba el trabajo en soluciones acuosas, se hizo determinante la solubilidad de los

PF en agua. El AE presenta una muy baja solubilidad en estos sistemas, cerca de 70 veces menos que en metanol (Bala y col., 2004), imposibilitando su extracción en las condiciones utilizadas, lo que se tradujo en que sólo el AG y Q fueran cuantificados en este trabajo de tesis.

La diferencia en los tiempos de retención de AG y Q (10 minutos aproximadamente) permitió resolver cromatográficamente la presencia de estos compuestos en los extractos de tejido cerebral estudiado. El orden de elución de estos PF está dado por su polaridad, donde los PF más polares son generalmente los primeros en eluir, es decir, la presencia de grupos hidroxilos y un solo anillo fenólico permiten que este compuesto tenga bajos tiempos de retención (4,6 min), lo que es coherente con lo descrito en literatura (Kim y Lee, 2002), donde plantean que el orden de elución de los ácidos benzoicos (como el AG) está relacionado con su estructura química, específicamente sobre la base del número de grupos hidroxilo (polares) y grupos metoxilos (lipofílicos). El orden de elución de los ácidos benzoicos es el siguiente: ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido vinílico, y el ácido sirínico. La elución de los flavonoides en orden decreciente de la polaridad es la siguiente: catequina, epicatequina, cianidina, rutina, miricetina, quercetina y kaempferol. La acilación de PF reduce su movilidad y por lo tanto aumenta su tiempo de retención en el sistema de fase reversa del HPLC.

El uso de ácidos polares en sistemas de elución acuosos se utiliza normalmente para la mejora de la resolución de mezclas de compuestos de naturaleza orgánica, en este trabajo se utilizó Ácido Acético ( $pK_a$  4,8) lo que permitiría que el AG ( $pK_a$  4,3) estuviera mayoritariamente protonado y por lo tanto mejorará su adsorción en la silica. Por otro lado, una elución en gradiente de fases móviles, da una mayor eficiencia de separación y se emplea normalmente en la separación de mezclas complejas de compuestos PF, como por ejemplo desde materiales vegetales (Kim y Lee, 2002) y que en el caso de este estudio mejoró la separación de AG y Q desde los extractos de tejido cerebral.

## **5.2 Biodisponibilidad de PF AOx de ratas**

El tratamiento de suplementación de PF AOx y PF AOx contenidos en las nanopartículas de quitosano se realizó por 14 días y luego se esperaron 18 horas para la

extracción de los AOx y su posterior identificación y cuantificación por HPLC. El grupo control no fue suplementado.

Los animales estudiados correspondían a hembras de 14 meses y 350 g aproximadamente, en la Tabla 2 se presentan las masas de tejido cerebral obtenido para cada grupo de estudio, asumiendo distribuciones de valores normales, se observó una diferencia significativa entre el grupo control (Grupo III) y los grupos suplementados con PF AOx contenidos y no contenidos en nanopartículas de quitosano (Grupo I y II) con un  $p < 0,05$  (Anexo IV).

Tabla 2. Masa de cerebros de los tres distintos grupos de experimentación

Grupo de Estudio	Número de muestra	Masa tejido cerebral (g)
I PF AOx en nanopartículas	1	1,7914
	2	1,6548
	3	1,7361
	Promedio $\pm$ D.E.	1,7274 $\pm$ 0,0687 <sup>a</sup>
II PF AOx	4	1,8754
	5	1,6077
	6	1,5351
	Promedio $\pm$ D.E.	1,6727 $\pm$ 0,1792 <sup>a</sup>
III Control	7	0,9622
	8	1,0778
	9	1,1030
	Promedio $\pm$ D.E.	1,0477 $\pm$ 0,0751 <sup>b</sup>

Se registraron las masas cerebrales de las distintos grupos de estudio: Grupo I (n=3, ratas alimentadas con suspensión de nanopartículas contenedoras de PF AOx), grupo II (n=3, ratas alimentadas con suspensión de PF AOx) y grupo III (n=3, ratas control). <sup>a</sup> no presenta diferencias significativas, <sup>b</sup> presenta diferencias significativas por análisis estadístico ANOVA (Anexo IV).

Las diferencias significativas entre las masas cerebrales de los animales suplementados con PF AOx resultó ser inesperado, ya que no se encontró información de literatura que manifestará este posible efecto. Por lo que en estudios posteriores se sugiere registrar las masas corporales de las ratas, a fin de normalizar estos valores, ya que el haber registrado las masas de las ratas hubiese permitido estudiar la variabilidad de algún parámetro farmacocinético (absorción, distribución, metabolización y/o excreción de los PF) asociado a la masa de los animales.

No se observaron diferencias morfológicas en los animales tratados en relación a los animales controles, ninguna rata perteneciente a los grupos suplementados presentaba diferencias notorias en tamaño o conductas herráticas.

Se realizó la extracción de PF ácidos (AG y AE) y PF neutros (Q) desde los cerebros de los animales no suplementados (Figura 13 y 14), suplementados con PF AOx (Figura 15 y 16) y suplementados con PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano (Figura 17 y 18).

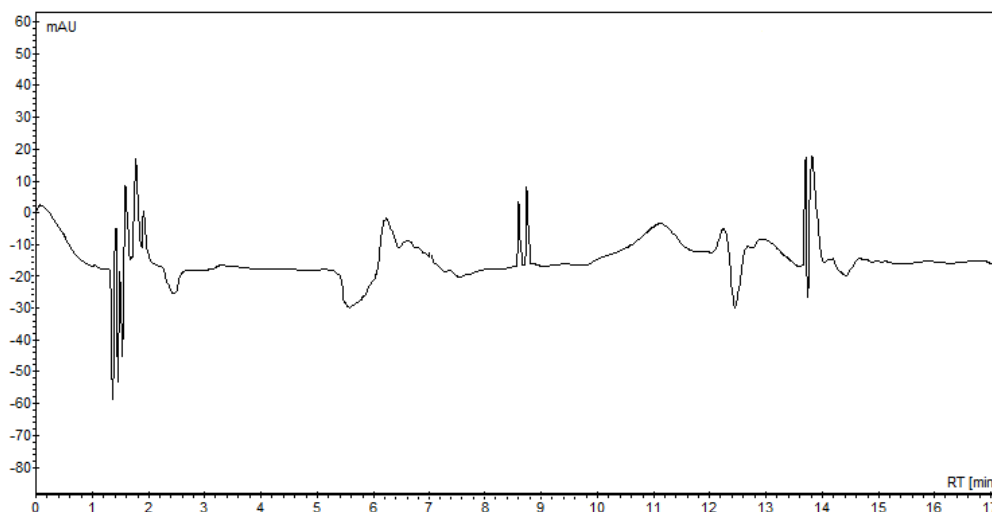


Figura 13. Cromatograma de una muestra de extracto de cerebro de rata sin suplementación (control) obtenido a una longitud de onda de 272 nm.

El cromatograma registrado a 272 nm (Fig. 13), permitió evaluar la presencia de AG, observándose que la respuesta de las ratas control es negativa, debido a que no se observa respuesta asociada al tiempo de retención descrito para AG (4,6 min), sugiriendo que la dieta normal de estos animales no aporta concentraciones observables en las condiciones estandarizadas para este compuesto.

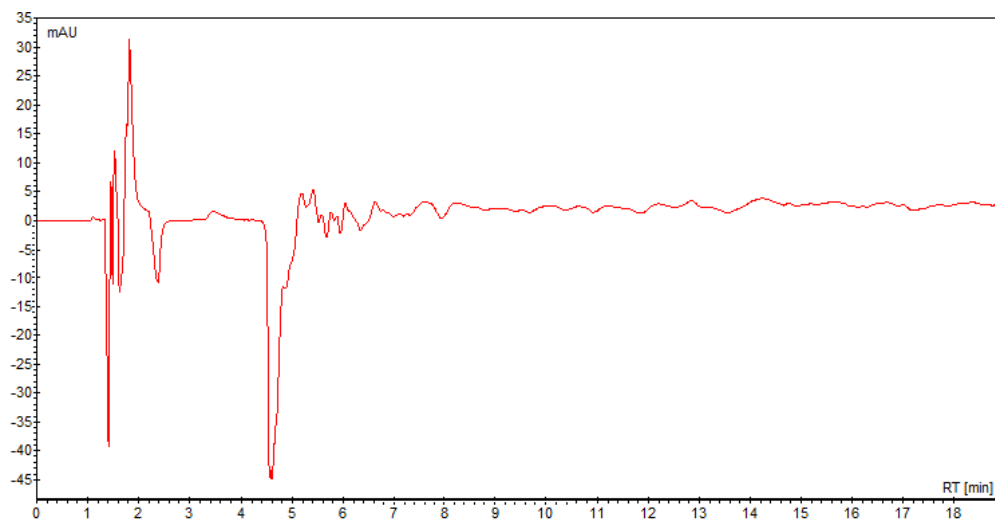


Figura 14. Cromatograma de una muestra de extracto de cerebro de una rata sin suplementación (control) obtenido a una longitud de onda de 376 nm.

En este cromatograma (Fig. 14) no se observó la banda asignada al tiempo de retención asignado a Q, por lo que es posible inferir que la alimentación normal de los animales no aporta cantidades cuantificables de este compuesto.

Dado que los PF podrían alterar la función cerebral de tres puntos: fuera del SNC, en la BHE y en el interior del SNC, por ejemplo directamente en la actividad de neuronas (Shaffer y col., 2012), este estudio cuantificó la biodisponibilidad *in vivo* de estos PF a nivel cerebral, especialmente porque estudios *in vitro* (Lu y col., 2006) muestra efectos antioxidantes directos de los PF AOx, específicamente AG, sobre cultivos neuronales sometidos a oxidación.

Los cromatogramas de las muestras de extracto de cerebro de ratas asociados al tratamiento de suplementación se presentan a continuación:

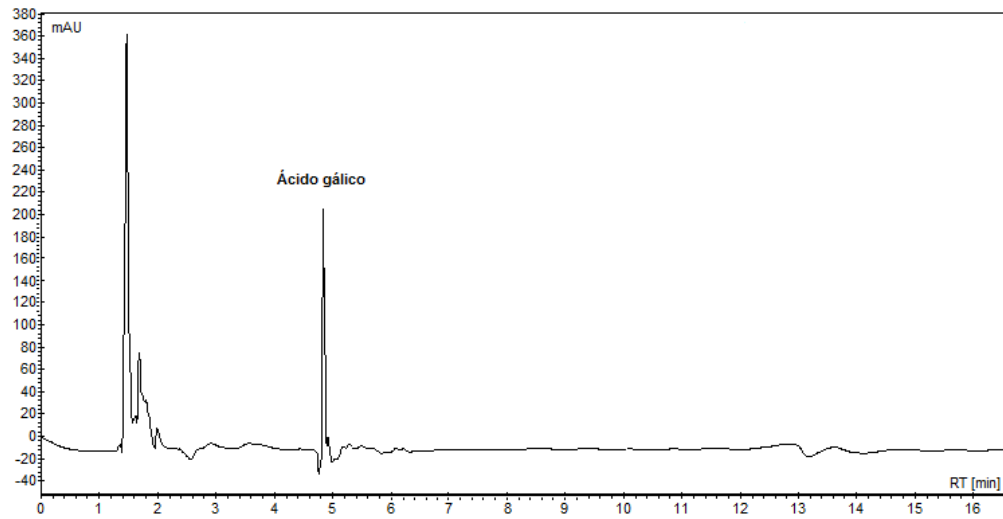


Figura 15. Cromatograma de una muestra de extracto de cerebro de una rata tratada con suspensión de PF AOx (AG, Q y AE) registrado a una longitud de onda de 272 nm.

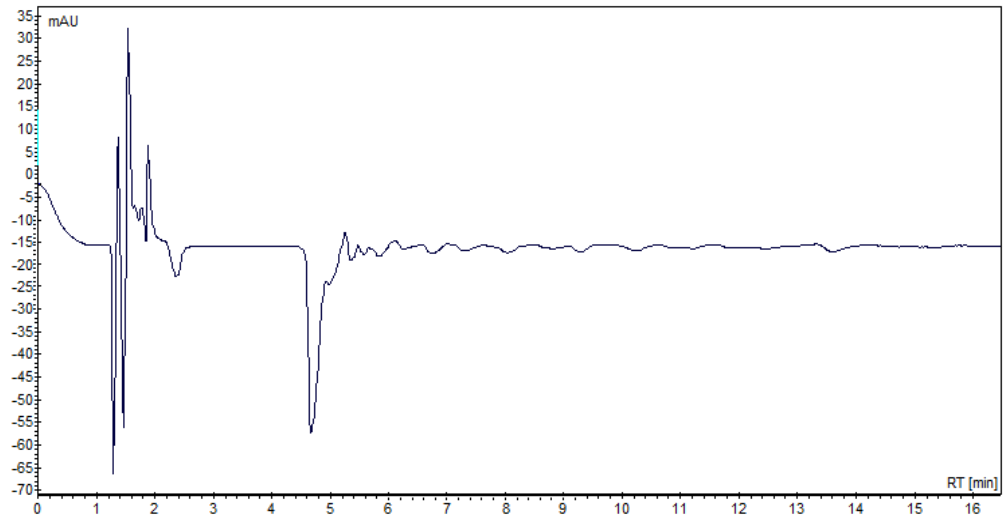


Figura 16. Cromatograma del extracto de una muestra de cerebro de rata suplementada con suspensión de PF AOx (AG, Q y AE) registrado a una longitud de onda de 376 nm.

Los cromatogramas de las muestras de los extractos de cerebro de ratas suplementadas con los PF AOx estudiados (Figura 15 y 16) mostraron claramente el pico asignable al AG (Figura 15, tiempo de retención promedio 4,6 minutos); sin embargo, no se observó la presencia de Q y AE. Por un lado, debe considerarse la baja biodisponibilidad de PF en humanos, ya que se describen concentraciones generalmente menores a 1  $\mu$ M cuando se consumen alimentos ricos en estos compuestos bioactivos o compuestos puros como quercetina, daidzeína, genisteína, ácidos fenólicos u antocianinas, en cantidades que van desde los 10 a 200 mg aproximadamente (Scalbert y Williamson, 2000); y por otro lado, las metodologías utilizadas permitían la extracción de PF de mayor polaridad desde tejido cerebral, limitando la detección al ser sub-cuantificados.

Factores experimentales, como la solubilidad de los PF AOx estudiados limita los resultados obtenidos. La metodología utilizada para la extracción solo permitió obtener AG y Q, pero no AE, como se mencionó anteriormente, debido a la baja polaridad en sistemas acuosos de este último PF (Bala y col., 2004). En el caso del AG, el grupo hidroxilo en posición *para* del anillo aromático primordialmente hace la molécula muy polar. Además, se debe destacar que en las posiciones *meta* también existen grupos hidroxilos los cuales aumentan aún más la polaridad del mismo PF (Kim DO y Lee CY, 2002) permitiendo su cuantificación en los extractos de cerebro (además de otros factores como por ejemplo, la permeabilidad a la BHE) a través de técnicas cromatográficas en las condiciones utilizadas.

Entonces, en la metodología utilizada se propone al AG como un potencial marcador de biodisponibilidad, ya que si él está presente es probable que los otros PF AOx también lo estén.

En las Figuras 17 y 18 se presentan los cromatogramas de los extractos de las muestras de cerebro de ratas suplementadas con suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano. Todos los cromatogramas registrados mostraron mayores respuestas de áreas de los PF AOx, o sea AG (272 nm) y Q (376 nm).

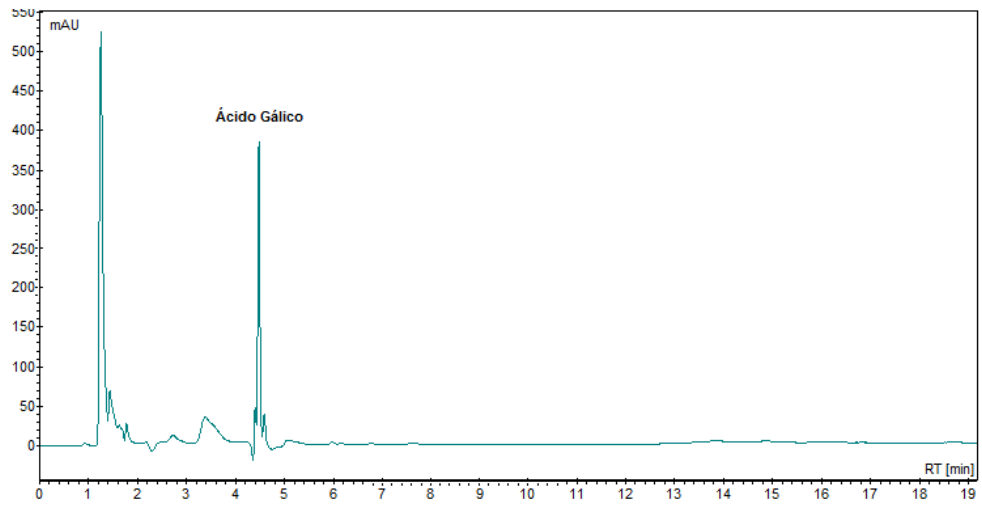


Figura 17. Cromatograma de una muestra de cerebro de una rata suplementada con suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano registrado a una longitud de onda de 272 nm.

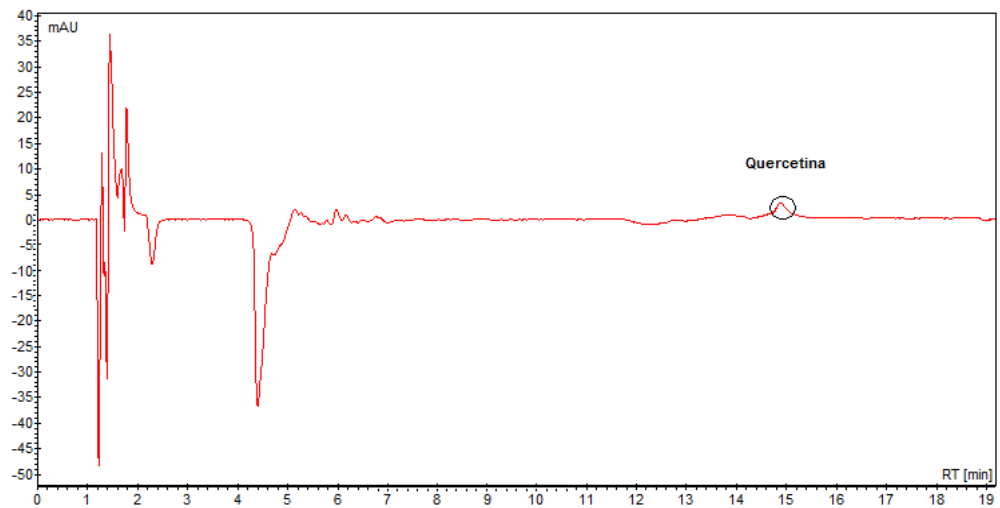


Figura 18. Cromatograma de una muestra de cerebro de una rata suplementada con suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano registrado a una longitud de onda de 376 nm.

El estudio cromatográfico de las muestras de cerebro de ratas suplementadas con suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano, muestra al AG como el compuesto con mayor biodisponibilidad aparente; sin embargo, como ya se ha discutido, esta no es una aseveración exacta dado que las metodologías utilizadas para extraer los PF AOx de los tejidos cerebrales suponían solubilidades de los mismos en los solventes utilizados y estabilidad frente a procesos oxidativos y/o degradativos, por lo que existen variables que limitan la exactitud del estudio, de tal forma que se asume el contenido de AG como un marcador de biodisponibilidad de los PF AOx suplementados, pero no que fue el único biodisponible.

Una pico cromatográfico atribuible a Q fue detectado en uno de los tres cerebros de las ratas suplementadas con suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas (Fig. 18); sin embargo, no es posible confirmar que sea el PF nombrado (quercetina) debido a que la concentración calculada asociada al área en el cromatograma se encuentra por debajo del límite inferior del rango lineal en el cual se trabajó (13,1 µg/mL), aunque corresponde al tiempo de retención ( $t_r=14,5$  min) de este compuesto.

La subestimación debido a pérdidas de dosis de suplementación, con respecto a la manipulación al momento de alimentar las ratas con las suspensiones, puede ser generar algún grado de variación en los resultados obtenidos; sin embargo este efecto también habría afectado al AG. Otro factor agregado que podría variar los resultados es el procedimiento de perfusión de los órganos, (en este caso cerebro) debido a que estudios recientes corroborarían la influencia de la sangre residual en órganos en la cuantificación de sustancias (Schaffer y col., 2012), situación que se trato de minimizar realizando los procedimientos en forma adecuada.

El mecanismo de transporte de Q a través de la BHE se asocia a difusión pasiva debido a su hidrofobicidad. Los transportadores ABC (*ATP binding cassette*, por sus siglas en inglés) pueden actuar por el contrario como bombas de eflujo para este PF (Scheepens y cols., 2010), específicamente con los transportadores ABCB1 y ABCG2 (Bollók y col. 2008) lo cual podría contribuir a la baja biodisponibilidad cerebral de la Q. En estudios *in vitro*, este PF raramente alcanza una concentración plasmática de 1 µM (Scheepens y col., 2010).

Para contrarrestar las variaciones por adsorción de los PF en las columnas de silica (Sep pak) se determinó el porcentaje de recuperación del AG, sembrando una solución patrón con una concentración conocida (50 ppm o  $\mu\text{g/mL}$ ), encontrándose un porcentaje de recuperación del 44,4% del PF, de tal forma que los valores obtenidos a través de la curva de calibración se corrigieron en función de la pérdida observada.

Tabla 3. Masa de AG (mg) total presente en los extractos de cerebro de ratas, después de un período de 14 días de administración de una suspensión de PF AOx (AG, AE y Q).

<b>Muestra Grupo II</b>	<b>AG corregido en cerebro (mg)</b>	<b>AG corregido en cerebro (<math>\mu\text{moles}</math>)</b>
1	0,0267	0,16
2	0,0271	0,16
3	0,0415	0,24
Promedio $\pm$ D.E.	0,0318 $\pm$ 0,0084	0,19 $\pm$ 0,04

Los valores de AG obtenidos para ratas (Tabla 3) son coherentes con los descritos para la biodisponibilidad de PF AOx en humanos (Scalbert y Williamson, 2000).

La absorción de AG administrado por vía oral en ratas se ha estudiado para obtener perfiles farmacocinéticos e investigar sus características de absorción intestinal *in vivo* como se ha mencionado. En un estudio realizado por Konishi y col., 2004 en ratas, 100  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal de AG administrados vía oral se absorben lentamente con un  $t_{\text{máx}}$  (tiempo en alcanzar concentración máxima) para AG intacto de 60 minutos y una  $C_{\text{máx}}$  (Concentración plasmática máxima) de 0,71  $\mu\text{mol / L}$ . Se contrastaron los datos obtenidos por Konishi y col., 2004 con los resultados logrados por el estudio de Shahrzad y col, 2001, el cual muestra las concentraciones plasmáticas en humanos tras la administración de una única dosis de AG 0,3 mmol (50 mg), donde se obtuvo un  $t_{\text{máx}}$  a las  $1.27 \pm 0.20$  horas y un  $C_{\text{máx}}$   $1.83 \pm 0.16$   $\mu\text{mol / L}$ , resultando no ser coherentes, situación que demuestra la necesidad de mayores estudios en esta área.

La polaridad del AG, favorece su estudio como marcador de biodisponibilidad, pero impediría el transporte a través de las membranas celulares (de naturaleza lipofílica) a nivel intestinal. Además el transportador de ácidos monocarboxílicos (por sus siglas en inglés, MCT), el cual actúa como uno de los mecanismos de absorción para este tipo de ácidos, no permite transportar particularmente la molécula de AG (Konishi y col., 2004), generando bajas concentraciones a nivel plasmático y por consecuencia la baja biodisponibilidad observadas a nivel cerebral. Sin embargo, existen otros estudios, al igual que lo descrito anteriormente son contradictorios (Manach y cols., 2005) ya que presentan a este compuesto como extremadamente bien absorbido, en comparación con otros PF.

Tabla 4. Masa de AG (mg) presente en cerebro de ratas, después de un período de 14 días de administración de una suspensión de PF AOx (AG, AE y Q) contenidos en nanopartículas de quitosano.

<b>Muestra Grupo I</b>	<b>AG corregido en cerebro (mg)</b>	<b>AG corregido en cerebro (<math>\mu</math>moles)</b>
1	0,2920	1,72
2	0,2148	1,26
3	0,1824	1,07
Promedio $\pm$ D.E.	0,2297 $\pm$ 0,0563	1,35 $\pm$ 0,33

Al evaluar la biodisponibilidad de AG contenido en nanopartículas de quitosano (Tabla 4) se observa un aumento de aproximadamente 7,6 veces el valor en relación a la biodisponibilidad de PF AOx no contenidos. El análisis de ANOVA demuestra que la diferencia encontrada entre los grupos I y II con respecto a la masa de AG en cerebro son significativas con  $p < 0,05$  (Anexo V).

Debido a la corta vida media de eliminación AG descrita (1,3 hrs aproximadamente), este compuesto no tiene ninguna posibilidad de acumularse en el plasma con la ingestión repetida, aunque algunos de sus metabolitos pueden tener semividas más largas. Sin embargo Q, con una vida media más larga, podría acumularse en el plasma con la ingestión repetida (Manach y col., 2005). Los resultados obtenidos en

la Tabla 4 (ratas suplementadas con suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano) muestran un significativo aumento de las concentraciones cerebrales de AG (marcador de biodisponibilidad) en comparación a los resultados de la Tabla 3 (ratas suplementadas con suspensión de PF AOx), pudiendo esta diferencia ser explicada mediante la utilización de las nanopartículas de quitosano, las cuales actuarían como vehículos nanocontenedores y/o protectores de distintos principios activos y compuestos bioactivos como los PF impidiendo actuar a los sistemas enzimáticos metabólicos y a otros factores atenuantes de la biodisponibilidad plasmática y cerebral.

Además de su función protectora y nanocontenedora de principios bioactivos, se ha descrito que partículas de quitosano mejoran la absorción de moléculas hidrofílicas por medio del transporte epitelial a través de la vía paracelular y podría abrir las uniones estrechas entre las células a través de un efecto sobre los filamentos de actina (Huang y col., 2009). Incluso, el quitosano podría tener la capacidad de liberar de forma prolongada (como sistema de liberación controlada) y/o controlada (Bhattarai y col., 2010) a los PF utilizados.

En la Figura 19 y 20 se presentan los resultados de biodisponibilidad del AG (en mg y  $\mu$ moles respectivamente) en extracto de cerebro de rata, en relación al comportamiento promedio del grupo, mostrando que pese a la desviación estándar de los dos grupos de muestras, hay diferencias significativas estadísticamente como se describió anteriormente para cada rata participante de los grupos.

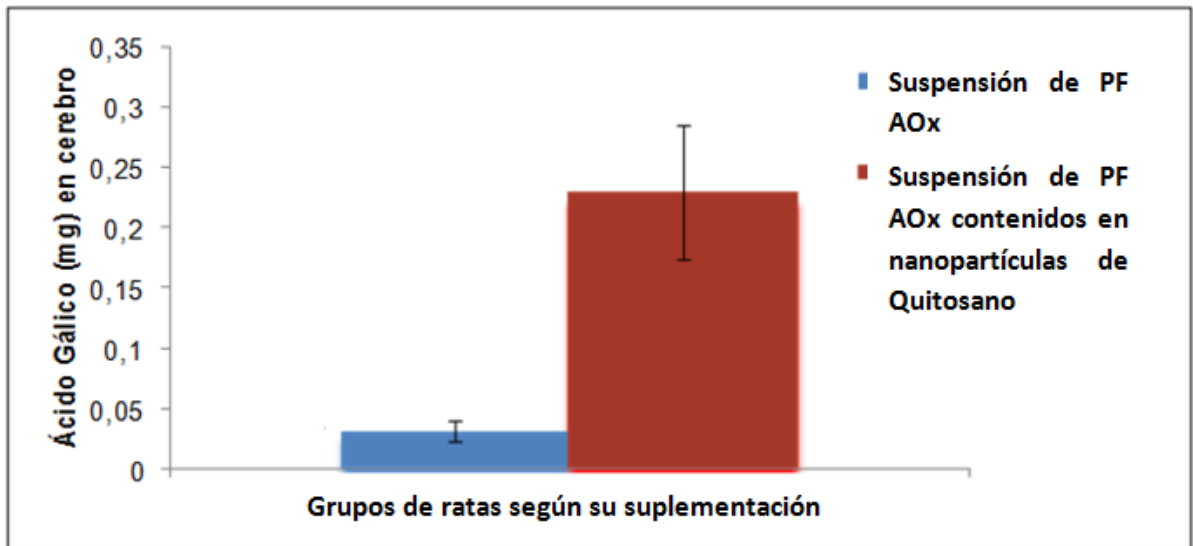


Figura 19. Gráfico de comparación de AG (en mg) biodisponible en cerebro según su suplementación: PF AOx y PF AOx contenidos en nanopartículas de Quitosano ( $p < 0,05$ , Anexo VI).

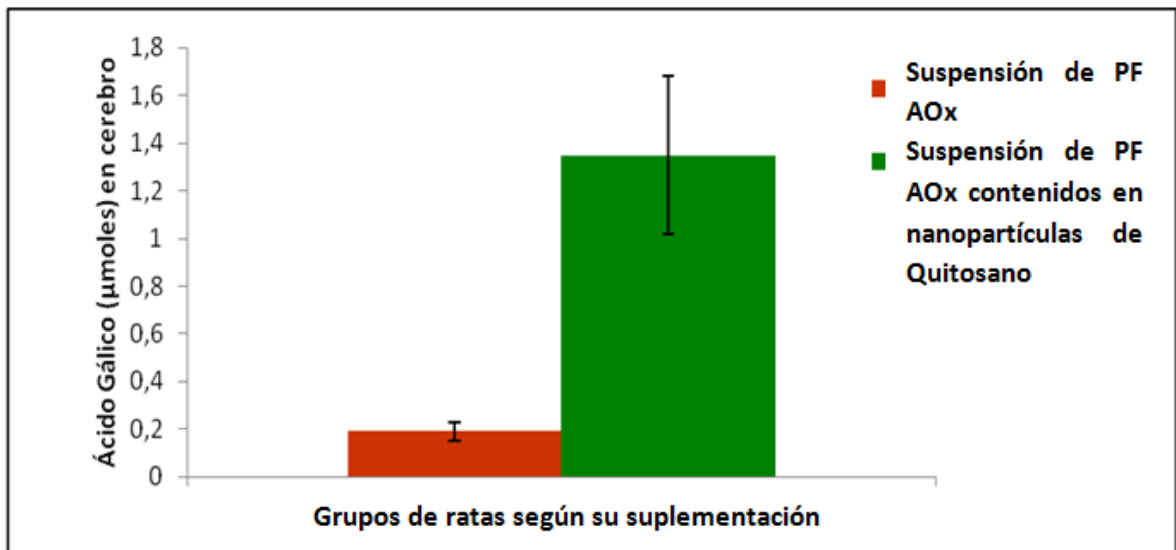


Figura 20. Gráfico de comparación de AG (en μmoles) biodisponible en cerebro según su suplementación: PF AOx y PF AOx contenidos en nanopartículas de Quitosano ( $p < 0,05$ , Anexo VII).

Es necesario tener en cuenta que los tiempos de degradación de los PF son menores a las 2 horas (Stevenson y Hurst, 2007) y las medidas se realizaron a las 18 horas de la última suplementación, por lo que sí se considera este factor, los resultados presentados permitirían inferir que existe una cantidad mayor de la detectada y que es posible que las nanopartículas estén aumentando los tiempos de vida media de estos compuestos bioactivos; sin embargo, esta inferencia necesita nuevas investigaciones, tiempo y recursos adicionales a este trabajo de tesis.

Sin duda, las nanopartículas ejercen un efecto en la biodisponibilidad de los compuestos estudiados, ya sea de liberación controlada o de protección de los mismos, en cualquiera de los dos casos, el resultado es una mayor biodisponibilidad en el órgano objetivo, en este caso en cerebro de animales envejecidos, potenciando a las nanopartículas contenedoras de PF AOX como nutracéuticos o ingredientes de alimentos funcionales que permitan prevenir enfermedades neurodegenerativas.

## VI CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis de que el consumo de PF, específicamente AG, presentes en mirtáceas nativas y contenidos en nanopartículas de quitosano aumentan la biodisponibilidad de estos PF AOx en tejido cerebral de ratas envejecidas.

El trabajo desarrollado en este trabajo de tesis permitió concluir lo siguiente:

- Las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución, resultaron ser herramientas eficientes en la evaluación de la biodisponibilidad de PF AOx en cerebros de ratas envejecidas, especialmente para AG y en menor grado Q.
- La solubilidad de los PF AOx estudiados fue determinante en las metodologías de extracción de los PF desde tejido cerebral y en los procesos de purificación de los mismos, afectando la detección de Q y AE.
- La biodisponibilidad de AG en tejido cerebral de ratas envejecidas aumentó en 7,6 veces cuando estaban contenidos en nanopartículas de quitosano, potenciándose el AG como un buen marcador de biodisponibilidad.

## VII BIBLIOGRAFÍA

- Akta Y, Yemisci M, Andrieux XK, Gürsoy RN, Alonso MJ, y col. 2005. Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconjug Chem.* 16: 1503-1511.
- Aruoma OI, Bahorun T, Jen LS. 2003. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mut. Res.* 544: 203–215.
- Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar MN. 2006. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *J Pharm Biomed Anal.* 40(1):206-210
- Bhattarai N, Gunn J, Miqin Zhang M. 2010. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 62: 83–99.
- Beal MF.1998. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta.* 10; 1366: 211-223.
- Behrens MI y Vergara F. 2007. Cien años de la enfermedad de Alzheimer. La inmunoterapia ¿una esperanza?. *Rev Méd Chile.* 135: 103-110.
- Blumberg J. 2004. Use of biomarkers of oxidative stress in research studies. *J Nutr.* 134: 3188S-3189S.
- Bollók M, Jánossy J y Krajcsi P. 2008. ABC transporters in the blood-brain barrier – Relevance in stroke therapy. *Rec Adv Stroke Res.* 2: 1-23
- Boyer J y Liu RH. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J.* 3: 1-15.
- Calíbrese V, Boyd-Kimball D, Scapagnini G y Butterfield DA. 2004. Nitric Oxide and Cellular Stress Response in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders: The Role of Vitagenes. *In Vivo.* 18: 245-268.
- Campos-Esparza MR, Sánchez-Gómez MV, Matute C. 2009. Molecular mechanisms of Neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium.* 45: 358-368.

- Cantuti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA. 2000. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *Int J Dev Neurosci.* 18:367– 381.
- Circu ML, Aw TY. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 48: 749–762.
- D'Archivio M, Filesì C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. 2010. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 1321-1342.
- Diéterlen F, Lucotte G. 2010. Origin of the G2019S mutation associated to Parkinson's disease in Europeans and in North Africans. *Int J Mod Anthropol.* 3: 81-96.
- Dowling DK, Simmons LW. 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc Biol Sci.* 276: 1737–1745.
- Ebrahimi A, Hermann Schluesener H. 2012. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev.* 11: 329–345.
- Espín JC, González-Barrio R, Cerda B, López-Bote C, Rey AI y Tomás-Barberán F. 2007. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J Agric Food Chem.* 55: 10476–10485.
- Findley L, Aujla M, Bain PG, Baker M y Beech C. 2003. Direct economic impact of Parkinson's disease: A research survey in the United Kingdom. *Mov Disord.* 18: 1139-1145.
- Friedlander RM. 2003. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. *N Engl J Med.* 348: 1365-1375.
- Gelinas S, Martinoli MG. 2002. Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP<sup>+</sup>-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res.* 70: 90–96.
- Gottlieb M, Leal-Campanario R, Campos-Esparza MR, Sánchez-Gómez MV, Alberdi E y col. 2006. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiol Dis.* 23: 374-386.

- Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. 2009. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 46: 241-281.
- He QLvY, Yao K. 2006. Effects of tea polyphenols on the activities of  $\alpha$ -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chem.* 101: 1178–1182.
- Hoffmann A, Farga C, Lastra J, Veghazi E. 1992. Plantas Medicinales de Uso Común en Chile. Fundación Claudio Gay: Santiago, Chile, pp 273.
- Huang X, Du Y-Z, Yuan H, Hu F-Q. 2009. Preparation and pharmacodynamics of low-molecular-weight chitosan nanoparticles containing insulin. *Carbohydr. Polym.* 76: 368–373
- Huse, D.M., Schulman, K., Orsini, L., Castelli-Haley, J., Kennedy, S., Lenhart, G., 2005. Burden of illness in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 20, 1449–1454.
- Janca A. 2002. Parkinson's disease from WHO perspective and a public health point of view. *Parkinson Rel Disord.* 9: 3–6.
- Kim DO y Lee CY. 2002. Extraction and Isolation of Polyphenolics, Current Protocols in Food Analytical. Unidad I: 1.2-1.3
- Koppenol WH. 2001. 100 years of peroxy nitrite chemistry and 11 years of peroxy nitrite biochemistry. *Redox Rep.* 6: 339 –341.
- Kregel KC y Zhang HJ. 2007. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292: 18-36.
- Kukull WA, Ganguli M. 2000. Epidemiology of dementia: concepts and overview. *Neurol Clin N Am.* 18: 923-49.
- Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H y Domb AJ. 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev.* 104: 6017-84.
- Lorenz M, Jochmann N, von Krosigk A, Martus P, Baumann G, Stang, K, et al. 2007. Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. *Eur Heart J.* 28: 219–223.

- Lu Z, Nie G, Belton PS, Tang H, Zhao B. 2006. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochem Int.* 48: 263-74.
- Madsen E, Gitlin JD. 2007. Gitlin. Copper and Iron Disorders of the Brain. *Annu Rev Neurosci.* 30: 317-337.
- Maher P y Davis JB. 1996. The Role of Monoamine Metabolism in Oxidative Glutamate Toxicity. *J Neurosci.* 16: 6394–6401.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C y Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79: 727–47.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 81: 230– 242
- Moon SK, Cho GO, Jung SY, Gal SW, Kwon TK, Lee YC, et al. 2003. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2 cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun.*; 301: 1069-1078.
- Naasani I, Oh-hashii F, Oh-hara T, Feng W Y, Johnston J, Chan K, et al. 2003. Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 63: 824–830.
- Nassiri-Asl M y Hosseinzadeh H. 2009. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytother Res.* 23: 1197–1204.
- Nathan C, Ding A. 2010. SnapShot: reactive oxygen intermediates (ROI). *Cell.* 140: 951-951.
- Nitta Y, Kikuzaki H, Ueno H. 2007. Food components inhibiting recombinant human histidine decarboxylase activity. *J Agric Food Chem.* 55: 299–304.
- Ossola B, Kääriäinen TM, Männistö PT. 2009. The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert Opin Drug Saf.* 8 (4):397-409

- Pandey A, Hazari P, Patnaik R, Mishra A. 2011. The role of ASIC1a in neuroprotection elicited by quercetin in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1383:289-99
- Patel AR, Heussen PCM, Hazekamp J, Drost E, Velikov KP. 2012. Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. *Food Chem.* 133(2):423–429
- Powers SK, Jackson MJ. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88: 1243–1276.
- Ramassamy C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol.* 545: 51–64.
- Ritz MF, Ratajczak P, Curin Y, Cam E, Mendelowitsch A, Pinet F y Andriantsitohaina R. 2008. Treatment with Red Wine Polyphenol Compounds Mediates Neuroprotection in a Rat Model of Ischemic Cerebral Stroke. *J Nutr.* 138: 519–525.
- Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, Capo CR y Rotilio G. 2008. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 33: 2390-2400.
- Rubilar M, Jara C, Poo Y, Acevedo F, Gutiérrez C y col. 2011. Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae Turcz*): Sources of Antioxidant Compounds and  $\alpha$ -Glucosidase/  $\alpha$ -Amylase Inhibitors. *J Agric Food Chem.* 59: 1630–1637.
- Scalbert A, Johnson IT y Saltmarsh M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.* 8: 215–217. (A)
- Scalbert A, Manach C, Morand C y Rémésy C. 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 45: 287–306. (B)
- Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073S-2085S. (C)

- Schaffer S, Halliwell B. 2012 Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes Nutr* 7:99–109
- Scheepens A, Tan K, Pastón JW. 2010. Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes Nutr*. 5: 75–87.
- Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*. 36: 30–38.
- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V y Ramassamy CH. 2008. Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms. *J Agric Food Chem*, 56: 4855–4873.
- Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B, Basit AW. 2008. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *Int J Pharm*. 363: 1–25.
- Shukitt-Hale B, Lau FC, Carey AN, Galli RL, Spangler EL, Ingram DK, Joseph JA. 2008. Blueberry polyphenols attenuate kainic acid-induced decrements in cognition and alter inflammatory gene expression in rat hippocampus. *Nutr Neurosci*. 11:172-82.
- Shukla V, Mishra SK y Pant H C. 2011. Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci*. (2011): 1-13.
- Spencer JPE. 2008. Flavonoids: modulators of brain function?. *British J Nutr*. 99: 60–77.
- Stevenson DE, Hurst RD. 2007. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more?. *Cell Mol Life Sci*. 64: 2900 – 2916.
- Subhankar P. 2008. Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. *Bioessays*. 30: 1172-1184.
- Sutherland BA, Rahman RMA, Appleton I. 2006. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem*. 17: 291–306.

- Twelves D, Perkins KS y Counsell C. 2003. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 18: 19-31.
- Uttara B, Singh AV, Z Tamboni P y Mahajan RT. 2009. Oxidative Stress and neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol.* 7: 65–74.
- Van Praag H, Lucero MJ, Yeo GW, Stecker K, Heivand N y col. 2007. Plant-Derived Flavanol (-)Epicatechin Enhances Angiogenesis and Retention of Spatial Memory in Mice. *J Neurosci.* 27: 5869–5878.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160: 1–40.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem & Cell Biol.* 39: 44–84.
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA y Nelson LM. 2003. Incidence of Parkinson's disease: Variation by age, gender and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 157: 1015-1022.
- Vinson J A, Zubik L, Bose P, Samman N, Proch J. 2005. Dried Fruits: Excellent *in vitro* and *in vivo* Antioxidants. *J Am Col Nutr.* 24: 44–50.
- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ. 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *Am J Bot.* 88: 2013-2025.
- Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. 2004. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med.*; 36: 592-604.
- Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C. 2003. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem.* 85:180-92.
- Zhang L, Kosaraju SL. 2007. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *Eur Poly J.* 43: 2956-2966.

- Zhao B. 2009. Natural Antioxidants Protect Neurons in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Neurochem Res.* 34: 630-638.
- Zsila F, Bikadi Z, y Simonyi MS. 2003. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods. *Biochem Pharmacol.* 65: 447–456.

## ANEXO I

Resumen del acta de aprobación por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias de la UV para la utilización de animales de experimentación (ratas) en el proyecto “Formulación de nanofibras de quitosano contenedoras de compuestos antioxidantes para su potencial uso en neuroprotección” en donde se encuentra enmarcada esta tesis.



FACULTAD DE CIENCIAS  
Comité de Bioética para la  
Investigación

### ACTA DE EVALUACION BIOETICA

I. El Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Valparaíso constituido por: Dr. Agustín Martínez, Dr. Marco Fuenzalida, Dra. MV Claudia Delgado y M Cs. Juan Carlos Espinoza, en su sesión del 19 de agosto del presente declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto: “**FORMULACIÓN DE NANOFIBRAS DE QUITOSANO CONTENEDORAS DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES PARA SU POTENCIAL USO EN NEUROPROTECCIÓN**”, presentado por la investigadora responsable Dra. Elisa Zúñiga perteneciente a la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación y por el co-investigador Dr. Pablo Muñoz, adscrito a esta Facultad.

Por lo anterior, el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias **aprueba** el protocolo experimental.

Firma el Acta el Presidente del Comité de Bioética, en representación del Comité.

Valparaíso, 19 de Agosto de 2011.



Juan Carlos Espinoza Ibáñez  
Presidente Comité de Bioética  
Facultad de Ciencias – UV

## ANEXO II

### Datos para la determinación de la curva de calibración de AG

$$y = 0,8942x - 0,4521$$

$$R^2 = 0,9993$$

Concentración del estándar (ppm)	Área (mAU. min)	Promedio (ppm)	Desviación estándar (ppm)	Error (%)
112	99,7			
112	98,6			
112	97,2			
112	103,6	99,8	2,7	2,8
89,6	83,8			
89,6	75,1			
89,6	78,6			
89,6	81,0	79,6	3,7	4,6
67,2	62,6			
67,2	56,9			
67,2	63,6			
67,2	59,3	60,6	3,1	5,1
44,8	36,5			
44,8	39,5			
44,8	37,0			
44,8	38,4	37,9	1,4	3,6
22,4	19,4			
22,4	20,0			
22,4	19,5			
22,4	19,5	19,6	0,3	1,4
11,2	10,1			
11,2	10,5			
11,2	10,2			
11,2	10,3	10,3	0,2	1,7

### ANEXO III

#### Datos para la determinación de la curva de calibración de Q

$$y = 2,2494x + 5,1398$$

$$R^2 = 0,9898$$

Concentración del estándar (ppm)	Área (mAU. min)	Promedio (ppm)	Desviación estándar (ppm)	Error (%)
131	290,1			
131	276,2			
131	293,0			
131	296,8	289,0	9,0	3,1
104,1	231,8			
104,1	263,8			
104,1	251,5			
104,1	257,2	251,1	13,8	5,5
78,6	197,6			
78,6	186,6			
78,6	194,0			
78,6	192,7	192,7	5,6	2,9
52,4	106,2			
52,4	111,8			
52,4	112,2			
52,4	110,1	110,1	3,4	3,0
26,3	65,2			
26,3	64,0			
26,3	63,3			
26,3	64,2	64,2	1,0	1,5
13,1	34,2			
13,1	36,6			
13,1	36,2			
13,1	36,7	35,7	1,3	3,6



## ANEXO V

**Informe de análisis de varianza (ANOVA de una vía) determinado por software *Statgraphics Centurion XVI* para ver diferencias significativas entre masas de AG por muestra de cerebro,**

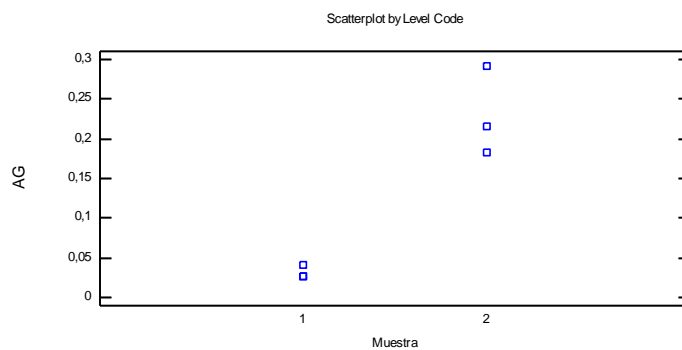
ANOVA de una vía: AG por muestra

Variable dependiente: AG

Factor: Muestra

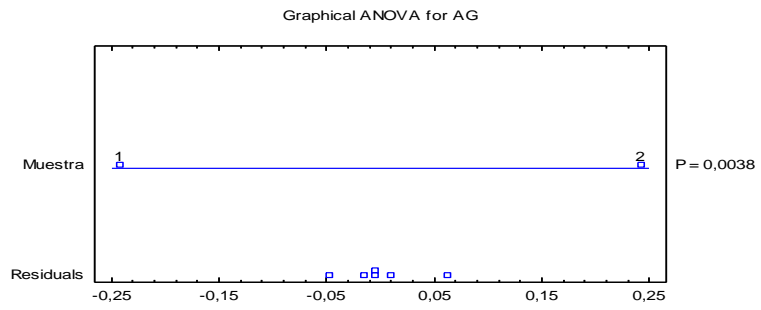
Número de observaciones: 6

Número de niveles: 2



### ANOVA Tabla para AG por Muestra

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado promedio	Razón F	Valor P
Entre grupos	0,0587862	1	0,0587862	36,27	0,0038
En grupos	0,00648277	4	0,00162069		
Total (Corr.)	0,065269	5			



**Software:** Statgraphics Centurion

XVI.

Se realizó análisis ANOVA para 2 variables, con un 95% de confianza.

## ANEXO VI

1= Muestras de cerebros de ratas suplementadas con suspensión de PF AOx

2= Muestras de cerebros de ratas suplementadas con suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano

### ANOVA Tabla para AG corregido (mg) en cerebro por Muestra

Origen	Suma de Cuadrados	Df	Media Cuadrática	F-Ratio	P-Valor
Entre grupos	0,0587862	1	0,0587862	36,27	0,0038
Dentro del grupo	0,00648277	4	0,00162069		
Total (Corr.)	0,065269	5			

La tabla ANOVA descompone la varianza de la AG Corregido (mg) en cerebro en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. El F-valor, que en este caso es igual a 36,2723, es una relación de la estimación entre los grupos de la estimación dentro del grupo. Dado que el P-valor de la prueba F es inferior a 0,05, es decir existen diferencias estadísticamente significativas entre la muestra 1 y 2, para un nivel de confianza del 95%.

## ANEXO VII

1= Muestras de cerebros de ratas suplementadas con suspensión de PF AOx

2= Muestras de cerebros de ratas suplementadas con suspensión de PF AOx contenidos en nanopartículas de quitosano

### ANOVA Tabla para AG corregido en cerebro ( $\mu$ moles) por Muestra

Origen	Suma de Cuadrados	Df	Media Cuadrática	F-Ratio	P-Valor
Entre grupos	2,03002	1	2,03002	35,67	0,0039
Dentro del grupo	0,227667	4	0,0569167		
Total (Corr.)	2,25768	5			

La tabla ANOVA descompone la varianza de la AG Corregido ( $\mu$ moles) en cerebro en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. El F-valor, que en este caso es igual a 35,6665, es una relación de la estimación entre los grupos de la estimación dentro del grupo. Dado que el P-valor de la prueba F es inferior a 0,05, es decir existen diferencias estadísticamente significativas entre la muestra 1 y 2, para un nivel de confianza del 95%.