

Nanoberries: cómo transportar antioxidantes a través de la piel para protegerla de la radiación UV

Bucci, Paula L.¹
Calienni, Natalia¹
Alonso, Silvia¹
Montanari, Jorge A.^{1,2}

RESUMEN

Palabras clave: Arándanos, Polifenoles, Liposomas ultradeformables, Bloqueo de acción UV

Los *Nanoberries* consisten en una formulación liposomal ultradeformable de un extracto etanólico de arándano (*Vaccinium myrtillus*), rico en antioxidantes, principalmente antocianinas y otros compuestos polifenólicos. Los liposomas, obtenidos por resuspensión de una solución de fosfolípidos cuyo solvente se ha eliminado previamente por evaporación, tienen un tamaño promedio de menos de 120 nm luego de someterlos a sonicación, y contienen al extracto en su interior acuoso. La adición de un activador de membrana a los fosfolípidos que conforman los liposomas les confiere ultradeformabilidad, esto es, la capacidad de cambiar de forma sin perder estructura a temperatura ambiente. Dicha característica los hace especialmente útiles para la vía tópica ya que pueden penetrar en el estrato córneo en lugar de funcionar solamente como un reservorio en el exterior de la piel, lo cual permitiría aprovechar la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos para bloquear la acción de radicales libres originados por el ataque de rayos UV solares. En el presente trabajo se explica su preparación por un nuevo método y se presentan resultados de penetración cutánea, así como se plantea su potencial aplicación como formulación cosmética protectora del daño a la piel.

1 Laboratorio de Biomembranas, GBEyB, IMBICE (CONICET, grupo vinculado UNQ), Bernal, Buenos Aires, Argentina.

*2 UNAM-National Nanotechnology Research Center, Institute of Materials Science and Nanotechnology, Bilkent University, Ankara, Turquía.
jmontanari@unq.edu.ar*

SUMMARY

Key words: Blueberries, Polyphenols, Ultradeformable liposomes, UV-blocking

Nanoberries are an ultradeformable liposome formulation of an ethanolic extract from blueberry (*Vaccinium myrtillus*), rich in antioxidants, mainly anthocyanins and other polyphenolic compounds. Liposomes are obtained by resuspension of a phospholipid solution in which solvent was previously removed by evaporation. They have a mean size under 120 nm after undergoing sonication, and they carry the extract in their inner aqueous space. The addition of a border activator to the phospholipid solution confers ultradeformability to the formulation, allowing the liposomes to change their shape without losing structure, at room temperature. Such a feature makes them specially useful for the topical way, as they can penetrate the *stratum corneum* instead of act only as a reservoir in the outer surface of the skin. This would allow to take profit of the antioxidant capacity of the encapsulated polyphenols for blocking the action of free radicals, originated by exposure to environmental UV sunlight. In this work we explain a new method for their preparation and we present preliminar results on cutaneous penetration. We also explore their potential application as a cosmetic formulation for protecting skin damage.

• INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son un grupo amplio de compuestos que presentan un interés especial como principios activos cosméticos dado su gran capacidad antioxidante. La misma está conferida por los grupos hidroxilos o anillos aromáticos que contienen [1]. Los arándanos (*Vaccinium myrtillus*) contienen gran cantidad de estas sustancias [2], principalmente del tipo de las antocianinas, que además de ser altamente solubles en agua, entre sus propiedades no son solamente se cuenta su poder antioxidante [3], sino que también se ha descrito su acción cardioprotectiva [4] y antiinflamatoria [5], entre otras. El contenido total de antocianinas en los arándanos ronda los 6 g por kg de fruta [2]. Es de principal importancia la inocuidad de los antioxidantes naturales en comparación con antioxidantes sintéticos, de los cuales se ha reportado carcinogenicidad potencial [6, 7]. Sin embargo, el consumo por vía oral de arándanos no es suficiente para lograr una buena biodistribución de los antioxidantes ya que la absorción a nivel intestinal es muy baja, menos del 1%, [8], además de que los compuestos se metabolizan apenas ingresan a través del epitelio del intestino [9]. Por otro lado, los puentes de hidrógeno intermoleculares que forman, los hacen poco capaces de difundir a través de membranas biológicas [10].

Por otro lado, los radicales libres generados por el ataque de rayos UV, principalmente UVA y UVB, oxidan compuestos presentes en las células, dañándolas, y también activan mecanismos celulares que producen un ataque sobre el colágeno que brinda estructura y soporte a la piel [11]. Es por ello que resulta atractiva la idea de obtener una formulación de antioxidantes del arándano que pueda ser aplicada tópicamente, transportada por un vehículo adecuado, con el fin de proteger *in situ* a la piel del ataque de las especies reactivas del oxígeno generadas por la llegada de los rayos UV [12].

En ese contexto, fueron desarrollados los *Nanoberries* (NB) [13] basados en liposomas ultradeformables (LU) hechos de fosfatidilcolina de soja y colato de sodio. El colato de sodio confiere deformabilidad a la membrana, haciendo caer drásticamente su módulo elástico respecto de los liposomas convencionales [14], lo que les permite penetrar a través del estrato córneo (EC) transportando su contenido a la epidermis viable [15], a diferencia de los liposomas convencionales que no logran transpasar esa primera barrera impermeable que separa al interior del cuerpo humano de su entorno [16], lo cual es útil para una diversidad de aplicaciones

en el ámbito de la nanomedicina [15, 17, 18] y potencialmente para la nanocosmética [19, 20]. La caracterización biofísica de los NB arrojó resultados de baja citotoxicidad, alta actividad antioxidante, y buenos parámetros de estabilidad [13].

• MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los arándanos (variedad "Millenia"), fueron donados por *The Berry Store* (San Pedro, Argentina). La fosfatidilcolina de soja (FCS), el colato de sodio (CS), el fosfolípido marcado con un fluoróforo, 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Lissamina rhodamina B sulfonil) (Rh-PE), el Sephadex G-50, el reactivo de Folin-Ciocalteu y el ácido gálico fueron comprados a Sigma-Aldrich (Argentina). Los demás reactivos fueron comprados en grado analítico a Anedra.

Obtención del extracto etanólico

Los arándanos utilizados fueron cosechados durante la primavera de 2013 en San Pedro, Argentina (Latitud 33°45' S, Longitud 59°45' O. Altura sobre el nivel del mar: 36 m) y mantenidos en freezer a -18°C. El extracto de la fracción rica en polifenoles fue preparado en base al trabajo de Montanari [13]. Brevemente, 25 g de fruta fueron descongelados a temperatura ambiente y luego cortados con tijera y disgregados en mortero, luego se agregaron 150 mL de etanol 96% y HCl al 0,1%. Tras 60 minutos de sonicación de baño a 25°C y 40 kHz, se filtró en kitasato. El etanol, y el agua contenida en la fruta, fueron eliminados en rotavapor hasta obtener peso constante. El proceso rindió en promedio 2,6 gramos de extracto (aproximadamente un 10% del peso de la fruta fresca). Se preparó una curva de calibración por espectrofotometría para la cuantificación del extracto obtenido, midiéndose absorbancia a 585 nm sobre alícuotas de diferente concentración (7 puntos por triplicado).

Determinación de polifenoles y antocianinas

El contenido total de polifenoles en el extracto fue determinado por el método de Folin-Coicalteu [21, 22] utilizando ácido gálico como estándar. Se mezclaron alícuotas de una dilución en etanol conteniendo 0,25 mg del extracto con 11,5 mL de agua y 0,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu bajo agitación. Tras 5 minutos se agregaron 0,75 mL de Na₂CO₃ al 2%, se incubó por 2 hs y se comparó contra la curva de calibración obtenida con el ácido gálico, midiéndose absorbancia a 760 nm en un espectrómetro de mesada.

Las antocianinas monoméricas del extracto fueron determinadas por el método del pH diferencial [23] en el que se agregaron sendas alícuotas del extracto a dos soluciones amortiguadoras, una de pH 1,0 y la otra de pH 4,5 midiéndose absorbancia a 520 nm y a 700 nm, tomando como estándar los valores para la cianidina-3-glucósido [24] y calculándose el contenido de antocianina en mg por litro según el trabajo de Montanari *et al.* (2013)[13].

Preparación y caracterización de Nanoberris

Los NB fueron preparados adaptando el método previo [13], que está a su vez basado en las publicaciones originales para la preparación de LU [25], reemplazando los largos pasos preparativos por extrusión con una sonicación que en total lleva 3 minutos. Brevemente, se mezclaron FCS y CS en proporción 6:1 en masa y se disolvieron en CHCl₃:CH₃OH (1:1, v/v) para luego evaporarse los solventes en rotavapor a 40 °C, obteniéndose una película delgada liposomal en la pared de un balón. Los liposomas entonces se formaron por

rehidratación con una solución de 6,13 mg de extracto seco en 1 mL de buffer Tris con 0,9% de NaCl, pH 7,4, a razón de 40 mg de SPC por mL de solución de rehidratación. La suspensión obtenida fue sometida a agitación ultrasónica (3 ciclos de 30 segundos a 10.000 W con un sonicador de punta, separados por iguales períodos de descanso) para reducir el tamaño y la lamelaridad. El tamaño y el potencial zeta se determinaron por dispersión de luz dinámica con un equipo Brookhaven. Asimismo, la presencia de los NB fue confirmada por microscopía electrónica de barrido (MEB), a partir de suspensiones liofilizadas en presencia de un 20% de sacarosa.

Adicionalmente, fueron preparados como controles NB multilamelares (MLV) (sin el paso de sonicación) y NB no ultradeformables (NBNU), obtenidos sin adición de CS.

Penetración *ex vivo*

Los ensayos de penetración se hicieron en base a Montanari *et al.* (2010) [20]. Brevemente, un Modelo de Penetración de Saarbrücken (MPS) fue utilizado en conducciones no oclusivas, incubando los NB sobre descortes de cirugía estética de piel humana, de la región abdominal de un paciente masculino sano. Se utilizaron liposomas marcados con la sonda fluorescente rodamina (RhPE) en la membrana lipídica, y conteniendo al extracto en su interior acuoso. El tejido adiposo fue retirado de la piel y la misma fue congelada a -26 °C. Se cortaron discos de piel entera (EC, epidermis y dermis) de 24 mm de diámetro con un sacabocados y se colocaron en el MPS, donde se le aplicaron 11 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de la suspensión liposomal, es decir 0,12 mg de fosfolípidos/ cm^2 de las distintas formulaciones obtenidas, y se incubaron por 1 h a 32 °C. Luego, en algunos explantos se hicieron cortes transversales con un micrótopo y la piel fue observada al microscopio de fluorescencia para determinar cualitativamente la penetración de la RhPE. Otros explantos fueron segmentados por la técnica de *tape stripping* [20, 15], agrupándose las 20 cintas sucesivas en tres grupos: 1-3, 4-10, y 11-20, correspondiendo a EC superior, medio y profundo, respectivamente, para ser luego sometidas a un proceso de extracción (1 h de agitación orbital a 35 °C en una mezcla de etanol y agua 1:1 v/v) para determinar la concentración de extracto en cada una de ellas en base a la curva de calibración previamente obtenida.

• RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto etanólico obtenido presentó un contenido total de polifenoles de 0,129 mg/mL, correspondiendo el 26,4 % a antocianinas monoméricas, fracción responsable de la actividad antioxidante [23], valores dentro de los rangos esperables para los frutos de la familia de los berries [26]. La curva de calibración obtenida para la cuantificación del extracto fue la siguiente: $y=0,0171x+0,0097$, $R^2=0,9987$

Los liposomas obtenidos presentaron una concentración de fosfolípidos de 52,6 μM y tuvieron 113,7 nm de diámetro promedio, con una desviación estándar de 0,7 y un índice de polidispersión de 0,262. El potencial ζ fue de -8.9 mV. Los valores para NBNU no difirieron significativamente de los hallados para NB, mientras que los MLV presentaron un tamaño de 608,2 nm promedio, con 12,9 de desviación estándar y 0,324 como índice de polidispersión.

Las imágenes por SEM coincidieron con los datos de tamaño, Figura 1, observándose liposomas esféricos unilamelares.

Notablemente, en controles adicionales liofilizados sin sacarosa (datos no mostrados) pudo determinarse por MEB que se conservó la estructura de los liposomas. Normalmente se necesita la presencia de un crioprotector al liofilizar liposomas para que estos no coalescan durante el proceso [27]. Es posible que la alta cantidad de azúcares contenidos en el extracto etanólico presente en la formulación actúen por sí mismos como crioprotectores ante la eliminación del agua.

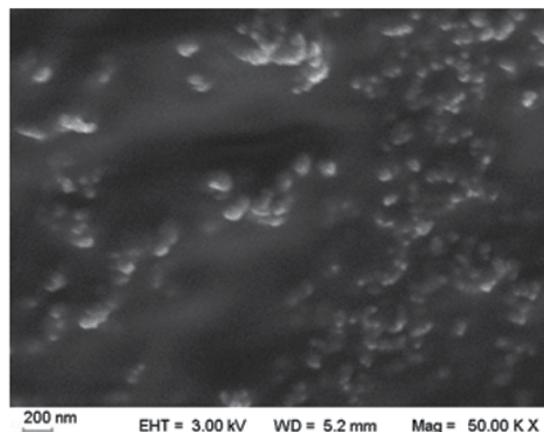


Figura 1: Imagen por MEB donde se observan los NB con 50.000 aumentos.

Los ensayos de penetración por *tape stripping* revelaron una mayor recuperación del extracto en todas las regiones del EC cuando fue administrado en forma de NB. No se observaron diferencias significativas en la distribución de las demás formulaciones, que tuvieron todos perfiles de penetración mucho menores que el obtenido para NB, Figura 2. El uso de un control unilamelar no ultradeformable y de uno ultradeformable no unilamelar puso de manifiesto que el éxito de la penetración de los NB se debe a la conjunción de ambas características. La penetración, en condiciones no oclusivas, se debe a la presión de deshidratación generada por el gradiente de humedad existente a través del estrato córneo (CEVC el mismo número de antes), por eso, al comenzar a secarse la suspensión, los liposomas son presionados por esta fuerza hacia el interior. Sólo las formulaciones ultradeformables pueden escurrirse a través de los canales estrechos entre los corneocitos, que tiene solo un par de decenas de nanómetros de ancho. Los demás liposomas, ya sea por su tamaño mucho mayor o por la rigidez de su membrana, no consiguen ingresar al EC.

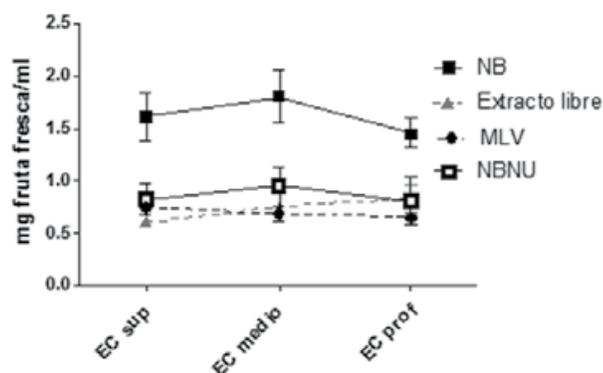


Figura 2: Penetración de formulaciones en EC por la técnica de *tape stripping*. Se observan las cantidades de extracto recuperadas de los grupos de cintas correspondientes a EC superior, medio y profundo para todas las formulaciones.

Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron concordantes con los perfiles de penetración, encontrándose la marca de la membrana liposomal ultradeformable distribuida a lo ancho de todo el estrato córneo de los explantos de piel, Figura 3.

Es importante tener en cuenta que para contrarrestar reacciones radicalarias tanto como las producidas por especies reactivas del oxígeno, se requiere la presencia de moléculas antioxidantes en el mismo lugar

donde se generan las primeras. Por ello resulta sumamente promisorio contar con un sistema de entrega de antioxidantes que permita atravesar el EC transportándolos hasta la epidermis viable.

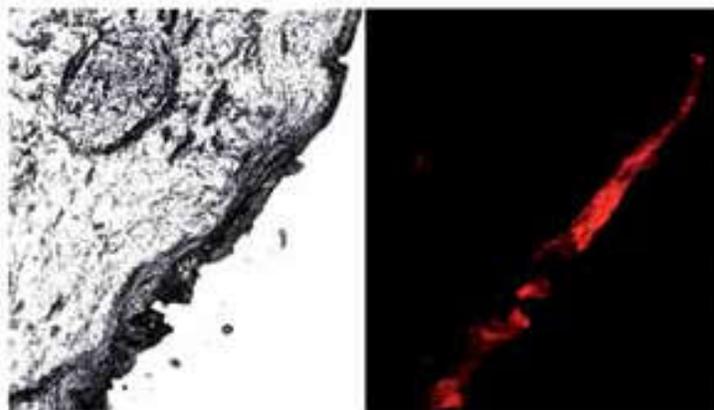


Figura 3: Corte transversal de piel incubada con NB marcados con RhPE. Se observa el mismo sector de piel en ambas imágenes, por microscopía óptica (izq) y de fluorescencia con filtro para rodamina (der)

• CONCLUSIONES

Los extractos de arándano son fácilmente incorporados a liposomas ultradeformables manteniendo la funcionalidad de sus compuestos polifenólicos. De esta manera pueden penetrar en la piel por la vía tópica, y así entonces se pueden disponibilizar cantidades de antioxidantes que sería muy difícil de acumular en la piel a través del consumo del fruto por vía oral. Estos antioxidantes naturales e inocuos podrían ejercer una acción *in situ* reaccionando rápidamente con radicales libres generados por exposición a la fracción UV de los rayos solares.

Actualmente, nuestra investigación continúa con experimentos para evaluar la disminución del fotodaño producido por rayos UV sobre cultivos celulares incubados con NB, midiendo su viabilidad luego de la exposición a fuentes de radiación, y con la formulación de hidrogeles conteniendo NB para facilitar su aplicación sobre la piel.◊

• AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Jorge Kaial (director de "The Berry Store") por proveer los arándanos, y al Dr. Humberto Jimenez. Montanari y Alonso son miembros de la Carrera del Investigador del CONICET. Calienni es becaria doctoral del CONICET.

• REFERENCIAS

[1] Evans, C.S., J. B. Harborne (ED.) *Methods in plant biochemistry: 1. plant phenolics*. Academic Press, Phytochemical Analysis, 2(1), 48-48 New York and London, USA and UK. 1991.

[2] Kähkönen, M.P., J. Heinämäki, V. Ollilainen and M. Heinonen. *Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83(14), 1403-1411. 2003.

[3] Kahkonen, M.P., A.I. Hopia and M. Heinonen. *Berry*

phenolics and their antioxidant activity. J Agric Food Chem, 49(8), 4076-82. 2001.

[4] Hertog, M.G., E.J. Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan and D. Kromhout. *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study*. Lancet, 342(8878), 1007-11. 1993.

[5] Seeram, N.P. *Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease*. J Agric Food Chem, 56(3), 627-9. 2008.

[6] Sun, B. and M. Fukuhara. *Effects of co-administration*

- of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicology*, 122(1-2), 61-72. 1997.
- [7] Hirose, M., Y. Takesada, H. Tanaka, S. Tamano, T. Kato and T. Shirai. *Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model*. *Carcinogenesis*, 19(1), 207-12. 1998.
- [8] Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert and C. Rémésy. *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans*. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S-242S. 2005.
- [9] Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy and L. Jiménez. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747. 2004.
- [10] Lipinski, C.A., F. Lombardo, B.W. Dominy and P.J. Feeney. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Adv Drug Deliv Rev*, 46(1-3), 3-26. 2001
- [11] Cascales Angosto, M. and J.A. Álvarez-Gómez. *Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer*. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 76(1), 59-84. 2010
- [12] Burdulis, D., A. Sarkinas, I. Jasutiene, E. Stackedevicene, L. Nikolajevs and V. Janulis. *Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits*. *Acta Pol Pharm*, 66(4), 399-408. 2009.
- [13] Montanari, J., Vera, M., Mensi, E., Morilla, M., Romero, E. *Nanoberrries for topical delivery of antioxidants*. *Journal of Cosmetic Science*, 64, 469-481. 2013.
- [14] Cevc, G. and G. Blume. *Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force*. *Biochim Biophys Acta*, 1104(1), 226-32. 1992.
- [15] Montanari, J., C. Maidana, M.I. Esteva, C. Salomon, M.J. Morilla and E.L. Romero. *Sunlight triggered photo-dynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark*. *Journal of Controlled Release*, 147(3), 368-76. 2010.
- [16] Cevc, G. and D. Gebauer. *Hydration-driven transport of deformable lipid vesicles through fine pores and the skin barrier*. *Biophys J*, 84(2 Pt 1), 1010-24. 2003.
- [17] Hernandez, I., Martinetti Montanari, Jorge, Escobar Rivero, P. *In vitro activity against *Leishmania* and human skin permeation of miltefosine ultradeformable liposomes*. *Rev Cubana Med Trop*. 66(3):370-385. 2014.
- [18] Hernandez, I., Montanari, J., Valdivieso, W., Morilla, M., Romero, E., Escobar, P. *In vitro phototoxicity of ultradeformables liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World *Leishmania* species*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117, 157-163. 2012.
- [19] Li, D., Z. Wu, N. Martini and J. Wen. *Advanced carrier systems in cosmetics and cosmeceuticals: a review*. *J Cosmet Sci*, 62(6), 549-63. 2011.
- [20] Montanari, J., Morilla, M., Romero, E. *Liposomas ultradeformables para aplicación tópica: una herramienta para modular el destino de principios activos cosméticos a través del estrato córneo*. *Cosmética: revista de ciencia y tecnología cosmética*, 78 (2):17-24. 2011.
- [21] Chandler, S.F. and J.H. Dodds. *The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum laciniatum**. *Plant Cell Reports*, 2, 105-108. 1983.
- [22] Slinkard, K. and V.L. Singleton. *Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55. 1977.
- [23] Nicoue, E.E., S. Savard and K. Belkacemi. *Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification*. *J Agric Food Chem*, 55(14), 5626-35. 2007.
- [24] Francis, F.J. and P.C. Markakis. *Food colorants: Anthocyanins*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(4), 273-314. 1989.
- [25] Cevc, G. *Material Transport Across permeability Barriers by Means of Lipid Vesicles*. In *Handbook of biological physics*, Lipowsky and Sachman, Editors, Elsevier Science BV: Amsterdam. p. 465-489. 1995.
- [26] Böhm, H., G. Mazza und E. Miniati. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. 362 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo. *Food / Nahrung*, 38(3), 343-343. 1994.
- [27] Montanari, J., Roncaglia, D., Lado, L., Morilla, M., Romero, E. *Avoiding failed reconstitution of ultradeformable liposomes upon dehydration*. *International Journal of Pharmaceutics*, 372(1-2), 184-190. 2009.