



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES

Síntesis y caracterización de nanocápsulas multicapa LBL de κ -carragenina/quitosana con uso potencial en la liberación de activos.

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS DE MATERIALES

Por:

CARMEN SARAI ROCHIN WONG

Hermosillo, Sonora.

Agosto del 2018

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Esta tesis se realizó en los laboratorios del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora, en el Departamento de Química y Edafología de la Universidad de Navarra y en los laboratorios del Núcleo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (NICDET) de Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V. bajo la dirección de la Dra. Judith Celina Tánori Córdova. Parte de los recursos fueron obtenidos de los proyectos CONACyT 242943 y 269519 y por Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V.

DEDICATORIA

A Dios por bendecirme día con día, por su infinita bondad y amor.

A mi madre por enseñarme a ser quien soy y brindarme su amor y apoyo en cada momento de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Universidad de Sonora, al Posgrado en Ciencia de Materiales, a la Universidad de Navarra y al Núcleo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico por el apoyo y las herramientas necesarias para el logro de este trabajo.

A mi directora de tesis, Dra. Judith Celina Tánori Córdova por ser mi asesora, amiga y en verdad mi MAESTRA en varios aspectos de mi vida, por confiar en mí y apoyarme en todo momento GRACIAS.

A mis sinodales, Dr. Amir Darío Maldonado Arce, Dr. Paúl Zavala Rivera, Dr. Aarón de Jesús Rosas Durazo, Dra. Itziar Vélaz Rivas y Dra. María Elisa Martínez Barbosa por su apoyo, su tiempo y asesoría GRACIAS.

A mis amigos y compañeros de posgrado, por esos momentos de ánimo y motivación cuando fue necesario y por ofrecerme su amistad y compañía en tantos momentos de felicidad.

A mi familia, por ser mi soporte y apoyo incondicional en los momentos difíciles y acompañarme con gran alegría en mis éxitos, por amarme tanto GRACIAS.

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis. La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

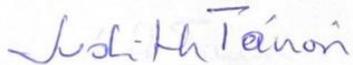
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Castro', with a stylized flourish at the end.

Dra. Teresa del Castillo Castro

Jefe del Departamento

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de doctorado de la M.C. **Carmen Sarai Rochín Wong**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.



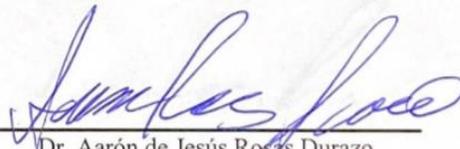
Dra. Judith Celina Tánori Córdova
Presidente



Dr. Amir Darío Maldonado Arce
Secretario



Dr. Paúl Zavala Rivera
Sinodal



Dr. Aarón de Jesús Rosas Durazo
Sinodal externo



Dra. Itziar Vélaz Rivas
Sinodal externo



Dra. María Elisa Martínez Barbosa
Sinodal

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
VOTOS APROBATORIOS	V
ÍNDICE.....	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xiii
NOTACIÓN	xiv
ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xx
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Sistemas de liberación de activos	2
2.1.1. Emulsiones	3
2.1.1.1. Surfactantes	4
2.1.2. Soporte de emulsión para el desarrollo de nanocápsulas poliméricas.....	5
2.2. Polielectrolitos	5
2.2.1. κ -Carragenina	6
2.2.2. Quitosana.....	7
2.2.3. Complejo κ -CAR/QUI.....	8
2.3. Desarrollo de nanoestructuras multicapa mediante la técnica layer-by-layer (LBL)	8
2.3.1. Sustratos planos	9
2.3.2. Sustratos coloidales	9
2.3.2.1. Cápsulas huecas.....	10
2.3.2.2. Emulsiones multicapa	11
2.4. Activos Lipofílicos	12
2.4.1. Diflunisal (DF)	12
2.5. Liberación Controlada de Activos	13
2.5.1. Modelos cinéticos de liberación	14
2.5.1.1. Korsmeyer-Peppas	14

2.5.1.2.	Higuchi	15
2.5.1.3.	Primer Orden	15
2.5.1.4.	Orden Zero	16
3.	JUSTIFICACIÓN.....	17
4.	OBJETIVOS.....	18
4.1.	Objetivo general.....	18
4.2.	Objetivos específicos.....	18
5.	METODOLOGÍA	19
5.1.	Materiales.....	19
5.2.	Síntesis de nanoemulsión (NE).....	19
5.3.	Síntesis de nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI) _x por la técnica de autoensamblaje layer-by-layer.....	20
5.4.	Caracterización de la NE y de las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI) _x	21
5.4.1.	Mediciones de tamaño de partícula y potencial zeta (ζ).....	21
5.4.2.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	22
5.4.3.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	22
5.4.4.	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	23
5.4.5.	Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)	23
5.5.	Liberación	24
5.5.1.	Eficiencia de encapsulación.....	24
5.5.2.	Liberación <i>in vitro</i>	24
5.5.3.	Determinación del mecanismo de liberación por modelado matemático	25
5.5.3.1.	Modelo Korsmeyer-Peppas	25
5.5.3.2.	Modelo Higuchi.....	26
5.5.3.3.	Modelo cinético de primer orden	26
5.5.3.4.	Modelo cinético de orden cero	26
5.6.	Análisis Estadístico.....	27
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1.	Caracterización de los polímeros.....	28
6.1.1.	κ -carragenina	28
6.1.2.	Quitosa	29
6.2.	Síntesis de nanocápsulas LBL	30

6.2.1.	Efecto de la dilución de la emulsión.....	30
6.2.2.	Efecto de la dilución de la NE sobre la deposición polimérica.....	32
6.2.3.	Efecto del lavado de los sistemas.....	35
6.3.	Tamaño y polidispersión de las Nanocápsulas LBL NE(κ -CAR/QUI) _x	40
6.4.	Potencial Z de las nanocápsulas LBL NE(κ -CAR/QUI) _x	41
6.5.	Morfología.....	43
6.5.1.	TEM.....	43
6.5.2.	SEM.....	46
6.5.3.	AFM.....	48
6.6.	Caracterización Química.....	50
6.6.1.	EDS.....	50
6.6.2.	FTIR.....	52
6.6.2.1.	NE.....	52
6.6.2.2.	Nanocápsulas poliméricas.....	53
6.6.2.3.	Nanocápsulas poliméricas cargadas con bioactivo.....	57
6.7.	Liberación.....	57
6.7.1.	Eficiencia de Encapsulación.....	57
6.7.2.	Eficiencia de Liberación.....	58
6.7.3.	Mecanismo de Liberación.....	62
7.	CONCLUSIONES.....	65
8.	TRABAJO FUTURO.....	67
9.	REFERENCIAS.....	68
10.	PRODUCTOS.....	76
11.	APÉNDICES.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representación de algunos sistemas particulados para transporte y liberación de fármacos (Ramos-Cabrer y Campos, 2013).	3
Figure 2.	Estructura del surfactante Cloruro de dodeciltrimetilamonio (DTAC).	5
Figura 3.	Unidad de repetición de disacáridos de: (a) λ -carragenina (R= H o SO_3^-) y (b) β -(R1=R2=H), ι -(R1=R2= SO_3^-) y κ -(R1=H; R2= SO_3^-) carragenina (Rosas-Durazo <i>et al.</i> 2011).	7
Figura 4.	Estructura de quitosana, n: unidad desacetilada y m: unidad acetilada (Rodrigues <i>et al.</i> , 2012).	8
Figura 5.	Deposición alterna de polielectrolitos con carga opuesta sobre un sistema de nanoemulsión (Bazylińska <i>et al.</i> , 2011).	12
Figura 6.	Estructura del diflunisal (Bottari <i>et al.</i> , 2014).	13
Figura 7.	Síntesis de nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI) _x por la técnica de autoensamblaje layer-by-layer.	21
Figura 8.	Espectro FTIR de κ -carragenina.	29
Figura 9.	Espectro FTIR de quitosana.	30
Figura 10.	Tamaño (barras) e índice de polidispersión (PdI; línea) de la nanoemulsión a distintas diluciones.	31
Figura 11.	Efecto de la dilución de la NE sobre la carga superficial (Potencial Z).	32
Figura 12.	Tamaño (barras) e índice de polidispersión (PdI; línea) de nanocápsulas de κ -CAR a partir de diferentes diluciones de NE.	33

Figura 13.	Carga superficial (Potencial-Z) de nanocápsulas de κ -CAR a partir de diferentes diluciones de NE.	35
Figura 14.	Registro del tamaño e índice de polidispersión durante el proceso de elaboración de una nanocápsula de 4 capas poliméricas y los respectivos lavados entre capas. 0, 1, 2, 3, 4: Número de capas poliméricas. L: Sistema lavado.	36
Figura 15.	Registro del Potencial Z (mV) y pH durante el proceso de elaboración de una nanocápsula de 4 capas poliméricas y los respectivos lavados entre capas. 0, 1, 2, 3, 4: Número de capas poliméricas. L: Sistema lavado.	37
Figura 16.	Tamaño (barras) e índice de polidispersión (PdI; línea) del sistema de NE(κ -CAR/QUI) ₁ a diferente pH.	39
Figura 17.	Diámetro hidrodinámico promedio (columnas) e índice de polidispersión (PdI; línea) de nanocápsulas NE(CAR/QUI) _x determinados por DLS como función del número de capas depositadas. Desviación estándar indicada ($n = 3$).	41
Figura 18.	Potencial- ζ de nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI) _x como función del número de capas depositadas. Desviación estándar indicada ($n=3$).	43
Figura 19.	Imágenes TEM e histogramas de tamaños de a) NE, b) NE- κ -CAR, c) NE(κ -CAR/QUI) ₁ , d) NE(κ -CAR/QUI) ₁ κ -CAR y e) NE(κ -CAR/QUI) ₂ .	45
Figura 20.	Diámetro promedio (columnas) e índice de polidispersión (PdI; línea) de nanocápsulas NE(CAR/QUI) _x determinados por TEM como función del número de capas depositadas. Desviación estándar indicada ($n = 3$).	46
Figura 21.	Imágenes SEM de a) NE, b) NE- κ -CAR, c) NE(κ -CAR/QUI) ₁ ,	47

	d) NE(κ -CAR/QUI) ₁ κ -CAR y e) NE(κ -CAR/QUI) ₂ .	
Figura 22.	Imágenes AFM de a) NE, b) NE- κ -CAR, c) NE(κ -CAR/QUI) ₁ , d) NE(κ -CAR/QUI) ₁ κ -CAR y e) NE(κ -CAR/QUI) ₂	49
Figura 23.	Espectros XEDS de a) NE, b) NE- κ -CAR, c) NE(κ -CAR/QUI) ₁ , d) NE(κ -CAR/QUI) ₁ κ -CAR y e) NE(κ -CAR/QUI) ₂ .	51
Figura 24.	Espectro FTIR comparativo entre el aceite de oliva, el surfactante DTAC y la Nanoemulsión (NE).	53
Figura 25.	Espectro FTIR comparativo entre a) NE, b) κ -CAR, c) QUI, d) NE- κ -CAR y e) NE(κ -CAR/QUI) ₂ .	56
Figura 26.	Espectro FTIR comparativo entre el DF, la NE y la nanoemulsión cargada con diflunisal (NE-DF).	58
Figura 27.	Perfiles de liberación de DF a pH 7.4 y 37°C a través de los diferentes sistemas de nanoemulsión (NE) y nanocápsulas con una (NE- κ -CAR), dos [NE(κ -CAR/QUI) ₁], tres [NE(κ -CAR/QUI) ₁ - κ -CAR] y cuatro [NE(κ -CAR/QUI) ₂] capas de PE, expresado como fracción liberada (M_t) con relación a la cantidad total liberada (M_∞). Desviación estándar indicada ($n = 3$).	59
Figura 28.	Perfiles de liberación de DF a pH 7.4 y 37°C a través de los diferentes sistemas de nanoemulsión (NE) y nanocápsulas con una (NE- κ -CAR), dos [NE(κ -CAR/QUI) ₁], tres [NE(κ -CAR/QUI) ₁ - κ -CAR] y cuatro [NE(κ -CAR/QUI) ₂] capas de PE, expresado como porcentaje liberado (%) con relación a la cantidad total encapsulada. Desviación estándar indicada ($n = 3$).	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Eficiencia de liberación del DF a través de los sistemas de nanoemulsión y de nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI) _x .	62
Tabla 2.	Parámetros cinéticos para los sistemas de nanoemulsión y de nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI) _x a pH 7.4 y 37°C.	63

NOTACIÓN

\sim	Aproximadamente
$^{\circ}$	Grados
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
%	Porcentaje
Λ	Longitud de onda
Δ	Desplazamiento químico
Cm	Centímetro
G	Gravedades
H	Horas
Hz	Hertz
k_0	Constante de liberación de orden cero
k_1	Constante de liberación de primer orden
kDa	Kilodaltons
k_H	Constante de Higuchi
k_{KP}	Constante de Korsmeyer-Peppas
kV	Kilovolts
N	Newtons
Nm	Nanómetros
M Ω	Miliohmios

mA	Miliamperios
Mg	Miligramos
MHz	Megahertz
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPa	Megapascal
M_t/M_∞	Fracción de fármaco liberado
mV	Milivolts
N	Exponente de difusión
S	segundos
T	Tiempo
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
μs	Microsegundos

ABREVIATURAS

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica (por sus siglas en inglés)
β -car	Beta-carragenina
D ₂ O	Agua deuterada
DCI	Cloruro de deuterio
DF	Diflunisal
DLS	Dispersión Dinámica de Luz (por sus siglas en inglés)
DTAC	Cloruro de dodeciltrimetilamonio (por sus siglas en inglés)
EE%	Eficiencia de encapsulación
FTIR	Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (por sus siglas en inglés)
HF	Ácido fluorhídrico (por sus siglas en inglés)
¹ H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protón (por sus siglas en inglés)
ι -car	Iota-carragenina
κ -car	κ -Carragenina
KBr	Bromuro de potasio
λ -car	λ -carragenina
LBL	Layer-by-layer
MWCO	Peso molecular límite (por sus siglas en inglés)
NC's	Nanocápsulas coloidales
NE	Nanoemulsión

NSAIA	Agente antiinflamatorio no esteroideo (por sus siglas en inglés)
O/W	Aceite en agua (por sus siglas en inglés)
PAH	Clorhidrato de polialilamina (por sus siglas en inglés)
PE	Polielectrolito
Potencial- ζ	Potencial-Z
Ppm	Partes por millón
PSS	Poliestireno sulfonado (por sus siglas en inglés)
QUI	Quitosa
Rpm	Revoluciones por minuto
S _D	Grado de relajación (por sus siglas en inglés)
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (por sus siglas en inglés)
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión (por sus siglas en inglés)
THF	Tetrahidrofurano (por sus siglas en inglés)
W/O	Agua en aceite (por sus siglas en inglés)
XEDS	Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X (por sus siglas en inglés)

RESUMEN

La ingeniería de nanovehículos multifuncionales, acarreadores de fármacos, que combinen estabilidad y buenas propiedades de liberación, sigue siendo un gran desafío. En este estudio, los polímeros naturales κ -carragenina (κ -CAR) y quitosana (QUI), se depositaron en gotas de nanoemulsión de aceite de oliva (NE) por medio de la técnica de autoensamblaje layer-by-layer (LBL) para estudiar los mecanismos de liberación del antiinflamatorio Diflunisal (DF) como modelo de fármaco lipofílico. El tamaño de los nanosistemas se obtuvo mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS; por sus siglas en inglés Dynamic Light Scattering), el proceso de autoensamblaje electrostático de los polielectrolitos fue monitoreado por medio de mediciones de la carga superficial (potencial-Z), la presencia de elementos característicos y grupos funcionales de los polielectrolitos fueron determinados por Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X (XEDS; por sus siglas en inglés Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) y Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR; por sus siglas en inglés Fourier Transform Infrared Spectroscopy). La morfología de las nanocápsulas se observó mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM; por sus siglas en inglés Transmission Electron Microscopy), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM; por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM; por sus siglas en inglés Atomic Force Microscopy). Además, se desarrollaron estudios cinéticos de liberación de DF mediante la técnica de difusión en bolsa de diálisis. Así mismo, se aplicaron modelos matemáticos para investigar los mecanismos de liberación. El análisis de tamaño dio como resultado un tamaño promedio de 291 nm para el sistema de emulsión, que presentó un aumento de aproximadamente 20 nm después de la adsorción de cuatro capas poliméricas. Por otro lado, se evidenció mediante la caracterización de la carga superficial de los sistemas, la adsorción consecutiva de los polielectrolitos, cambiando la carga superficial de negativo a positivo después de cada capa depositada. Además, los valores de carga en cada etapa mostraron la estabilidad de los sistemas, ya que permanecieron inferiores a -30 mV y mayores de +30 mV. La presencia de elementos característicos y grupos funcionales de los polímeros κ -CAR y QUI en las nanocápsulas fue confirmada por XEDS y FTIR. De manera interesante, el mecanismo de liberación de DF

varió según la cantidad de capas depositadas. Los nanosistemas que contienen hasta dos capas muestran un transporte anómalo y una cinética de primer orden. Las formulaciones con tres y cuatro capas exhiben transporte tipo Caso II, liberando diflunisal mediante cinética de orden cero. Los resultados obtenidos, sugieren que estas nanocápsulas polielectrolíticas, tienen un gran potencial como nanovehículo multifuncional, para aplicaciones de administración de fármacos.

ABSTRACT

Engineering of multifunctional drug nanocarriers combining stability and good release properties remains a great challenge. In this work, natural polymers κ -carrageenan (κ -CAR) and chitosan (QUI) were deposited onto olive oil nanoemulsion droplets (NE) via layer-by-layer (LBL) self-assembly to study the release mechanisms of the anti-inflammatory diflunisal (DF) as lipophilic drug model. The size of the nano-systems was obtained by Dynamic Light Scattering (DLS). The electrostatic self-assembly process of the polyelectrolytes was monitored by Zeta Potential (ζ -potential) measurements. The presence of characteristic elements and functional groups of the polyelectrolytes were determined by X-ray Energy Dispersive Spectroscopy (XEDS) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The morphology of the nanocapsules was observed by Transmission Electron Microscopy (TEM), Scanning Electron Microscopy (SEM), and Atomic Force Microscopy (AFM). In addition, kinetic release studies of DF were developed by the dialysis diffusion bag technique. Mathematical models were applied to investigate the release mechanisms. The size analysis resulted in an average size of 291 nm for the NE system, which showed an increase of approximately 20 nm after the adsorption of four polymer layers. On another hand, the characterization of the surface charge of the systems evidenced the consecutive adsorption of polyelectrolytes by charge reversal after each deposited layer. Moreover, the surface charge values in each stage showed the stability of the systems, since they remained below -30 mV and greater than +30 mV. The presence of characteristic elements and functional groups of the κ -CAR and QUI polymers in the nanocapsules was confirmed by XEDS and FTIR. More interestingly, the drug release mechanism varies depending on the number of layers deposited. The nanosized systems containing up to two layers show anomalous transport and first order kinetics. Formulations with three and four layers exhibit Case II transport releasing diflunisal with zero order kinetics. The results suggest that these polyelectrolyte nanocapsules have great potential as multifunctional nanocarrier for drug delivery applications.

1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años, se ha incrementado el interés en el campo de la liberación de compuestos bioactivos. El resultado es el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada que provee de liberación continua de compuestos funcionales. En este sentido, se ha encontrado un potencial prometedor en sistemas basados en Nanocápsulas Coloidales (NC's) compuestas por un núcleo oleoso, un compuesto tensoactivo y una capa hidrófila de un biopolímero, como una plataforma de administración eficaz para la administración de fármacos (Calvo *et al.*, 1997). Los biopolímeros han recibido especial atención en el campo de los alimentos y administración de activos como materiales prometedores en la preparación de nanopartículas portadoras o como recubrimiento de polielectrolito para partículas y superficies (Chopra *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2013). Ya que los polielectrolitos son polímeros que pueden formar complejos con moléculas con carga opuesta por interacción electrostática intermolecular (Ye *et al.*, 2005), las nanopartículas poliméricas multicapa tienen aplicaciones en una amplia gama de áreas, incluyendo farmacéutica, biomédica, envasado de alimentos y cosmética. Algunos polisacáridos naturales, como carragenina y quitosana han sido ampliamente estudiados para aplicaciones de liberación de medicamentos (Mora-Huertas *et al.*, 2010) y soportes para ingeniería de tejidos (Carneiro *et al.*, 2013), presentando mejor biocompatibilidad y biodegradabilidad en contraste con los materiales poliméricos sintéticos usados normalmente (Madrigal-Carballo *et al.*, 2010). En este trabajo se propone la síntesis LBL de nanocápsulas polielectrolíticas de κ -carragenina y quitosana como polianión y policación, respectivamente. Basado en el supuesto que los grupos sulfatos de la carragenina se asocian con los grupos amino protonados de quitosana mediante interacciones electrostáticas, resultado en la formación de un complejo polielectrolítico mediante la técnica de autoensamblaje LBL.

2. ANTECEDENTES

2.1. Sistemas de liberación de activos

La microencapsulación, es una herramienta tecnológica de gran importancia en áreas como la farmacéutica, industria de los alimentos, medicina y cosmética. Esto es particularmente importante para los conceptos de liberación de fármacos, los cuales tienen que ser dispersados a nivel micro o submicro, entregados a la parte dañada del cuerpo y liberado de una manera controlada (Shchukina y Shchukin, 2012).

Los liposomas (vesículas bicapa esféricas) son un modelo de encapsulación de bioactivos y en los últimos años, han atraído atención considerable en biomedicina, alimentación y agricultura, debido a su capacidad para incorporar tanto moléculas hidrosolubles como liposolubles. Sin embargo, a pesar de que para su elaboración se pueden utilizar fosfolípidos de fuentes naturales, implica una gran concentración de estos, además de su tendencia a la formación de agregados supramoleculares, tales como hojas de bicapa o fases lamelares (Madrigal-Carballo *et al.*, 2010).

Otro sistema de liberación son las nanopartículas lipídicas. Su tamaño varía típicamente de 50 nm a 1 μm . La matriz consiste en un lípido sólido o una mezcla de lípidos. Para estabilizar las partículas lipídicas sólidas frente a la agregación, se añaden agentes tensoactivos o polímeros. Los ingredientes activos se disuelven o se dispersan finamente en la matriz lipídica. En este tipo de sistemas las sustancias activas que se pueden incorporar más comúnmente son lipofílicas, tales como las vitaminas A, E o filtros ultravioletas, etc. Sin embargo, la mayor limitación es que no se pueden incorporar ingredientes hidrofílicos y por consiguiente presentan una solubilidad pobre en condiciones fisiológicas (Schnittger y Sinha, 2007).

Otros sistemas de liberación que también han sido utilizados son las nanopartículas sólidas, micelas, dendrímeros y nanocápsulas, entre otros (Figura 1; Preetz *et al.*, 2008).

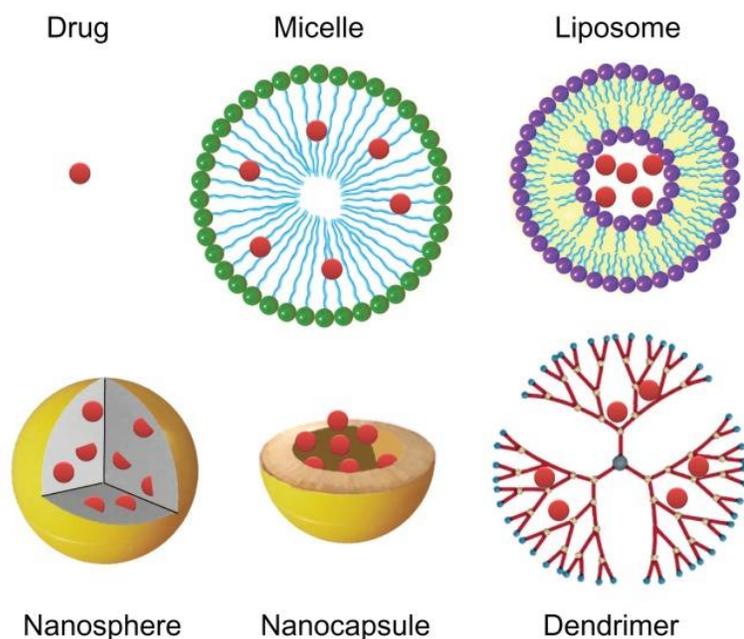


Figura 1. Representación de algunos sistemas particulados para transporte y liberación de fármacos (Ramos-Cabrer y Campos, 2013).

2.1.1. Emulsiones

El uso de las emulsiones es enorme. Se conocen hace cientos de años y se emplean hoy en día en la industria de alimentos, pinturas, fertilizantes, medicina, la industria química y muchas otras áreas de actividad de la humanidad. La principal característica de la emulsión es la posibilidad de dispersar líquidos inmiscibles y, al mismo tiempo, disolver reactivos no miscibles en cada líquido permitiendo su interacción en la interfase líquido-líquido (Shchukina y Shchukin, 2012). Las microemulsiones son macroscópicamente homogéneas donde los principales componentes son lípidos (o compuestos lipofílicos) y agua (o compuestos hidrofílicos). Estas dos fases inmiscibles se combinan con un emulsionante anfifílico para formar una mezcla metaestable. Las microemulsiones pueden ser de tipo agua-en-aceite (W/O) o aceite-en-agua (O/W). Los emulsionantes disminuyen la tensión interfacial entre las dos fases inmiscibles que se utilizan y el proceso de

coalescencia que tiende a separar las dos fases se ralentiza por la acción de los tensoactivos (Buchmann, 2001). Recientemente, ha habido una amplia investigación en el área de sistemas de entrega controlada. Polímeros y surfactantes novedosos pueden ayudar en este objetivo, usando técnicas de encapsulación para controlar el suministro de agentes encapsulados, así como proteger a los agentes de la degradación del medio ambiente (Schnittger y Sinha, 2007).

El nivel actual de desarrollo en la industria de alimentos y medicinas requiere no sólo la fabricación de los sistemas de emulsión, sino también su funcionalización con el fin de impartirle propiedades multifuncionales (Shchukina and Shchukin, 2012). Ya que una de las principales limitaciones de las emulsiones es que tienen una tendencia a perder componentes encapsulados con el tiempo y presentar diversos mecanismos de degradación como coalescencia (Taylor *et al.*, 2005). Una alternativa para evitar la degradación temprana implica la formación de una membrana polimérica alrededor con el fin de minimizar estos efectos (Iwanaga *et al.*, 1999).

2.1.1.1.Surfactantes

Los surfactantes son moléculas formadas al mismo tiempo por un grupo polar y por una cadena hidrofóbica; cuando estas moléculas se agregan a un sistema líquido con agua y aceite, los grupos polares del surfactante son atraídos, es decir, orientados hacia el agua y los grupos no polares hacia el aceite. Los surfactantes pueden clasificarse como catiónicos, aniónicos, no iónicos, y zwitteriónicos, en base a la carga eléctrica de la cabeza polar.

Cloruro de dodeciltrimetilamonio (DTAC) es un tensioactivo catiónico que contiene una sal de amonio cuaternario (Figura 2). Su concentración micelar crítica (cmc) se ha estimado en 21.3 mM en agua a 25°C (Mehta *et al.*, 2005). Sin embargo, es bien sabido que, en presencia de un polielectrolito de carga opuesta, la formación de micelas está dada por la concentración de agregación crítica, que es por lo general, inferior en uno o dos órdenes de magnitud a la cmc del surfactante (Kwak 1998).

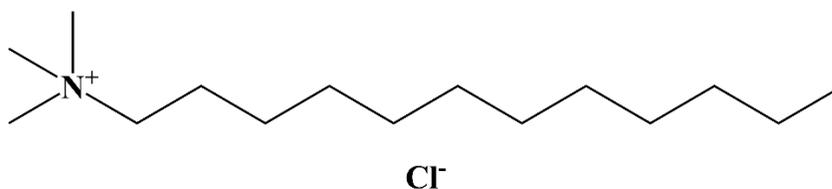


Figura 2. Estructura del surfactante Cloruro de dodeciltrimetilamonio (DTAC).

2.1.2. Soporte de emulsión para el desarrollo de nanocápsulas poliméricas

El mecanismo fisicoquímico mediante el cual se forman estos sistemas es por emulsificación espontánea o desplazamiento del disolvente, por el cual, una nucleación homogénea líquido-líquido se produce inicialmente cuando acetona y etanol son mezclados en la fase orgánica, para posteriormente migrar a la fase acuosa, produciendo una nanoemulsión o/w estabilizada finalmente por el agente tensioactivo (por ejemplo, lecitina) adsorbido en la interfaz o/w. Ya sea durante su formación o en una etapa posterior de incubación, un polímero soluble en agua que lleva una carga eléctrica opuesta a la del agente tensioactivo puede ser incorporado como escudo por interacción iónica, produciendo una estructura de nanocápsulas coloidales estables núcleo-coraza (López-Montilla *et al.*, 2002).

2.2. Polielectrolitos

Un polielectrolito (PE) es un polímero que se disocia en especies cargadas en solución. Normalmente el término polielectrolito es empleado para sistemas de polímeros que consisten en macroiones; es decir, macromoléculas que portan grupos iónicos unidos covalentemente a su estructura, los cuales a su vez deben ser compensados por contraiones de cargas contrarias para garantizar la electroneutralidad del sistema (Dobrynina y Rubinstein, 2005). Dependiendo de la carga, los polielectrolitos pueden ser catiónicos, los

cuáles portan grupos con cargas positivas (por ejemplo $-\text{NH}_3^+$, $-\text{NR}_3^+$) o aniónicos, portadores de cargas negativas ($-\text{SO}_3^-$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, etc.).

2.2.1. κ -Carragenina

La carragenina es un polisacárido lineal soluble en agua y extraído de varias especies de *Rhodophyta* (algas marinas rojas). Su estructura se basa en una secuencia repetitiva de un disacárido de residuos β -D-galactopiranososa (Figura 3. Residuos A) y residuos α -galactopiranososa (Figura 3. Residuos B) (Piculell, 2006). Las unidades están unidas por enlaces glucosídicos alternados de α 1-3 y β 1-4 (Mehrban *et al.*, 2010). Dicha estructura incluye grupos sulfatos éster en las unidades de galactosa, los cuales están cargados negativamente y se repelan unos con otros. Con dicha configuración se logra una estructura extendida y flexible.

Dependiendo del número y posición del grupo sulfato, los isómeros serán Beta (β), Kappa (κ), Iota (ι) y Lambda (λ) (Figura 3). El tipo más altamente sulfatado es λ -carragenina, que no puede formar una estructura de hélice ordenada, y, por lo tanto, no gelifica. Las unidades de disacáridos que pueden formar una estructura tipo hélice son β , ι y κ , los cuales contienen la forma 3,6-anhidro del residuo B y que sólo difieren en el número de sustituyentes sulfatados. Carrageninas gelificantes generalmente contienen una gran proporción de una o más de estas unidades. Las fracciones casi puras de ι y κ pueden ser obtenidos de las algas *Denticulatum Eucheuma* y *Kappaphycus alvarezii*, respectivamente. Mientras que las unidades β , no se ha podido obtener fracciones puras y se encuentran típicamente asociados a unidades κ . En particular, κ -carragenina solo cuenta con un grupo negativo por disacárido y tiene la capacidad de formar geles firmes (Piculell, 2006).

La carragenina es extensamente utilizada en la industria alimenticia como gelificante y agente estabilizante y en la microencapsulación de medicamentos y enzimas. Las cargas negativas (grupos sulfatos éster) contribuyen a la formación de superficies antitrombogénicas. Además, tienen gran influencia en las propiedades de relajación del material, una de las cosas más importantes a considerar en aplicaciones biomédicas. Debido a esto, es interesante utilizarla en complejos polielectrolitos con otros polímeros que

presenten propiedad de relajación baja, con el objetivo de tener una menor degradación del material por efecto de la relajación de la red polimérica (Carneiro *et al.*, 2013).

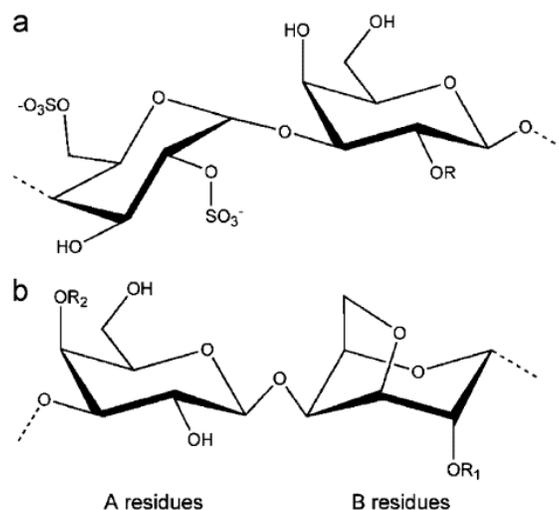


Figura 3. Unidad de repetición de disacáridos de: (a) λ -carragenina ($R= H$ o SO_3^-) y (b) β - ($R_1=R_2=H$), ι - ($R_1=R_2=SO_3^-$) y κ - ($R_1=H$; $R_2=SO_3^-$) carragenina (Rosas-Durazo *et al.* 2011).

2.2.2. Quitosana

Polisacárido lineal catiónico obtenido mediante desacetilación de la quitina; principal componente del exoesqueleto de crustáceos. La estructura de quitosana (Figura 4) está compuesta por unidades distribuidas al azar de D-glucosamina (unidad desacetilada; n) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada; m) unidas por el enlace glucosídico β 1-4 (Kumirska *et al.*, 2010). Quitosana es abundante en la naturaleza, es un excelente material para el desarrollo de filmes, esferas y fibras. Es insoluble en agua, pero se convierte en soluble cuando se disuelve en soluciones ácidas. Tiene afinidad con biopolímeros con propiedades aniónicos en agua. Es un excelente componente de filmes comestibles debido a sus propiedades como barrera al oxígeno y presencia de actividad antimicrobiana y antioxidante (Xia *et al.*, 2011). Además, al ser biodegradable, biocompatible y no presentar toxicidad, convierten a quitosana como un elemento apropiado en productos farmacéuticos

y alimenticios (Dutta *et al.*, 2009). Una limitante de quitosana es que la superficie de este compuesto le confiere efectos trombogénicos en contacto con la sangre. Su carga positiva facilita la absorción de proteínas del plasma como albúmina y fibrinógeno a pH fisiológico. La incorporación de cargas negativas, puede ser una manera efectiva de disminuir dichas propiedades y como resultado obtener un complejo polielectrolito de diferentes cargas con superficie antitrombogénica (Carneiro *et al.*, 2013). Además, como polímeros individuales, quitosana y κ -carragenina no tienen un buen grado de relajación ($S_D = 0.5$ y 5 respectivamente).

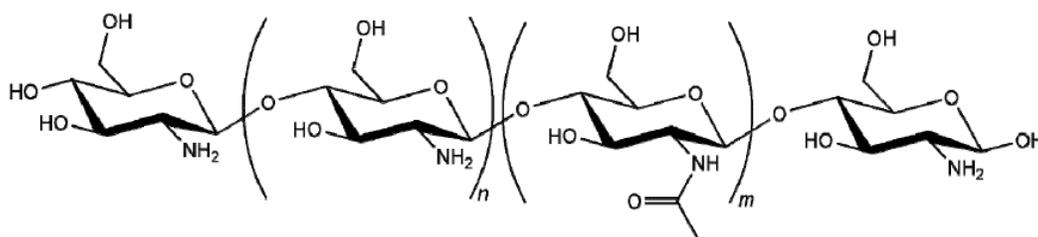


Figura 4. Estructura de quitosana, n: unidad desacetilada y m: unidad acetilada (Rodrigues *et al.*, 2012).

2.2.3. Complejo κ -CAR/QUI

2.3. Desarrollo de nanoestructuras multicapa mediante la técnica layer-by-layer (LBL)

El ensamblaje LBL se basa en la deposición alternada de polielectrolitos de carga opuesta sobre soportes cargados y pueden ser usados para producir multicapas de grosor deseado a escala nanométrica (Shchukina and Shchukin, 2012). El crecimiento de las capas está basado principalmente en fuerzas electrostáticas y se caracterizan por un microambiente hidrófilo con un alto contenido de agua y densidad de carga. Generalmente, están formadas por la interpenetración de las cadenas de polielectrolitos y no por una estructura estrictamente estratificada.

Esta técnica permite la absorción de varios componentes (polielectrolitos, nanopartículas, proteínas, enzimas, etc.) y se ha aplicado al campo de la liberación de activos ya sea en forma de filmes multicapa (Lima *et al.*, 2013) o para la construcción de partículas núcleo-coraza (Madrigal-Carballo *et al.*, 2010). Algunos investigadores han optado por la utilización de polímeros naturales en la técnica LBL (Ye *et al.*, 2005), representando una alternativa atractiva para aplicaciones biomédicas debido a su favorable biocompatibilidad y biodegradabilidad.

2.3.1. Sustratos planos

El enfoque layer-by-layer es un método altamente versátil para la fabricación de filmes multicapa. En este sentido se han estudiado gran variedad de pares de polielectrolito, así como superficies de soporte. Los primeros estudios fueron reportados por Iler (1966) quien depositó capas alternas de sílica cargada positivamente y alúmina cargada negativamente sobre una superficie plana. Sin embargo, el estudio extensivo en el área se dio veinticinco años después cuando Decher *et al.* (1991) adaptó este método recubriendo filmes orgánicos de carga opuesta con multicapas de compuestos anfifílicos cargados y polielectrolitos.

Un aspecto importante en la elaboración de estructuras construidas a través de la tecnología de capa por capa es su tamaño. Los filmes multicapa pueden ser utilizados como mascarillas o parches sobre piel y órganos para la liberación controlada de ciertos activos (Carneiro *et al.*, 2013), no obstante, su tamaño micrométrico les impide llegar a otras estructuras biológicas. De igual manera, muchas veces los soportes utilizados para la síntesis de partículas núcleo-coraza se encuentran también en el rango de las micras (Wang *et al.*, 2009), lo cual los restringe en el campo de la liberación de activos.

2.3.2. Sustratos coloidales

El procedimiento que comúnmente describe la adsorción de multicapas sobre soportes coloidales utilizando la tecnología layer-by-layer, involucra el poner en contacto

una solución diluída de polielectrolito con las partículas núcleo hasta que la adsorción del PE es completa. La suspensión resultante es luego centrifugada y las partículas redispersadas en agua, la centrifugación y redispersión se repiten las veces necesarias para asegurar la completa remoción de fracciones de PE no adsorbidos. El proceso completo se repite para la adición de cada capa de PE. A pesar de ser un método relativamente fácil, se consume tiempo durante cada ciclo de centrifugación/redispersión, ocasionando además la inevitable pérdida parcial de partículas.

Algunos autores han propuesto algunas variables dentro de la técnica tradicional LBL. Sukhorukov *et al.* (1998) comparó el método tradicional con la llamada “adsorción secuencial” que consiste en agregar consecutivamente los polímeros de recubrimiento a la suspensión de partículas en cantidades que correspondían con exactitud al recubrimiento de la cápsula (determinado previamente por la técnica de potencial-Z). Este último, en un procedimiento rápido de realizar en comparación con la metodología tradicional. Sin embargo, se necesita una determinación precisa de las cantidades de los polímeros añadidos al sistema en cada paso, lo cual requiere de igual manera una cantidad considerable de tiempo. Además, el estudio dio como resultado un mayor número de agregados de partículas (floculados) a través de la adsorción secuencial de los polielectrolitos, mientras que la técnica de centrifugación arrojó partículas no agregadas recubiertas de múltiples capas de buena calidad.

2.3.2.1. Cápsulas huecas

Las microcápsulas huecas son preparadas por la adsorción progresiva de PE sobre partículas coloidales cargadas, seguido por la eliminación de éstas últimas normalmente por disolución en ácido. Esta metodología permite el control sobre el tamaño de la cápsula (controlando el tamaño del núcleo coloidal), el espesor de la coraza de la cápsula (controlando el número de capas de polímero) y la composición de la coraza (Elizarova *et al.*, 2016).

Investigaciones anteriores han reportado la formación de microcápsulas huecas mediante la técnica LBL, donde se utilizaron polímeros sintéticos como el poliestireno

sulfonado (PSS; por sus siglas en inglés polystyrenesulfonate) y clorhidrato de polialilamina (PAH; por sus siglas en inglés polyallylamine hydrochloride) sobre núcleos coloidales de alrededor de 600 nm para su elaboración (Donath *et al.*, 1997; Sukhorukov *et al.*, 1998). Sin embargo, la baja biocompatibilidad de estas microcápsulas poliméricas sintéticas es la principal barrera para sus aplicaciones en el campo biomédico.

En los últimos años, se han reportado la síntesis de nanocápsulas poliméricas huecas, que además de utilizar polímeros naturales y biocompatibles como quitosana y carragenina, se logra su obtención a escala nanométrica (Liu *et al.*, 2012). Al utilizar como núcleo partículas coloidales de sílica o poliestireno (~100 nm), se logra la obtención de cápsulas menor tamaño y polidispersión (100-300 nm; Liu *et al.*, 2012). A pesar de que éstos materiales de soporte son fácilmente disueltos en ácidos como tetrahidrofurano (THF; por sus siglas en inglés tetrahydrofuran) y ácido fluorhídrico (HF; por sus siglas en inglés hydrofluoric acid), la sílica o el poliestireno necesitarían aún difundirse a través de las capas de polielectrolito provocando que la disolución completa del núcleo y el mantenimiento íntegro de las capas de polímero sea incierto (Elizarova and Luckham 2016).

A pesar de todos estos logros, las nanocápsulas huecas, se circunscriben solamente a encapsular compuestos hidrofílicos. Además, presentan la desventaja que, durante su elaboración, se tienen que utilizar ácidos para disolver los núcleos o soportes y con ello se puede presentar colapso en la coraza polimérica, por lo que muchas veces se tiene que recurrir a etapas adicionales de entrecruzamiento del polímero para aumentar la fuerza mecánica (Liu *et al.*, 2012).

2.3.2.2. Emulsiones multicapa

Algunos autores han propuesto el uso de micelas (Szczepanowicz *et al.*, 2015) o liposomas (Madrigal-Carballo *et al.*, 2010) como soporte para la formación de nanocápsulas multicapa, con el fin de poder encapsular, tanto activos lipofílicos en el núcleo oleoso, como sustancias hidrofílicas en la coraza polimérica. Además, a través de este tipo de sistemas, se asegura la integridad de los polímeros en las cápsulas, ya que se

omite la etapa tediosa de eliminación de soportes como en el caso de las nanocápsulas multicapa huecas.

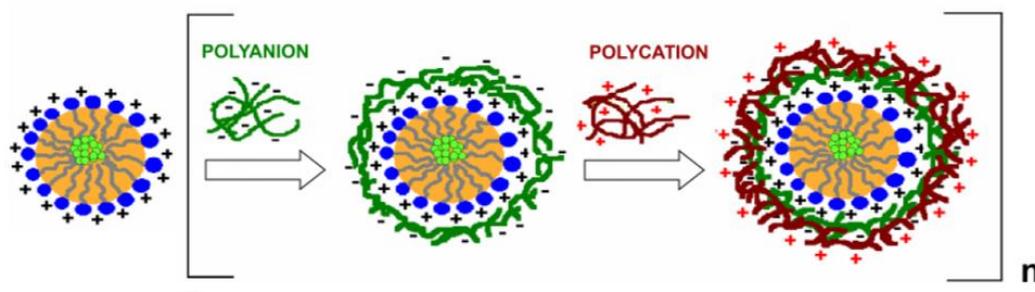


Figura 5. Deposición alternada de polielectrolitos con carga opuesta sobre un sistema de nanoemulsión (Bazylińska *et al.*, 2011).

2.4. Activos Lipofílicos

2.4.1. Diflunisal (DF)

El diflunisal es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAIA; por sus siglas en inglés non-steroidal antiinflammatory agents), utilizado normalmente para disminuir el dolor acompañado por inflamación y como tratamiento sintomático de artritis reumatoide y osteoartritis, sin embargo, su mecanismo de acción no ha sido claramente establecido (Bottari *et al.*, 2014).

La estructura del DF (ácido 5-(2,4-difluorofenil)-2-hidroxibenzoico) consiste en un grupo difluorobenceno ligado a un grupo ácido salicílico (Brittain *et al.*, 2005; Figura 6) y debido a la presencia de este último, la molécula de DF (Figura 6) presenta fluorescencia tanto en solución como en polvo. Debido a su estructura el DF es ligeramente soluble en agua a temperatura ambiente y muestra baja solubilidad en agua a pH ácido y, por lo tanto, baja biodisponibilidad después de su administración oral. Los efectos secundarios más

comunes involucran al sistema gastrointestinal, pudiéndose presentar ulceraciones y dolor de estómago. Esos problemas podrían resolverse con el uso de formulaciones gastrorresistentes y probablemente también con la interacción con polímeros naturales como quitosana se podría mejorar su solubilidad y biodisponibilidad (Lucio *et al.*, 2014).

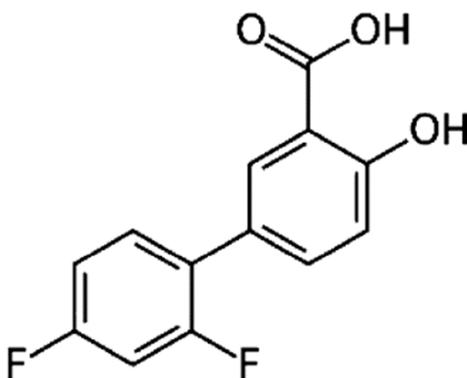


Figura 6. Estructura del diflunisal (Bottari *et al.*, 2014).

2.5.Liberación Controlada de Activos

Con el desarrollo de formas de dosificación que permiten la liberación controlada de fármacos contenidos en ellas, se han realizado avances médicos significativos en el área de liberación de activos (Dash *et al.*, 2010). El propósito de éstos sistemas de liberación controlada es el de mantener concentraciones adecuadas de los activos en la sangre o en el tejido adecuado durante el mayor tiempo posible y con esto aumentar la eficacia del fármaco, reducir la frecuencia de administración y los efectos secundarios que trae consigo, entre otros (Robinson and Lee 1987).

Los patrones de liberación de interés se pueden dividir en aquellos que sigan una velocidad de liberación lenta de orden zero o primer orden o aquellos que realicen una liberación rápida al inicio con el fin de alcanzar una concentración terapéutica efectiva del

activo, seguida de igual manera por una liberación lenta de orden zero o primer orden para mantener la dosis deseada (Dash *et al.*, 2010). En este sentido, el uso de modelos matemáticos resulta ser muy útil ya que permite la predicción de la cinética de liberación y la comprensión de los fenómenos que afectan dicha cinética; características importantes a la hora de optimizar la formulación (Cartensen 1996).

2.5.1. Modelos cinéticos de liberación

Los modelos cinéticos describen de manera general la liberación de fármacos o activos a partir de diferentes formas de dosificación. Basados en que cualquier cambio que se realice en una formulación (ya sea cambio cualitativo o cuantitativo) puede modificar el comportamiento de liberación del fármaco y por lo tanto, el rendimiento *in vivo*. El uso de los datos cinéticos que se derivan de un estudio de liberación *in vitro* resultan ser muy deseable, ya que con ello se puede predecir el rendimiento biológico *in vivo* mientras que se analizan cada una de las formulaciones de liberación controlada en estudio (Ozturk *et al.*, 1988). De esta manera, los modelos matemáticos se aplican para describir cinéticas de liberación de los tratamientos en estudio, elucidar y comprender el tipo de mecanismo de liberación, así como poder ajustar algunos de los parámetros presentes en el modelo para lograr algún comportamiento en particular en una cinética (Bechard and McMullen 1986).

Dentro de los diferentes modelos se encuentran aquellos que son de análisis dependiente, los cuáles se basan en funciones matemáticas que describen el perfil de liberación. Dentro de ellos se pueden encontrar el modelo cinético de orden cero, modelo cinético de primer orden, modelo de Higuchi, modelo de Korsmeyer-Peppas, entre otros (Arhewoh and Okhamafe 2004).

2.5.1.1. Korsmeyer-Peppas

La liberación de un soluto a partir de una matriz, cuando esta última se pone en contacto con un fluido, es básicamente la transferencia de masa de las moléculas del fármaco de la región de más alta concentración (forma de dosificación) hacia la región de más baja concentración (líquido circundante; Brophy and Deasy 1987). La ecuación de Korsmeyer-Peppas se puede expresar como:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} t^n \quad (\text{Ec. 1})$$

donde M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberado en el instante t (min), n es un exponente de difusión que indica el mecanismo de liberación, y k_{KP} es una constante característica del sistema. M_∞ es la cantidad total de fármaco liberado ($t = \infty$). Valores de n alrededor de 0.5 se encuentran relacionados con el mecanismo de liberación de tipo difusión de Fick. Valores de n en el rango de 0.5-1.0 indican transporte anómalo no Fickiano y un valor de n igual a 1.0 representa transporte de Caso II (orden cero) (Korsmeyer *et al.*, 1983; Machín *et al.*, 2013).

2.5.1.2. Higuchi

El modelo de Higuchi, a través de su ecuación, expresa la velocidad de liberación de un soluto, generalmente un fármaco, a partir de una matriz, típicamente a base de un polímero, donde la carga de dicho soluto, excede su solubilidad tanto en la matriz como en el líquido que los rodea. De esta manera, existen dos zonas dentro de la matriz; la primera es la región interna donde existen partículas no disueltas y en la segunda, la región externa, no se presentan partículas, el fármaco se encuentra totalmente disuelto pero al mismo tiempo, existe un gradiente de concentración, el cual, según la Ley de Fick, gobierna la liberación del soluto hacia el fluido donde se encuentra la matriz y de esta manera, paulatinamente el fármaco no disuelto se disuelve para finalmente liberarse de la matriz (Paul 2011).

El modelo de Higuchi puede expresarse como (Shu *et al.*, 2011):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{0.5} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberado en el instante t (min), y k_H es la constante de difusión de Higuchi.

2.5.1.3. Primer Orden

La ecuación de primer orden puede expresarse como (Costa and Lobo, 2001):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-k_1 t} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberado en el instante t (min), y k_1 es la constante de liberación de primer orden.

2.5.1.4.Orden Zero

La liberación de orden zero se caracteriza por aquellos sistemas donde la disolución del activo a partir de su forma de dosificación es constante. Se asume que el fármaco o activo encapsulado presenta una velocidad de liberación constante independientemente de la carga inicial. Dicho en otras palabras, el coeficiente de difusión no depende de la concentración del fármaco en el sistema de vehiculización (Arhewoh and Okhamafe 2004).

El mecanismo de liberación del tipo orden cero se expresa en la siguiente ecuación (Najib and Suleiman, 1985):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t \quad (\text{Ec. 4})$$

donde M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberado en el instante t (min), y k_0 es la constante de liberación de orden cero.

3. JUSTIFICACIÓN

Algunos bioactivos han sido reportados ampliamente por presentar pobre solubilidad, baja permeabilidad y poca estabilidad a pH fisiológico. Además de su rápida transformación, degradación y eliminación del cuerpo después de la administración (Madriral-Carballo *et al.*, 2010). Para superar esta limitación, el reto ahora es incorporar estas moléculas en modelos de dosificación, que estandaricen su uso para el aprovechamiento de sus propiedades activas. Se ha reportado ampliamente el uso de las microemulsiones para entrega de activos (Kakran y Antipina, 2014). Sin embargo, este sistema puede presentar pérdidas de los componentes encapsulados y coalescencia con el tiempo (Taylor *et al.*, 2005). Por lo tanto, la formación de una membrana polimérica alrededor podría minimizar dichos efectos (Iwanaga *et al.*, 1999). Los polielectrolitos son polímeros que pueden formar complejos con moléculas de carga opuesta por interacción electrostática intermolecular (Dobrynina y Rubinstein, 2005). La formación de superficies a partir de estos complejos polielectrolitos tiene el objetivo de combinar algunas de las características de cada polímero y formar un material biocompatible. En este sentido, varios investigadores han utilizado carragenina y quitosana como material de recubrimiento (Carneiro *et al.*, 2013; Chopra *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2013 y Liu *et al.*, 2012). Ambos polímeros son similares en estructura a los glicosaminoglicanos, que se encuentran en gran medida en la matriz extracelular, además de reportarse alta viabilidad celular, ya sea de manera individual o como complejo (Carneiro *et al.*, 2013). Por consiguiente, la idea de recubrimientos de biopolímeros mediante la técnica LBL (deposición alternada de polianiones y policationes) ha emergido como una nueva forma para funcionalizar superficies de partículas.

4. OBJETIVOS

4.1.Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanocápsulas biocompatibles multicapa LBL de κ -carragenina/quitosana con uso potencial en la liberación de activos.

4.2.Objetivos específicos

Sintetizar nanocápsulas poliméricas multicapa, mediante la técnica LBL a base de un núcleo de aceite de oliva estabilizado con el surfactante DTAC y la subsecuente adsorción de capas polielectrolíticas de κ -carragenina y quitosana.

Estudiar las características y propiedades físicas de las nanocápsulas en cuanto a tamaño, polidispersión y carga mediante las técnicas de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y Potencial Z. Así como determinar su morfología por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Estudiar cualitativamente la composición química de las nanocápsulas por medio de Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X (XEDS) y Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

Evaluar la eficiencia de encapsulación de los sistemas. Así como la eficiencia de liberación de diflunisal como modelo de activo.

Determinar el mecanismo de liberación de diflunisal como modelo de activo a través de las nanocápsulas coloidales LBL.

5. METODOLOGÍA

5.1. Materiales

κ -Carragenina (κ -CAR) y Quitosana (QUI) fueron proporcionados por Sigma Aldrich, Co. St. Louis, MO, USA (Lote No. SLBH9868V y SLBH5374V, respectivamente). Ambos polímeros se utilizaron sin ninguna purificación. De acuerdo con el proveedor κ -CAR contenía 11% de K, 2.4% de Ca y 0.7 % de Na. Aceite de oliva, fue suministrado por Fluka®, St. Louis, MO, USA. Cloruro de dodeciltrimetilamonio (DTAC) se obtuvo de Aldrich Chemistry, Steinheim, DE. Acetona marca VETEC, St. Louis, MO, USA. Alcohol etílico marca FagaLab Mocerito, MEX. Diflunisal (DF; 2',4'-difluoro-4-hydroxy-(1,1'-biphenyl)-3-carboxylic acid) fue proporcionado por Merck Sharp and Dohme, Madrid, ESP. Los medios de liberación fueron preparados utilizando los siguientes reactivos: HCl y Na₂HPO₄ (99%) de Sigma Aldrich y KH₂PO₄ (99%) de Panreac, Barcelona, ESP. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico de Sigma-Aldrich. Agua de calidad Milli-Q (18.2 M Ω .cm a 25 °C) se utilizó en todos los procesos.

5.2. Síntesis de nanoemulsión (NE)

Se preparó de acuerdo con el procedimiento general descrito por Rosas-Durazo *et al.*, (2011b) adaptado a un componente oleoso diferente en este sistema. Se elaboró la NE por disolución de 120 mg de DTAC en 0.5 mL de etanol, 125 μ L de aceite de oliva (conteniendo o no 25 mg·mL⁻¹ de DF) y 9.5 mL de acetona. Inmediatamente después, esta solución orgánica se vierte en 20 mL de agua en agitación (100 rpm, Cimarec Basic, Thermoscientific, Waltham, MA, USA). La mezcla se volvió inmediatamente lechosa debido a la difusión de acetona y etanol hacia la fase acuosa y la formación espontánea de los nanogotas de emulsión del aceite de oliva estabilizadas por DTAC. Posteriormente, acetona, etanol y una porción de agua se evaporan en un rotavapor a 40 °C (~8 min, 100 rpm) alcanzando un volumen final correspondiente a un tercio del original (~10 mL), produciendo una suspensión acuosa de NE.

5.3.Síntesis de nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x por la técnica de autoensamblaje layer-by-layer.

Una vez formada la nanoemulsión, se procede a la deposición alterna de los polielectrolitos comenzando con el polianión κ -carragenina (Figura 7). Alícuotas de NE (125 μ L) diluidas 1:100, se incubaron con una solución acuosa (20 μ L) de κ -CAR (0.5 mg·mL⁻¹) a 25 °C en una placa de 96 pozos (Corning CellBIND, New York, USA) sin agitación y se deja reposar durante 1 h. Después de dicho tiempo, se procede a centrifugar (14500 rpm, 1.5 h, 15 °C) y resuspender el sistema en agua limpia para eliminar restos poliméricos que no se depositaron sobre las nanogotas de emulsión. Para la deposición de poliacetato quitosano, alícuotas de las nanocápsulas de κ -carragenina (125 μ L) se incubaron con una solución de ácido acético al 2 % (20 μ L, pH 3.35) de quitosano (0.5 mg·mL⁻¹) a 25 °C en una placa de 96 pozos (Corning CellBIND, New York, USA) sin agitación y se deja reposar durante 1 h. De igual manera se procede a centrifugar y resuspender el sistema. Y así sucesivamente se sigue con la deposición alterna hasta alcanzar las capas deseadas. En las siguientes dos capas poliméricas se utilizó una concentración de 1.0 mg·mL⁻¹ de ambos polielectrolitos.

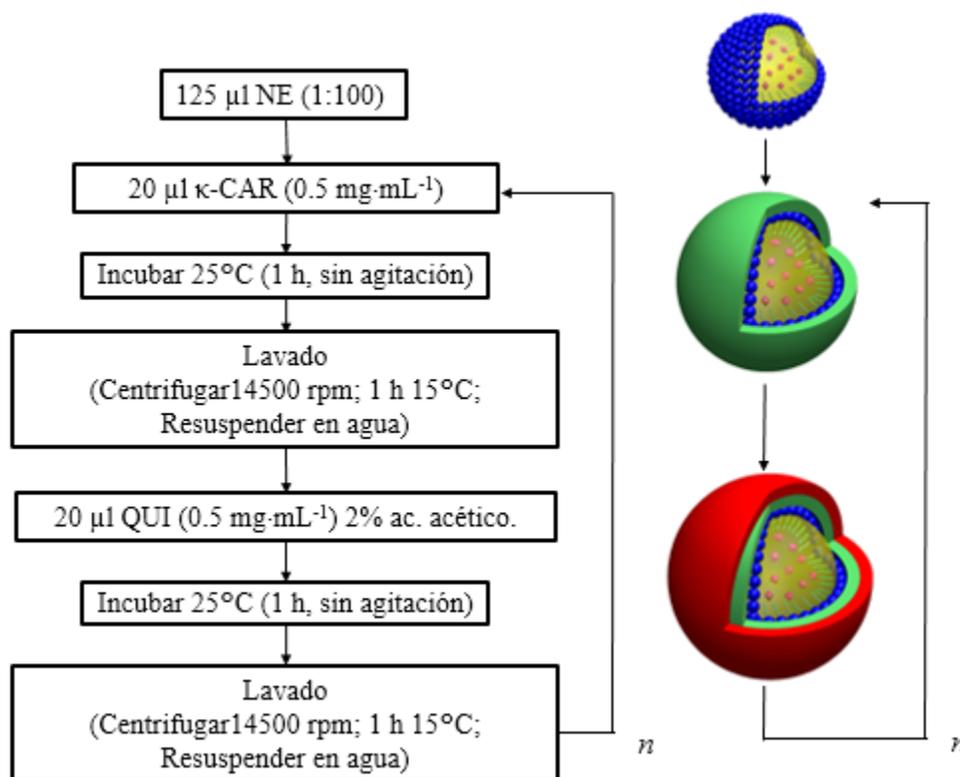


Figura 7. Síntesis de nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x por la técnica de autoensamblaje layer-by-layer.

5.4. Caracterización de la NE y de las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x.

5.4.1. Mediciones de tamaño de partícula y potencial zeta (ζ)

La distribución del tamaño de las nanocápsulas fue determinada usando un Malvern Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments Inc., Worcestershire, UK) equipado con un láser de luz roja ($\lambda = 633 \text{ nm}$), bajo el principio de Dispersión Dinámica de Luz o Dynamic Light Scattering (DLS) (Angulo de medición 173°), utilizando celdas de poliestireno (10 x 10 x 45 mm, lote DTS0012, Malvern, Inc., Worcestershire, UK). La carga superficial fue determinada mediante la medición de Potencial Zeta (ζ) en el mismo equipo, utilizando celdas capilares Zetasizer Nano Series (lote DTS1070, Malvern, Inc., Worcestershire, UK).

Ambas mediciones se llevaron a cabo a 25 °C y con muestras diluidas 1:100 debido a las propiedades ópticas opacas de las dispersiones.

5.4.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La morfología y los tamaños aproximados de los sistemas seleccionados fueron determinados por un Microscopio Electrónico de Transmisión modelo JEM 2010F con voltaje de operación de 200 kV y filamento de emisión de campo (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Para observaciones de NE- κ -CAR y NE(κ -CAR/QUI)₁ κ -CAR, 5 μ L de una solución de 0.2 % de ácido fosfotúngstico, utilizada como agente de contraste, se mezcló con 10 μ L de una dilución 1:100 de los nanosistemas en agua. Inmediatamente después, una alícuota (5 μ L) de tal preparación se inmovilizó sobre una rejilla de cobre de 350 mesh recubierta con un filme liso de carbono y se dejó secar. Para observaciones de la NE, NE(κ -CAR/QUI)₁ y NE(κ -CAR/QUI)₂, se dejaron secar totalmente 5 μ L de las soluciones muestra sobre las rejillas de cobre y posteriormente se esparció una gota de ácido fosfotúngstico sobre la rejilla durante un minuto. El exceso se retiró tocando el borde de la rejilla con papel filtro. Todas las muestras se secaron posteriormente al vacío antes de su observación. La composición de la nanoemulsión y de las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x fue identificada mediante un análisis XEDS (Quantax 200 X-ray energy dispersive spectrometer, Bruker, GmbH, Berlin, Germany).

5.4.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La obtención de imágenes SEM se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido (Pemtron SS-300LV, Pemtron, Corp., Seoul, Korea) con una resolución de 300,000x, equipado con un Backscatter (BSD) Robinson y un Bruker XEDS. El material fue recubierto por la deposición (Cressington Sputter Coater 108 auto Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) de una capa delgada de oro de ~ 3.5 nm (10 mA, 10 s).

5.4.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Imágenes AFM fueron obtenidas en modo tapping en un Microscopio de fuerza atómica (Veeco diInnova, Bruker). Se utilizó una punta de nitruro de silicio SNL-10 (Veeco, radio de la punta ~ 2 nm, contacto de resorte $k = 0.06$ N·m⁻¹). La velocidad y resolución de escaneo de 1.0 Hz y 256 muestras por línea. Para cada muestra, cinco áreas de 2 x 2 μ m fueron recorridas para el análisis superficial y visualización de los sistemas a dimensiones nanométricas. El procesamiento y el análisis de las imágenes se llevaron a cabo en el software NanoScope (Digital Instruments, versión 1.4). Las mediciones se realizaron en muestras secas (deseCADOR al vacío, 24 h) en un soporte de silicio, a temperatura ambiente sobre una mesa antivibración (TMCTM METEK[®] Berwyn, Pennsylvania, USA).

5.4.5. Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía FTIR se usó para confirmar la presencia de grupos funcionales de los polielectrolitos en las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x. Para obtener los espectros FTIR de los sistemas, se humedeció KBr (100-200 mg) con cada una de las muestras en solución. Posteriormente se secaron a 100 °C durante 5 h y se almacenaron en un desecador hasta que se realizaron las pruebas de FTIR. Las muestras ya secas y mezcladas con el KBr se molieron en un mortero de ágata y se mantuvieron en un desecador. El polvo se cargó en un troquel y se comprimió en una prensa a 10 MPa durante un minuto para obtener tabletas delgadas transparentes, la cuales se escanearon en un espectrómetro FTIR Perkin Elmer (modelo Frontier, Waltham, MA, USA). El análisis, tanto del blanco (pastilla de KBr sin muestra) como de las muestras, se llevó a cabo de 600 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ con una resolución de 1 cm⁻¹ y 32 scans por muestra.

5.5.Liberación

5.5.1. Eficiencia de encapsulación

Se preparó la NE cargada con DF como se menciona en la sección 5.2. Después de la carga, la NE cargada con DF se separó del DF no encapsulado por ultracentrifugación durante 60 minutos a 23.000 g y 15 °C. La intensidad de fluorescencia (F900, Edinburgh Instruments, Livingston, UK; λ excitación/emisión: 258/420 nm, slits: 3 nm) de la solución de DF libre después de la centrifugación se midió para determinar la cantidad de DF encapsulado con la ayuda de una curva de calibración preestablecida (intensidad de fluorescencia de soluciones DF con concentraciones conocidas). La eficiencia de encapsulación (EE%) se calculó usando la ecuación 5.

$$EE = (DF_{\text{total}} - DF_{\text{libre}} / DF_{\text{total}}) \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

donde DF_{total} es la cantidad inicial de diflunisal y DF_{libre} es la cantidad de diflunisal no encapsulado (Rivera *et al.*, 2015). Después de la carga con DF, se recubrió la NE con diferentes capas de polielectrolito de acuerdo con la metodología descrita anteriormente (véase la sección 5.3).

5.5.2. Liberación *in vitro*

La liberación *in vitro* de DF se realizó mediante el método de bolsa de diálisis. Para ello, suspensiones de nanocápsulas cargadas con DF (3 mL), se añadieron a membranas de diálisis (MWCO 6-8 kDa, Spectra/Por 1, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Domínguez, CA, USA) que se colocaron posteriormente en 50 mL de Buffer a pH 7.4 y pH 1.2) bajo agitación magnética a 37 ± 0.2 °C. A intervalos de tiempo apropiados, se tomaron alícuotas de 1 mL de medio de liberación y se reemplazaron con buffer fresco para mantener constante el volumen del medio de liberación. La cantidad de DF liberado a partir de nanocápsulas se evaluó mediante la intensidad de emisión de fluorescencia a 420 nm (pico de emisión) (F900, Edinburgh Instruments, Livingston, UK). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.5.3. Determinación del mecanismo de liberación por modelado matemático

Para determinar el mecanismo de liberación del diflunisal y comparar el efecto del número de capas polielectrolíticas presentes en las nanocápsulas en el perfil de liberación, se ajustaron los datos cinéticos de liberación a algunos modelos matemáticos encontrados en la literatura. Estos modelos describen la velocidad inicial de liberación del fármaco, en función de los mecanismos físicos que contribuyen a la liberación. Dichos mecanismos, están relacionados con la difusión de Fick y con los procesos de relajación de las cadenas poliméricas. Todos los modelos cuantifican la evolución de la cantidad del fármaco liberado en función del tiempo: $M_t = M_t(t)$. La velocidad de liberación, r , está dada por la derivada en el tiempo de M_t : $r = \frac{dM_t(t)}{dt}$. Se utilizaron los siguientes modelos.

5.5.3.1. Modelo Korsmeyer-Peppas

La ecuación de Korsmeyer-Peppas describe el comportamiento general de liberación de solutos de diferentes dispositivos poliméricos. Este modelo relaciona la liberación del fármaco con el tiempo transcurrido por la ecuación (Korsmeyer *et al.*, 1983; Machín *et al.*, 2012):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} t^n \quad (\text{Ec. 1})$$

donde M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberado en el instante t (min), n es un exponente de difusión que indica el mecanismo de liberación, y k_{KP} es una constante característica del sistema. M_∞ es la cantidad total de fármaco liberado ($t = \infty$). Valores de n alrededor de 0.5 se encuentran relacionados con el mecanismo de liberación de tipo difusión de Fick. Valores de n en el rango de 0.5-1.0 indican transporte anómalo no Fickiano y un valor de n igual a 1.0 representa transporte de Caso II (orden cero) (Korsmeyer *et al.*, 1983; Machín *et al.*, 2013).

5.5.3.2. Modelo Higuchi

El modelo de Higuchi puede expresarse como (Shu *et al.*, 2011):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{0.5} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberado en el instante t (min), y k_H es la constante de difusión de Higuchi. Los perfiles cuyo mecanismo predominante es simple difusión de Fick muestran buena correlación con este modelo.

5.5.3.3. Modelo cinético de primer orden

La ecuación de primer orden puede expresarse como (Costa and Lobo, 2001):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-k_1 t} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberado en el instante t (min), y k_1 es la constante de liberación de primer orden. Este modelo muestra buena correlación con los perfiles de liberación cuyo mecanismo predominante es el comportamiento de difusión anómalo.

5.5.3.4. Modelo cinético de orden cero

El mecanismo de liberación del tipo orden cero se expresa en la siguiente ecuación (Najib and Suleiman, 1985):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t \quad (\text{Ec. 4})$$

donde M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberado en el instante t (min), y k_0 es la constante de liberación de orden cero. Los perfiles de liberación que presentan un mejor ajuste a este modelo en general coinciden con los que muestran un mecanismo de transporte de Caso II en el modelo de Korsmeyer-Peppas. En este modelo la velocidad de liberación es constante: $r = k_0 \cdot M_\infty$.

Se aplicaron los modelos matemáticos anteriores a los datos cinéticos de liberación, ajustando los primeros puntos (de 0 a 60% del fármaco total liberado; Ritger and Peppas, 1987) de cada curva con el objetivo de tener una idea del mecanismo de liberación en cada uno de los sistemas.

5.6. Análisis Estadístico.

Todos los datos se expresaron como media \pm desviación estándar ($n = 3$). Las diferencias entre grupos se evaluaron aplicando ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Tuckey. Valores de $p < 0.01$ se consideraron estadísticamente significante.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización de los polímeros

Antes de la preparación de las nanocápsulas y su correspondiente caracterización, se procedió a caracterizar espectroscópicamente los polímeros a utilizar; κ -carragenina y quitosano. Con este propósito se obtuvieron espectros FTIR de ambos polímeros (Los espectros ^1H RMN se pueden observar en el apéndice 1).

6.1.1. κ -carragenina

En la Figura 8, se muestran las bandas de absorción de IR para κ -CAR. De manera general, se observa la presencia de las bandas de absorción características del O-H alrededor de los 3500 cm^{-1} , además de las típicas bandas de absorción de κ -CAR; la amplitud de absorción entre 1224 y 1263 cm^{-1} corresponde al estiramiento asimétrico del grupo de sulfato de éster (vibración S=O), que es común para todos los polisacáridos sulfatados. Las bandas de absorción a 850 , 928 y 971 cm^{-1} son típicas de κ -CAR e indican la vibración de $-\text{O}-\text{SO}_3$ en posición axial del C-4 de la galactosa, la vibración de estiramiento de C-O-C de 3,6-anhidrogalactosa y galactosa, respectivamente. Alrededor de 1046 - 1067 cm^{-1} para C-O y C-OH indicando la presencia de los enlaces glucosídicos (Rodrigues *et al.*, 2012; Carneiro *et al.*, 2013). Debe señalarse que la banda a 801 cm^{-1} , característica de vibración de $-\text{O}-\text{SO}_3$ axial en C-2 de 3,6-anhidrogalactosa, es casi ausente del espectro de IR, lo que indica presencia muy escasa de unidades de ι -carragenina (Volery *et al.*, 2004). Además, es interesante observar el pico a 890 cm^{-1} , que corresponde a β -D galactosa no sulfatada, señal característica de β -carragenina (Pereira *et al.*, 2009). Generalmente las carrageninas gelificantes (β , ι y κ) no se obtienen puras y contienen una proporción de uno o más tipos de la unidad B, 3,6-anhidro galactosa (Figura 8), las cuáles se diferencian en el número de sustituyentes sulfato. Las fracciones casi puras de ι y κ pueden ser obtenidas de las algas *Denticulatum Eucheuma* y *Kappaphycus alvarezii*, respectivamente. Mientras que de las unidades β no se han podido obtener fracciones puras y se encuentran típicamente asociadas a unidades κ (Piculell, 2006).

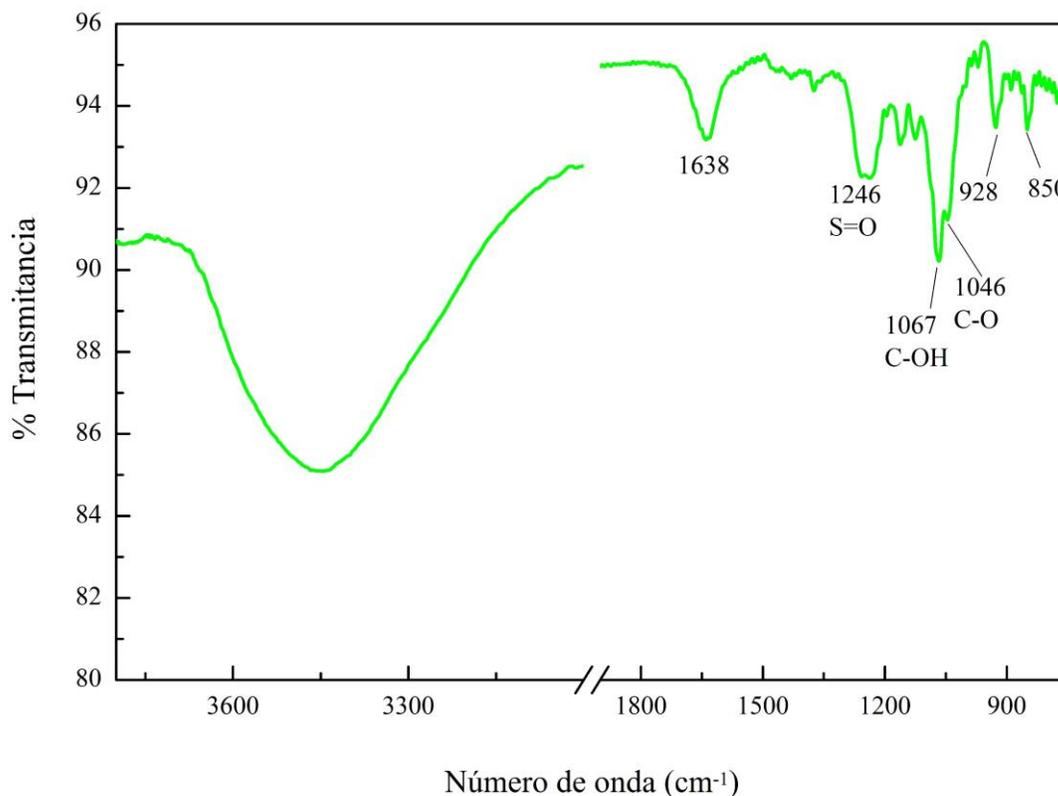


Figura 8. Espectro FTIR de κ -carragenina.

6.1.2. Quitosana

El espectro IR de quitosana (Figura 9) muestra un pico ancho a 3450cm^{-1} causado por la vibración simétrica N-H del grupo amino. Los picos alrededor de $3000\text{-}2850\text{cm}^{-1}$ corresponden a las vibraciones típicas de estiramiento C-H. Las señales a 1633 y 1565 cm^{-1} corresponden a grupos carbonilos (C=O-NHR) y a grupos amino (NH_2), respectivamente (Carneiro *et al.*, 2013). Mientras que las de 1415 y 1383 cm^{-1} fueron asignadas al modo de deformación simétrica CH_3 . Picos alrededor de 1153 y 915cm^{-1} indican presencia de sacáridos. La señal ancha a 1083cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento C-O de los enlaces glucosídicos presentes en quitosana (Grenha *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2004).

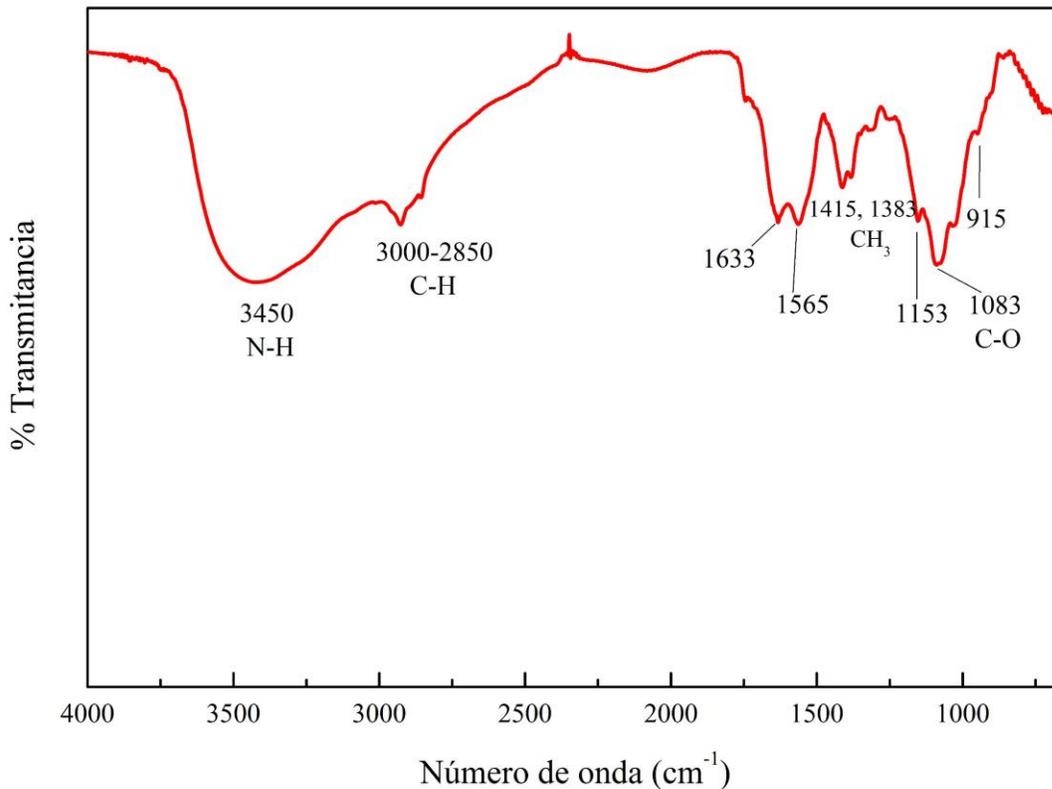


Figura 9. Espectro FTIR de quitosana.

6.2. Síntesis de nanocápsulas LBL

6.2.1. Efecto de la dilución de la emulsión

En la Figura 10 se muestran los resultados del tamaño de distintas diluciones acuosas de la emulsión, con el fin de obtener nanocápsulas estables mediante la adsorción de κ -CAR sobre éstas. Lo primero que hay que observar es que el tamaño de la NE no varía respecto a la dilución, presentando tamaños promedios de 253.2 ± 4.4 , 237.5 ± 2.4 y 248.7 ± 1.5 nm para la NE, NE diluida 1:10 y NE diluida 1:100, respectivamente. Mientras que los índices de polidispersión se mantuvieron en 0.22, 0.26 y 0.24. Rosas-Durazo y colaboradores (2011b) reportaron valores de tamaño de una nanoemulsión que comprendía

un núcleo oleoso de Miglyol 812 y surfactante DTAC de 95 y 410 nm a partir de una distribución bimodal de la misma. El presentar una sola población de tamaños podría indicar la posible contribución del aceite de oliva en la estabilidad del sistema de nanoemulsión.

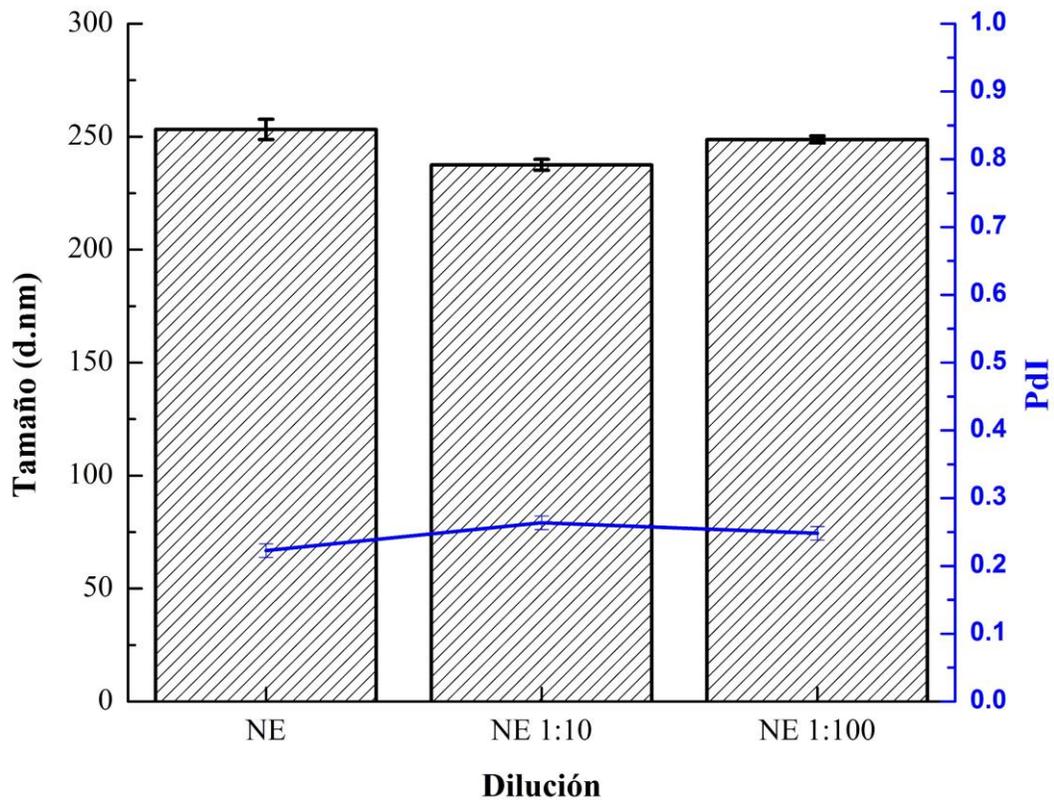


Figura 10. Tamaño (barras) e índice de polidispersión (PdI; línea) de la nanoemulsión a distintas diluciones.

En cuanto a la carga superficial (Potencial Z), se puede apreciar que esta se ve influenciada por la dilución de la NE (Figura 11). Sin embargo, en los 3 casos, la carga de la partícula presentó valores positivos y estables (entre ~ 40 a 90 mV) debido a la cabeza polar del surfactante DTAC $[-N(CH_3)_3^+]$.

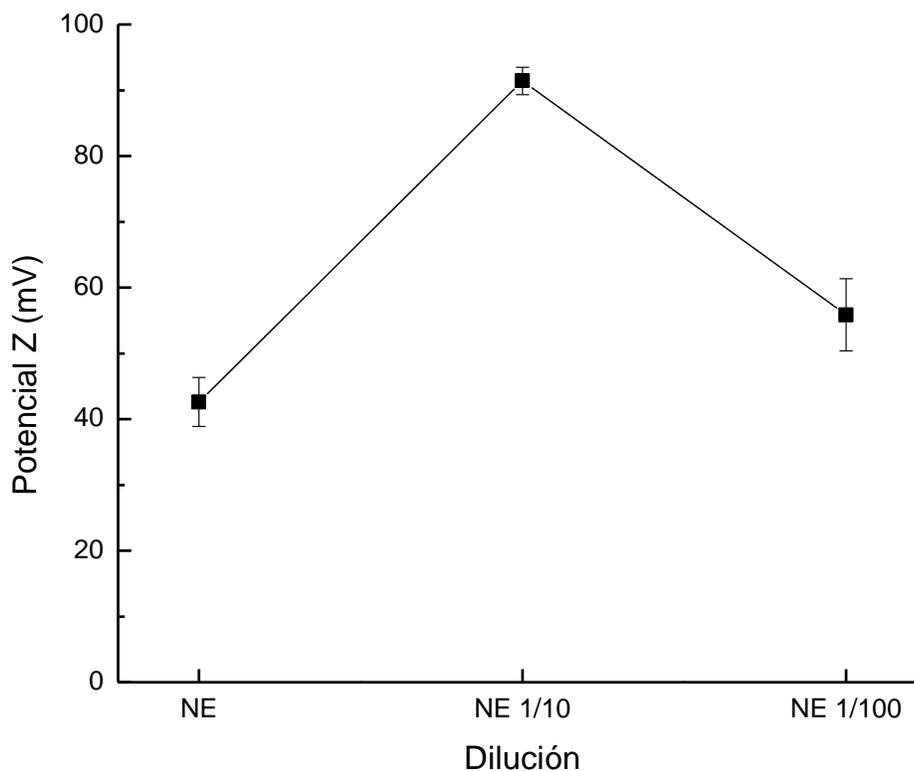


Figura 11. Efecto de la dilución de la NE sobre la carga superficial (Potencial Z).

6.2.2. Efecto de la dilución de la NE sobre la deposición polimérica

La deposición de κ -CAR sobre la NE estabilizada por DTAC previamente formada, se vio influenciada por dilución de esta última, tal como lo muestran los parámetros de distribución de tamaño (Figura 12) y potencial Z (Figura 13).

Los tamaños registrados después de la deposición de κ -CAR sobre las distintas diluciones de NE fueron de 286.0 ± 5.5 , 855.0 ± 72.2 y 265.8 ± 3.2 nm para NE, NE 1:10 y NE 1:100 respectivamente (Figura 12). Aumentando el tamaño de los sistemas en 33, 617 y 16 nm. Es probable que la población predominante de las NC elaboradas a partir de NE y NE 1:100 estén compuestas por gotitas de emulsión estabilizadas por DTAC y cubiertas parcialmente por κ -CAR, mientras que las NC a partir de NE 1:10 (~850 nm) pueden incluir especies de mayor complejidad estructural. La influencia de κ -CAR en el tamaño de

partícula de este sistema se puede explicar cómo la capacidad del polisacárido en adoptar una conformación helicoidal extendida y así asociar unas pocas partículas NE. Esta explicación estaría en concordancia con el aumento de ~3 veces de tamaño e índice de polidispersión que presenta este sistema. Rosas-Durazo *et al.* (2011b) observaron este mismo comportamiento al depositar κ -CAR sobre una nanoemulsión diluida 1:10, donde reportaron un tamaño de nanoemulsión de ~95 nm y el tamaño promedio después de la deposición polimérica (κ -CAR) fue de ~250-330 nm). Madrigal-Carballo y *col.* (2010) reportaron que al agregar bajas concentraciones de quitosana (0.025 w/v) a una solución de liposomas de lecitina de soya, aumentó el tamaño de ~290 nm a ~3000 nm y la carga superficial disminuyó de -70 a -2 mV, atribuyéndolo de igual manera a la formación de agregados.

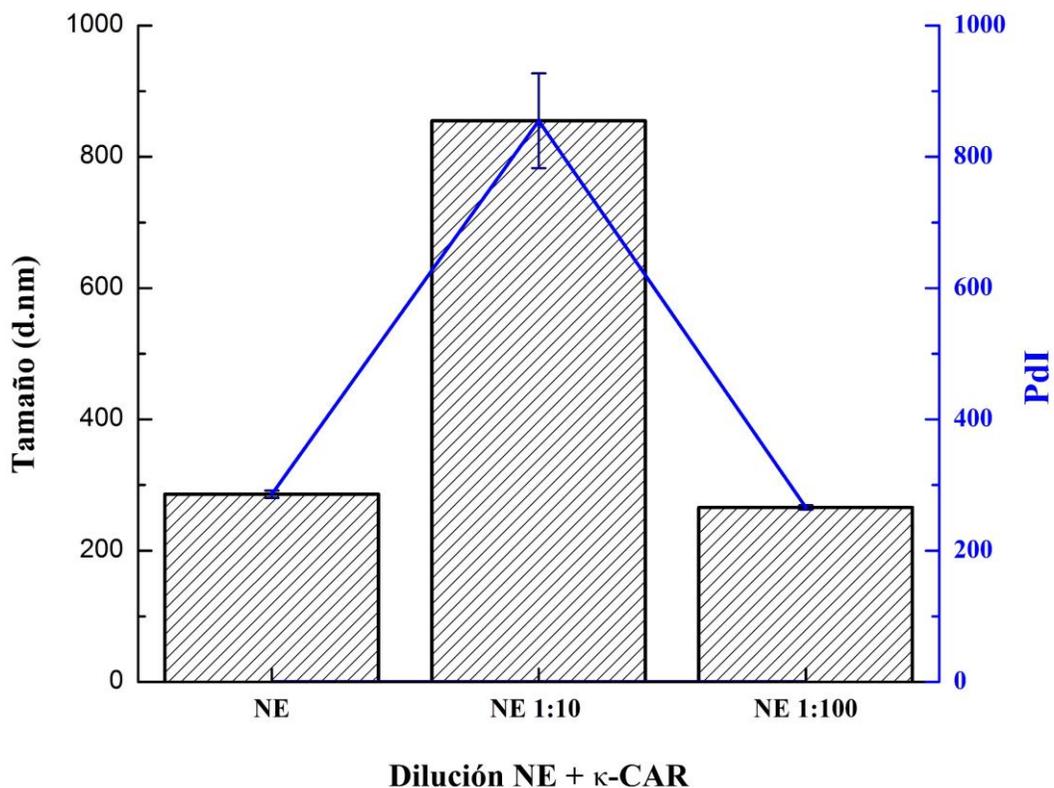


Figura 12. Tamaño (barras) e índice de polidispersión (PdI; línea) de nanocápsulas de κ -CAR a partir de diferentes diluciones acuosas de NE.

Los resultados de la Figura 13, muestran la dependencia de la dilución de la NE sobre la deposición polimérica de κ -CAR. En el caso de la emulsión sin dilución se puede observar que no se presentó ningún cambio en la carga superficial después del contacto con κ -CAR, lo que puede indicar que no hubo interacción ni deposición alguna, mientras que la deposición sobre la NE 1:10 disminuye la carga hasta casi neutralizarla por completo; con este dato y tomando en cuenta que el tamaño para este sistema presentó un aumento de ~ 3 veces (Figura 12), se puede proponer que los grupos $-\text{SO}_3^-$ de κ -CAR están interaccionando con los grupos $-(\text{CH}_3)_3\text{-N}^+$ del DTAC, sin embargo no están formando cápsulas individuales sino que el polímero en su forma extendida estaría rodeando varias nanogotas de emulsión, aumentando así el tamaño de los sistemas.

Rosas-Durazo *et al.* (2011b), observaron este mismo comportamiento al depositar κ -CAR sobre una nanoemulsión diluida 1:10, donde reportaron un Potencial Z de ~ 95 mV y después de la deposición polimérica (κ -CAR) fue de ~ 5 mV). Liu y *col.* (2012) observaron que al agregar gota a gota una solución de ι -CAR ($3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre solución de nanoesferas de $\text{SiO}_2\text{-NH}_3^+$ (pH 2.7) que originalmente presentaba un color azul claro, se tornó de color blanco inmediatamente después de añadir la carragenina, lo que indicó una agregación de los sistemas dispersos de $\text{SiO}_2\text{-NH}_3^+$, ya que al comienzo de la deposición polimérica, era mayor la cantidad de las nanoesferas y es probable que los grupos $-\text{OSO}_3^-$ de las cadenas de carragenina interaccionarán con dos o más nanoesferas de $\text{SiO}_2\text{-NH}_3^+$, arrojando un diámetro medio >350 nm. Por el contrario, cuando agregaron gota a gota la solución de las nanoesferas a la solución polimérica, las nanoesferas se encontraban independientes y podrían ser recubiertas por las cadenas de carragenina inmediatamente, inhibiendo la agregación de las nanoesferas a través de fuerzas de repulsión electrostáticas. Este último procedimiento dio como resultado un tamaño de $\text{SiO}_2\text{-Car}$ de ~ 118 nm y una distribución de tamaño menor.

Por otro lado, el resultado más sobresaliente fue cuando se utilizó NE 1:100 para realizar la deposición polimérica, ya que una vez realizado este proceso se registró una disminución en la carga superficial de -49 mV (Figura 13) lo cual indica un recubrimiento

efectivo de κ -CAR sobre las cargas de DTAC y formación de una NC estable y de tamaño aceptable (Figura 12) para el tipo de aplicación.

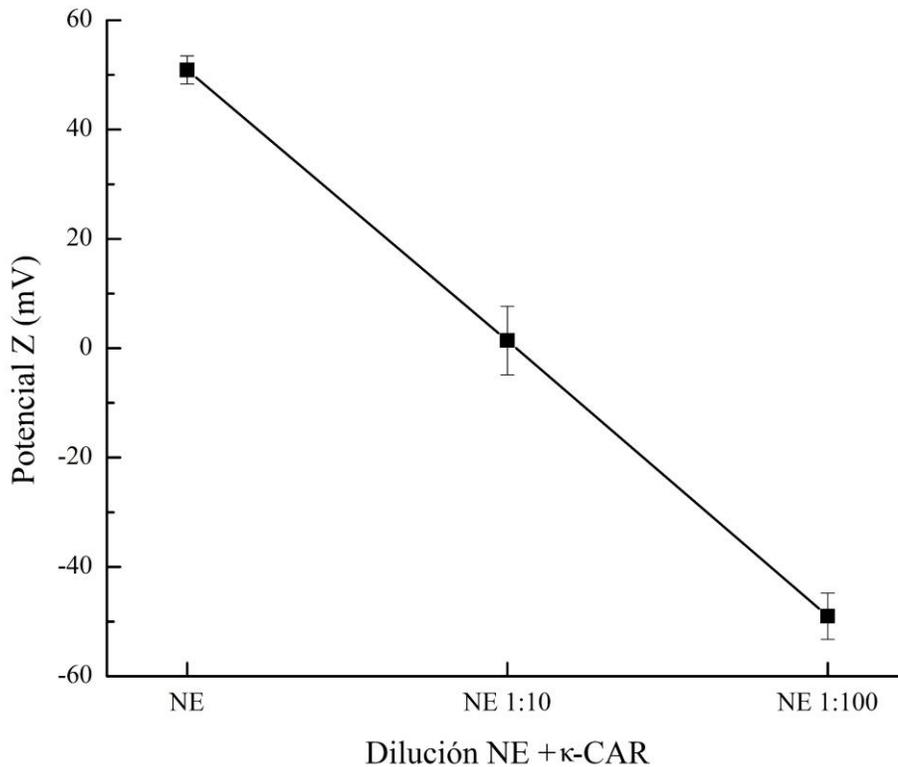


Figura 13. Carga superficial (Potencial-Z) de nanocápsulas de κ -CAR a partir de diferentes diluciones acuosas de NE.

6.2.3. Efecto del lavado de los sistemas

Con el fin de obtener tanto la nanoemulsión como las nanocápsulas con menos impurezas, se optó por centrifugar los sistemas y resuspender el sobrenadante en agua milli-Q para eliminar el material que no se llegó a incorporar en la emulsión, así como también los restos de polímero que no se logró depositar sobre la superficie de esta. De manera general, se observa en todos los sistemas una disminución de tamaño al pasar por el proceso

de lavado (Figura 14), lo cual puede estar relacionado con el supuesto que durante dicho proceso se estén eliminando restos de polímero y/o iones del medio.

Estos lavados después de cada etapa de deposición fueron cruciales para permitir la adsorción del siguiente polielectrolito de carga opuesta. Liu y *col.* (2012) realizaron al menos 3 ciclos centrifugación y resuspensión en agua, en el proceso de elaboración de nanocápsulas multicapa huecas de τ -CAR ($3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y QUI ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para eliminar completamente los polielectrolitos extra en los sistemas.

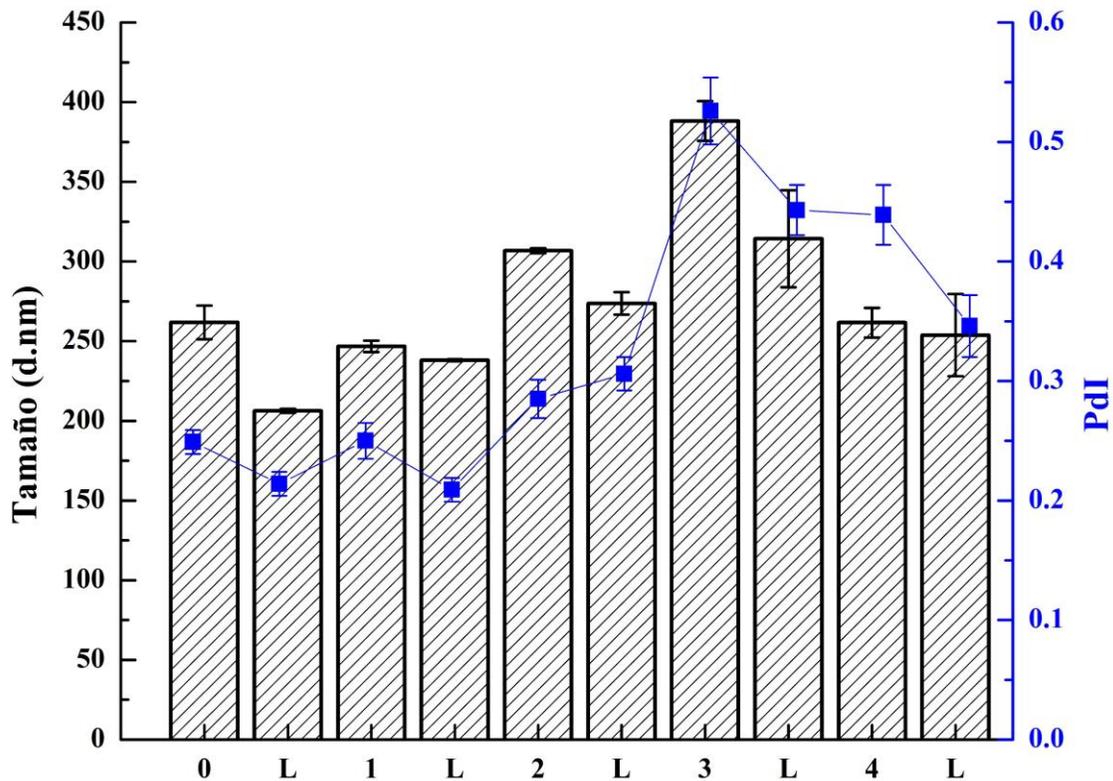


Figura 14. Registro del tamaño e índice de polidispersión durante el proceso de elaboración de una nanocápsula de 4 capas poliméricas y los respectivos lavados entre capas. 0, 1, 2, 3, 4: Número de capas poliméricas. L: Sistema lavado.

La carga se mantiene estable antes y después de lavar las nanocápsulas poliméricas (Figura 15). Para que un sistema coloidal sea estable su carga superficial debe de estar por encima de +30 o por debajo de -30 (Liu *et al.*, 2012). Sin embargo, en la nanocápsula de 3 capas poliméricas no se cumple con dicha condición. Por otro lado, se observa que el pH de la NE así como la NC de κ -CAR se mantiene aproximadamente neutro (pH 7). Sin embargo, en el momento en que QUI interviene, el pH de las nanocápsulas baja drásticamente alrededor de 3.5 y se mantiene así durante todo el proceso hasta llegar a la nanocápsula de 4 capas.

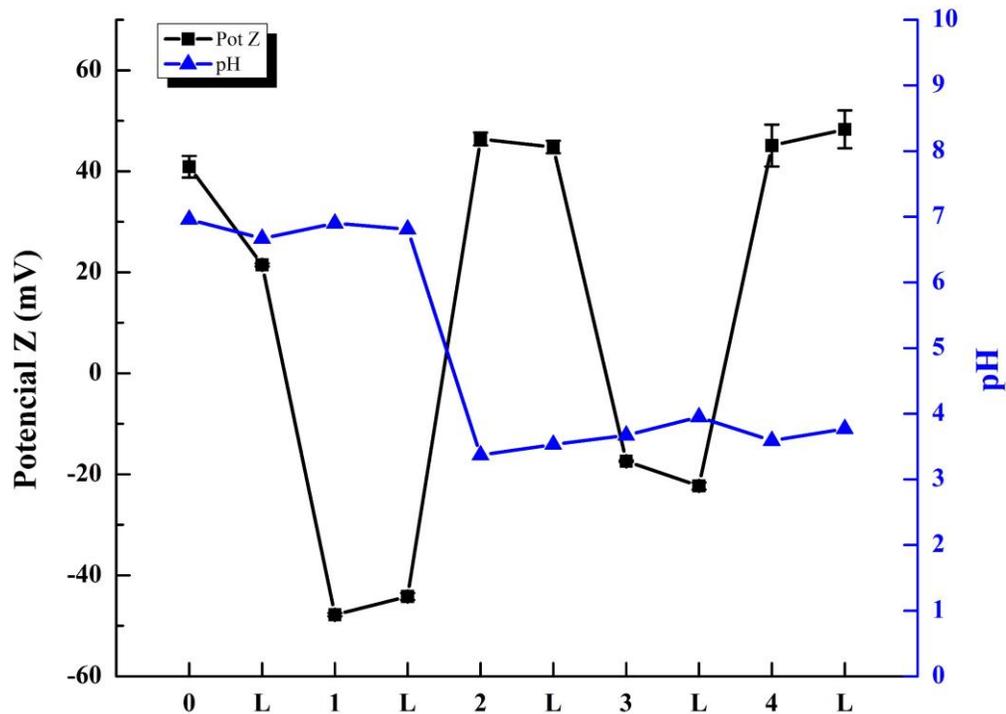


Figura 15. Registro del Potencial Z (mV) y pH durante el proceso de elaboración de una nanocápsula de 4 capas poliméricas y los respectivos lavados entre capas. 0, 1, 2, 3, 4: Número de capas poliméricas. L: Sistema lavado.

El hecho de que la carga después de depositar la tercera capa polimérica (κ -CAR) no registró valores menores a -30 mV (Figura 15), podría indicar que no se logró la total adsorción de κ -CAR. A pesar de que a pH \sim 3.5 se puede suponer que la mayoría de los grupos amino de QUI se encuentran en su forma protonada ($-\text{NH}_3^+$) y viables para presentar atracción electrostática ante un polianión (Vachoud *et al.*, 2000), el pH óptimo para que los grupos sulfatos ($-\text{OSO}_3^-$) de κ -CAR se encuentren cargados es entre 6 y 8 (Ye *et al.*, 2005). Por lo tanto, se evaluó si el aumento del pH de \sim 3.5 a neutro de NE(κ -CAR/QUI)₁ sería útil para lograr una nanocápsula de NE(κ -CAR/QUI)- κ -CAR estable.

Los resultados arrojaron que el tamaño de las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)₁ fue sensible al cambio de pH del medio de dispersión. Ya que al subir el pH a 7, los tamaños fueron mayores a 2 μm (Figura 16). Con el fin de investigar el efecto del pH en nanocápsulas multicapa huecas de ι -carragenina y quitosana, Liu y *col.* (2012) dispersaron nanocápsulas de 5 bicapas poliméricas en solución ácida y auto-titularon de pH = 2 a pH = 12. Con el aumento en el valor de pH de los medios de dispersión del 2 al 12, el diámetro de las nanocápsulas cambió de 344 a 757 nm. Este fenómeno lo explicaron en términos de la disminución de las interacciones electrostáticas entre $-\text{NH}_3^+$ de quitosana y $-\text{OSO}_3^-$ de carragenina.

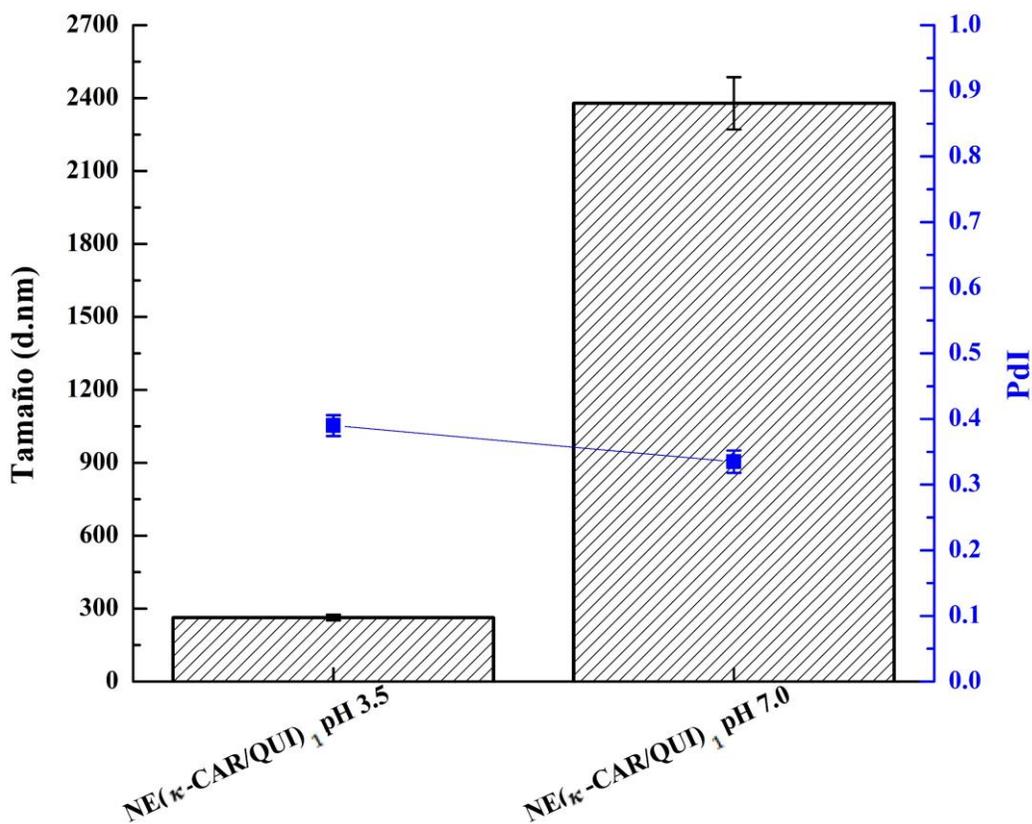


Figura 16. Tamaño (barras) e índice de polidispersión (PdI; línea) del sistema de NE(κ-CAR/QUI)₁ a diferente pH.

En base a los resultados anteriores, se decidió evaluar si el aumentar la concentración polimérica utilizada durante la deposición de la primera bicapa polimérica de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ permitiría lograr valores de potencial Z estables ($< -30 \text{ mV}$) en la tercera capa polimérica.

6.3. Tamaño y polidispersión de las Nanocápsulas LBL NE(κ -CAR/QUI)_x

Como se muestra en la Figura 17, el diámetro medio de la NE fue de 291.2 ± 8.1 nm (sin capas de polielectrolito) mientras que después de la deposición de κ -CAR el diámetro fue de 301.2 ± 6.9 nm. La capa de carragenina y la capa de quitosana se definieron como una bicapa. El diámetro medio de la primera bicapa [NE(κ -CAR/QUI)₁] aumentó a 319.5 ± 11.2 nm mientras que el de la segunda bicapa [NE(κ -CAR/QUI)₂] fue de 312.5 ± 15.9 nm. El tamaño de las NE(κ -CAR/QUI)₂ presentó un aumento de aproximadamente 21 nm con la adsorción de cuatro capas sobre el tamaño de la NE inicial. En general, los valores reportados para el grosor de una bicapa ensamblada en condiciones estándares oscila entre 3 y 7 nm (Kim and Choi, 2007). En este caso, el aumento de ~21 nm para dos bicapas poliméricas depositadas es mayor que el promedio reportado, esto es probablemente debido al hecho de que estos valores dependen de las condiciones del ensamblaje de las capas (pH, concentración de sales, solventes, etc.) y la naturaleza de los polielectrolitos utilizados.

En la Figura 17, puede observarse también un fenómeno interesante ya que, después de haber depositado la primera bicapa, la siguiente deposición de κ -CAR dio como resultado una disminución significativa del tamaño de las nanocápsulas. En el 2012, Liu y colaboradores, observaron la misma tendencia de disminución de tamaño al depositar ι -carragenina después de cada bicapa de nanoesferas multicapa de SiO₂(ι -CAR/QUI)_x. Ese resultado lo atribuyeron a la diferencia de densidad de carga de ambos polímeros.

Los valores de PDI (Figura 17) obtenidos mediante mediciones de DLS se usaron para analizar la calidad de los sistemas. Valores de PDI por encima de 0.5 indican muestras de mala calidad debido a la gran polidispersidad de las partículas (Bazylińska *et al.*, 2012). En cuanto a las nanocápsulas de núcleo oleoso con coraza multicapa de PE obtenidas en el presente estudio, los valores de PDI fueron menores de 0.3 (Figura 17) lo cual es indicativo de una distribución de tamaño estrecha y refleja buena calidad de los sistemas. Por otro lado, las cápsulas en un rango de tamaño de 100-300 nm son las más adecuadas para aplicaciones de administración de fármacos (Szczepanowicz *et al.*, 2015) debido a que presentan interacciones únicas con sistemas biológicos a nivel mesoscópico (Acharya and

Sahoo, 2011). Por lo tanto, las cápsulas preparadas en el presente estudio tienen un tamaño en el rango adecuado para aplicaciones farmacéuticas.

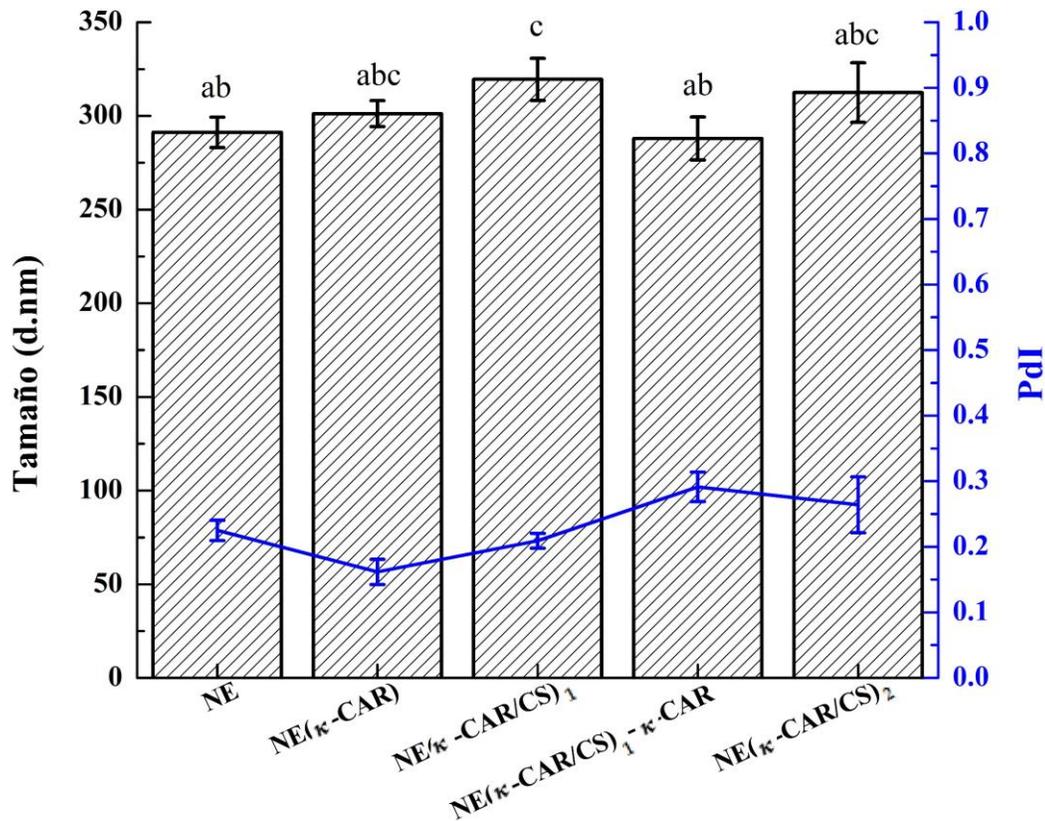


Figura 17. Diámetro hidrodinámico promedio (columnas) e índice de polidispersión (PdI; línea) de nanocápsulas NE(CAR/QUI)_x determinados por DLS como función del número de capas depositadas. Desviación estándar indicada ($n = 3$). Letras distintas (a, b, c) indican diferencias significativas en el diámetro hidrodinámico promedio.

6.4. Potencial Z de las nanocápsulas LBL NE(κ -CAR/QUI)_x

La tecnología de ensamblaje capa por capa se basa en las interacciones electrostáticas entre varios polielectrolitos con cargas opuestas. En el presente trabajo, la adsorción de las capas de κ -CAR y QUI fue seguida por la inspección de la carga superficial de los sistemas en solución tras la adición de cada capa polimérica. Las nanogotas de emulsión iniciales (cero capas poliméricas) presentaron carga positiva en su

superficie debido al amonio cuaternario del surfactante catiónico DTAC (Figura 18). Así que el paso inicial de la construcción de capas múltiples de polisacáridos se realizó con la solución de κ -carragenina cargada negativamente. En general, se aprecia que el potencial- ζ de las nanocápsulas cambia de negativo a positivo alternativamente (Figura 18). Los valores negativos corresponden a las capas de κ -CAR y los valores positivos corresponden a las capas de QUI, indicando el recubrimiento exitoso con polisacáridos después de cada capa depositada.

Además de eso, el potencial ζ da información considerable sobre la estabilidad de las suspensiones de nanocápsulas. Un sistema de partículas con valores de potenciales superiores a +30 mV o inferiores a -30 mV se considera generalmente que es estable debido a las fuertes fuerzas de repulsión que impiden la aparición de fenómenos de agregación entre las partículas (Bazylińska *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). La Figura 20 muestra valores potencial- ζ de más de +45 mV o menos -30 mV cuando la capa exterior era quitosana o carragenina, respectivamente. Estos valores son lo suficientemente grandes para demostrar que las nanocápsulas, pueden ser considerados en general estables debido a fuertes fuerzas de repulsión electrostática entre las mismas. Liu y colaboradores (2012) reportaron valores de potencial- ζ mayores de +50 mV y menores de -30 mV para quitosana y ι -carragenina, respectivamente, al sintetizar nanocápsulas multicapa huecas.

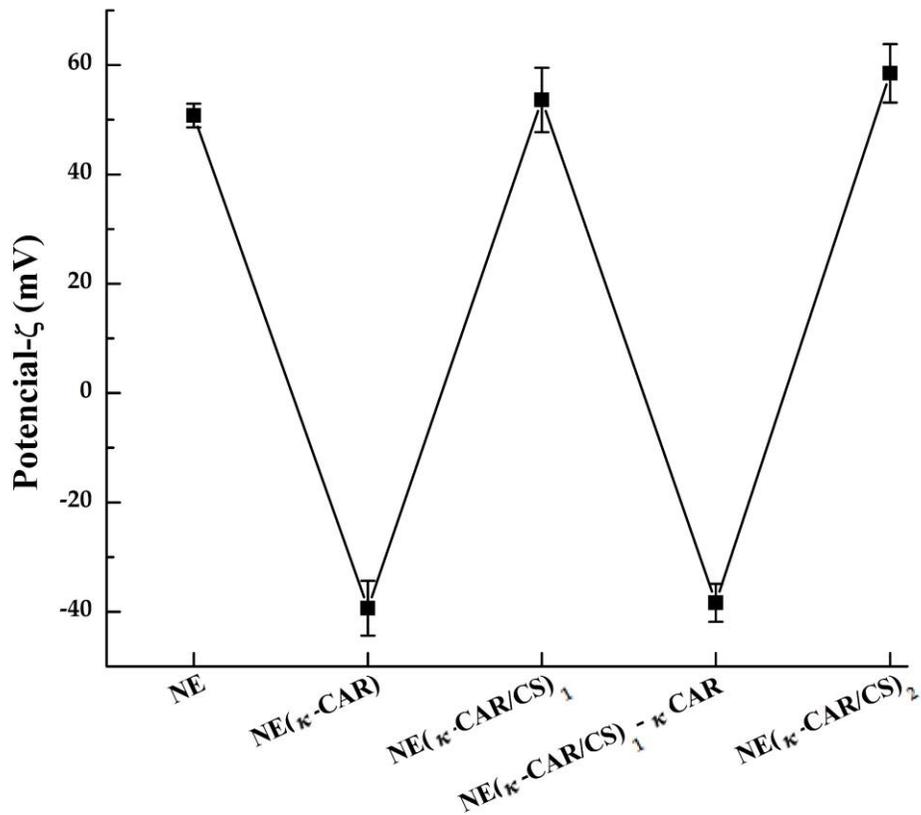


Figura 18. Potencial- ζ de nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x como función del número de capas depositadas. Desviación estándar indicada (n = 3).

6.5. Morfología

6.5.1. TEM

El tamaño de los sistemas secos observados por TEM (Figuras 19 y 20) es un tamaño menor que el obtenido en estado líquido por la técnica de dispersión dinámica de luz (Figura 17). Sin embargo, se sigue la misma tendencia en el crecimiento de las capas. Como se muestra en la Figura 20, el diámetro medio de la nanoemulsión fue de 42.7 ± 9.6 nm, mientras que después de la deposición de κ -carragenina el diámetro aumentó a 63.6 ± 22.8 nm. El diámetro medio de la primera bicapa [NE(κ -CAR/QUI)₁] fue de 102.9 ± 27.4 nm mientras que el de la segunda bicapa [NE(κ -CAR/QUI)₂] fue de 91.6 ± 33.1 nm. El tamaño de las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)₂ presentó un notable aumento desde 42.7 nm

a 91.6 nm con la adsorción de cuatro capas poliméricas, dicho aumento se deba probablemente a una combinación de κ -CAR y QUI en la coraza las nanocápsulas debido a interacciones electrostáticas. Liu y colaboradores (2012) reportaron un aumento en el tamaño de nanoesferas multicapa de $\text{SiO}_2(\kappa\text{-CAR/QUI})_x$ de 120 a 210 nm después de la deposición de 11 capas. Además, observaron el mismo comportamiento al medir el tamaño de nanoesferas de $\text{SiO}_2\text{-OH}$ por medio de DLS y TEM, donde los diámetros promedio reportados fueron 120 y 100 nm, respectivamente. Este fenómeno de observar un tamaño menor por medio de TEM se debe probablemente al estado en que se encuentra la muestra (Abbas *et al.*, 2015). El tamaño de las capas de polielectrolito hidratadas sobre la superficie de la nanoemulsión podría incrementar el tamaño promedio del diámetro hidrodinámico durante el análisis DLS (Babič *et al.*, 2009). Por otro lado, TEM provee imágenes de muestras en estado seco, por lo tanto, es normal que se observen tamaños de partículas menores. Resultados similares fueron reportados por Kittitheeranun y colaboradores en el 2015, al medir nanocápsulas huecas multicapa $(\text{PDADMAC/PSS})_5$, por DLS presentaron un tamaño de 619.5 ± 11.9 nm mientras que por medio de imágenes TEM se observó un tamaño promedio de 183.4 ± 5.4 nm.

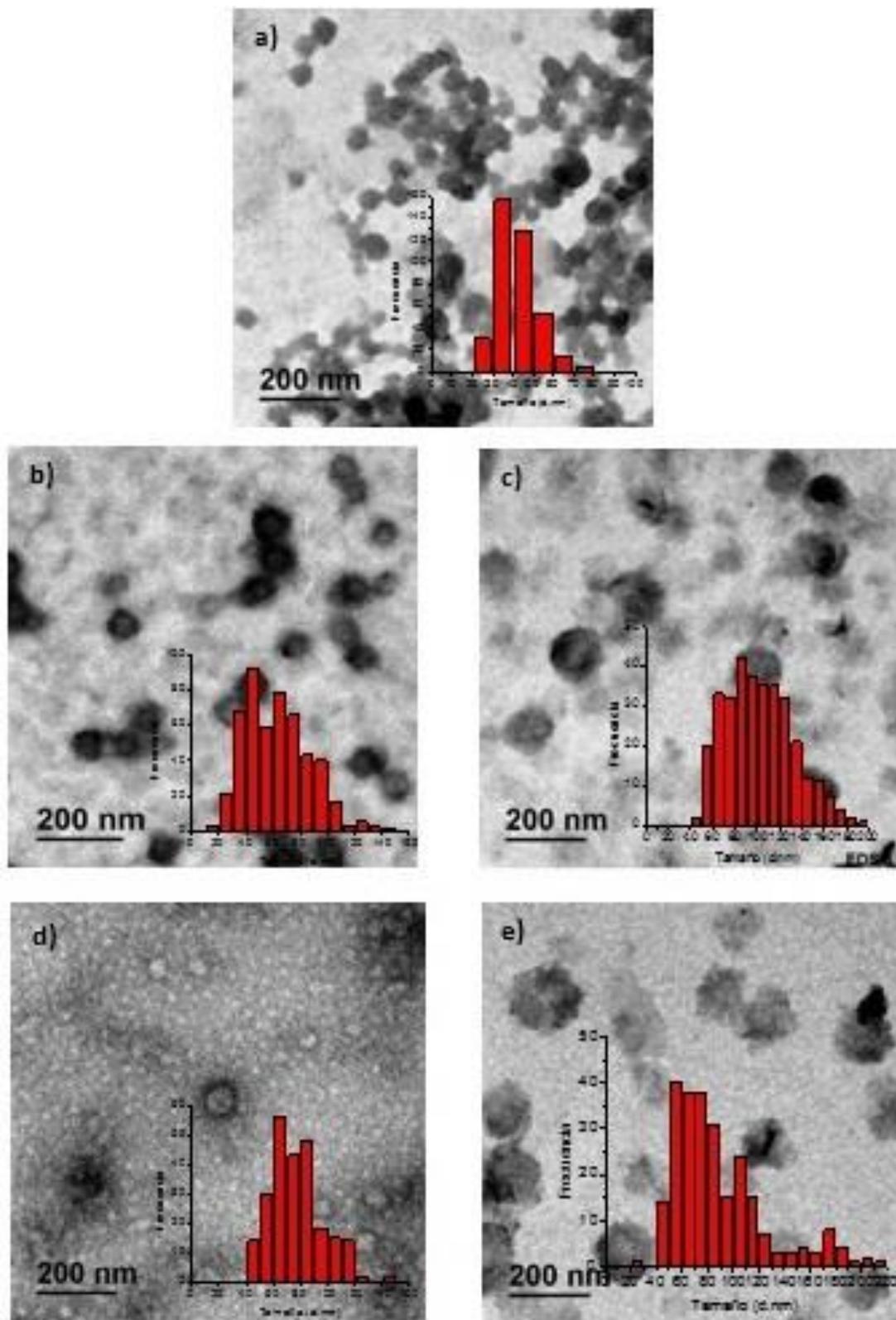


Figura 19. Imágenes TEM e histogramas de distribución de tamaños de a) NE, b) NE-κ-CAR, c) NE(κ-CAR/QUI)₁, d) NE(κ-CAR/QUI)₁κ-CAR y e) NE(κ-CAR/QUI)₂.

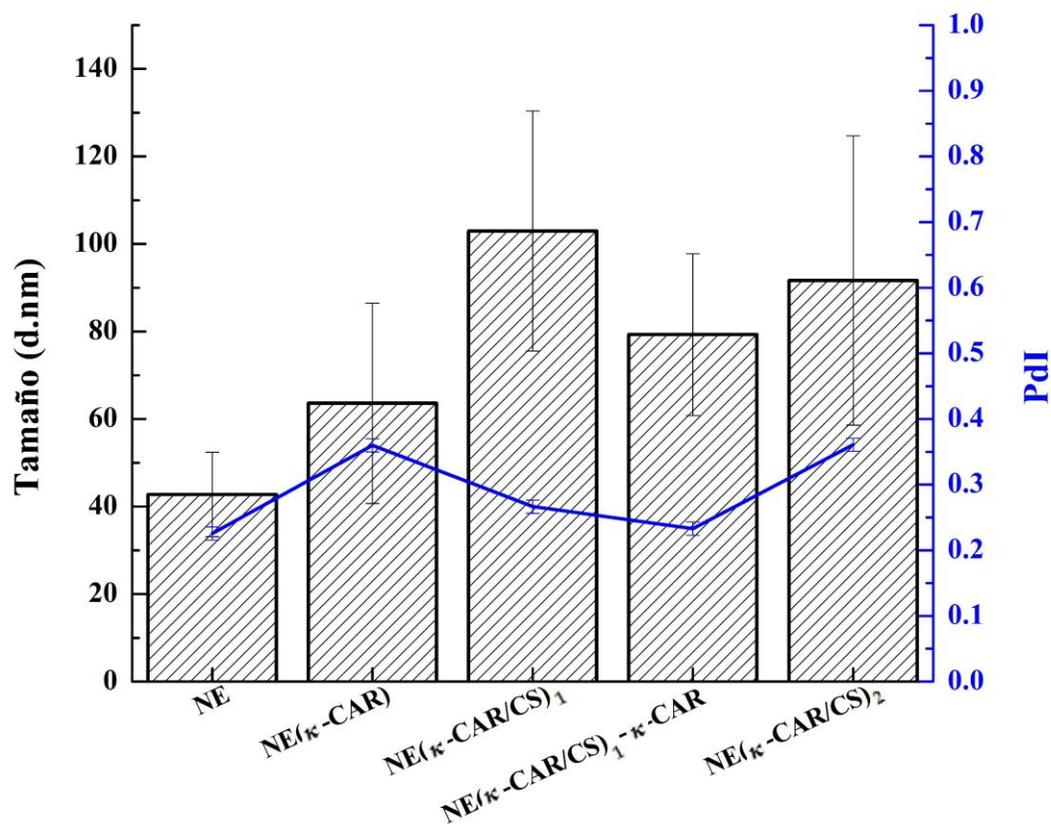


Figura 20. Diámetro promedio (columnas) e índice de polidispersión (PdI; línea) de nanocápsulas NE(CAR/QUI)_x determinados por TEM como función del número de capas depositadas. Desviación estándar indicada (n = 3).

6.5.2. SEM

El análisis de microscopía electrónica de barrido se realizó para obtener imágenes de los sistemas tanto de la NE como de las nanocápsulas NE(κ-CAR/QUI)_x. Los resultados de las observaciones realizadas se muestran en la Figura 21, donde se aprecia la morfología y tamaños aproximados para a) nanoemulsión, b) NE-κ-CAR, c) NE(κ-CAR/QUI)₁, d) NE(κ-CAR/QUI)₁-κ-CAR y e) NE(κ-CAR/QUI)₂.

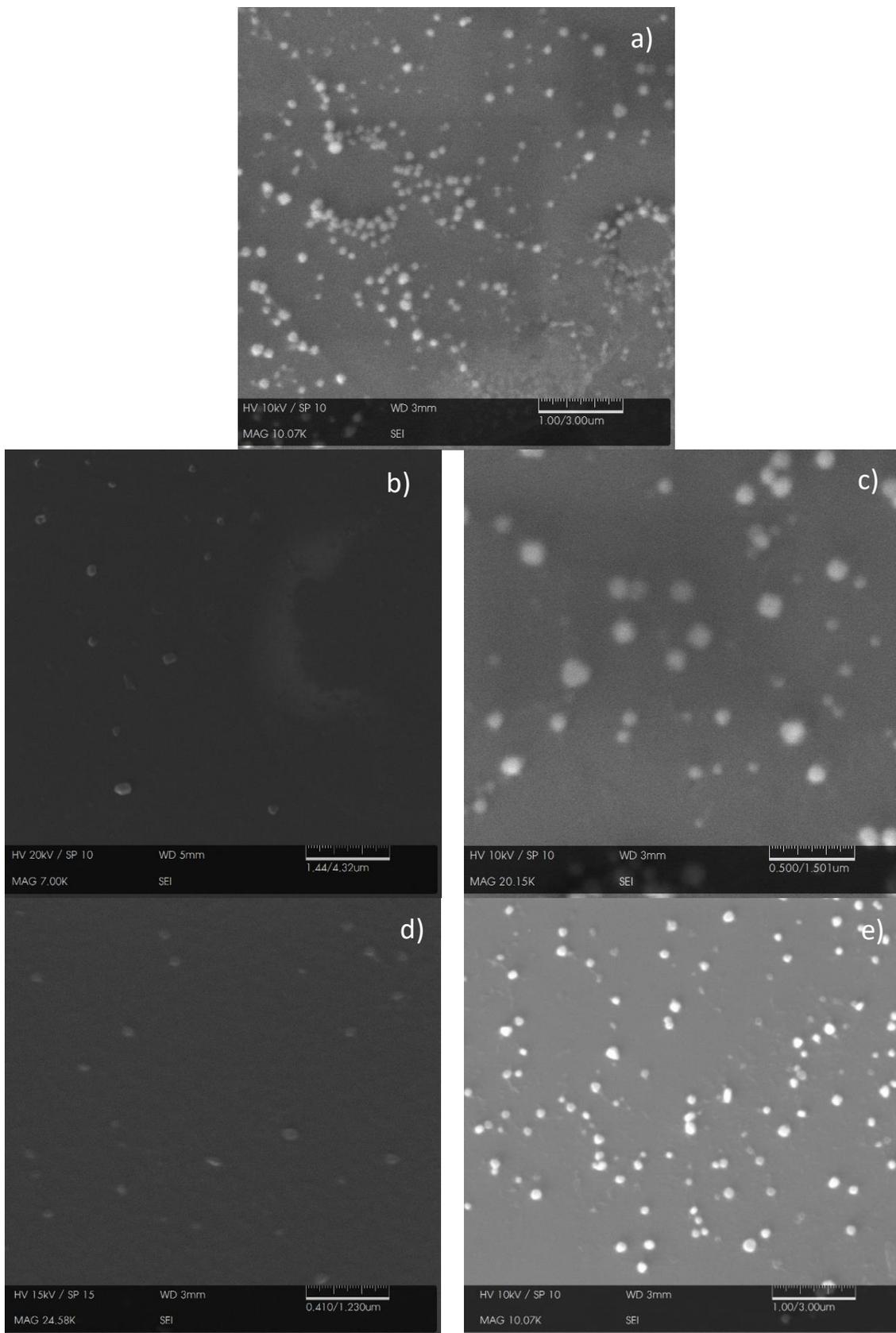


Figura 21. Imágenes SEM de a) NE, b) NE- κ -CAR, c) NE(κ -CAR/QUI)₁, d) NE(κ -CAR/QUI)₁ κ -CAR y e) NE(κ -CAR/QUI)₂.

6.5.3. AFM

Microscopía de fuerza atómica fue realizada para obtener una estimación de la morfología y superficie de los sistemas tanto de la NE como de las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x. Los resultados de las observaciones realizadas se muestran en la Figura 22, donde se aprecian imágenes 2D de a) nanoemulsión, b) NE- κ -CAR, c) NE(κ -CAR/QUI)₁, d) NE(κ -CAR/QUI)₁ κ -CAR y e) NE(κ -CAR/QUI)₂. De manera general, se aprecian partículas cuasiesféricas de alturas ~ 20 nm, lo que podría hacer constar que se trata probablemente de partículas individuales y no de agregados o superposiciones de estas. Inspeccionando la imagen de la NE (Figura 22a), se pueden observar tamaños entre ~ 26 -60 nm. Los tamaños para NE- κ -CAR (Figura 22b) fueron de ~ 30 -90 nm, mientras que, para las nanocápsulas de 2, 3 y 4 capas poliméricas los tamaños aproximados que se observaban iban desde los ~ 60 nm hasta los ~ 120 nm (Figura 22c-e). La contracción en tamaño y espesor observada, en comparación con el diámetro hidrodinámico obtenido por correlación de fotones (Figura 17), probablemente se deba a efectos del secado de las muestras y a la fuerza de exploración que actúa sobre la superficie de las partículas durante el análisis AFM (Lulevich *et al.*, 2003). Distancias verticales inferiores en comparación con diámetros promedios, fueron reportados en 2017 por Oliveira y colaboradores, quienes al evaluar nanocápsulas LBL de PLA-PEG y PLA-QUI, observaron diámetros promedio entre 164-265 nm y distancias verticales de 20-40 nm. Este fenómeno lo atribuyeron a un efecto de aplastamiento o “flattening” de los sistemas durante el análisis AFM.

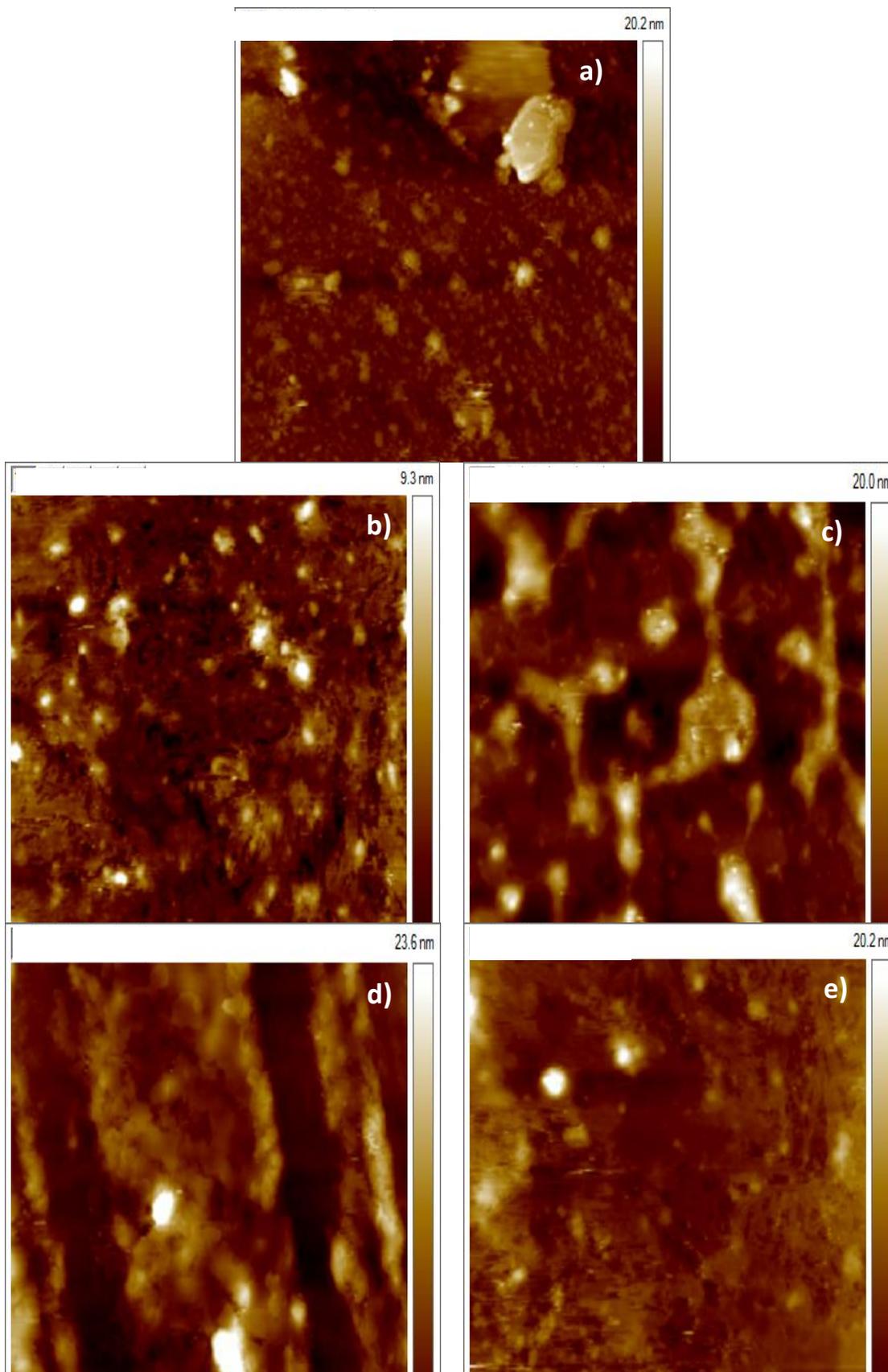


Figura 22. Imágenes AFM de a) NE, b) NE- κ -CAR, c) NE(κ -CAR/QUI)₁, d) NE(κ -CAR/QUI)₁ κ -CAR y e) NE(κ -CAR/QUI)₂

6.6. Caracterización Química.

6.6.1. EDS

Análisis XEDS se llevó a cabo para examinar cualitativamente la variación del contenido de elementos químicos característicos de: DTAC (N and Cl), κ -CAR (S, K, Ca y Na) y QUI (N) tanto en la nanoemulsión, así como en las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x. La Figura 23 muestra las líneas espectrales XEDS de a) NE, b) NE- κ -CAR, c) NE(κ -CAR/QUI)₁, d) NE(κ -CAR/QUI)₁ κ -CAR y e) NE(κ -CAR/QUI)₂ correspondientes a los principales elementos presentes en las muestras. En el espectro de NE (Figura 23a), N y Cl son los elementos presentes debido al surfactante DTAC. Ambos sistemas de NE- κ -CAR y NE(κ -CAR/QUI)₁ κ -CAR (Figura 23b,d) tiene un mayor contenido de elementos característicos de κ -CAR (S, K, Ca y Na) en comparación con los demás sistemas. Por otro lado, la proporción de N aumenta en los sistemas NE(κ -CAR/QUI)₁ y NE(κ -CAR/QUI)₂, mientras que la proporción de S, K, Ca y Na disminuye (Figura 23c,e). La presencia de tungsteno (W) en todos los sistemas se debe a la tinción con ácido fosfotúngstico que se realizó a las muestras durante su preparación para su observación en TEM y las líneas del cobre (Cu) pertenecen a las rejillas TEM.

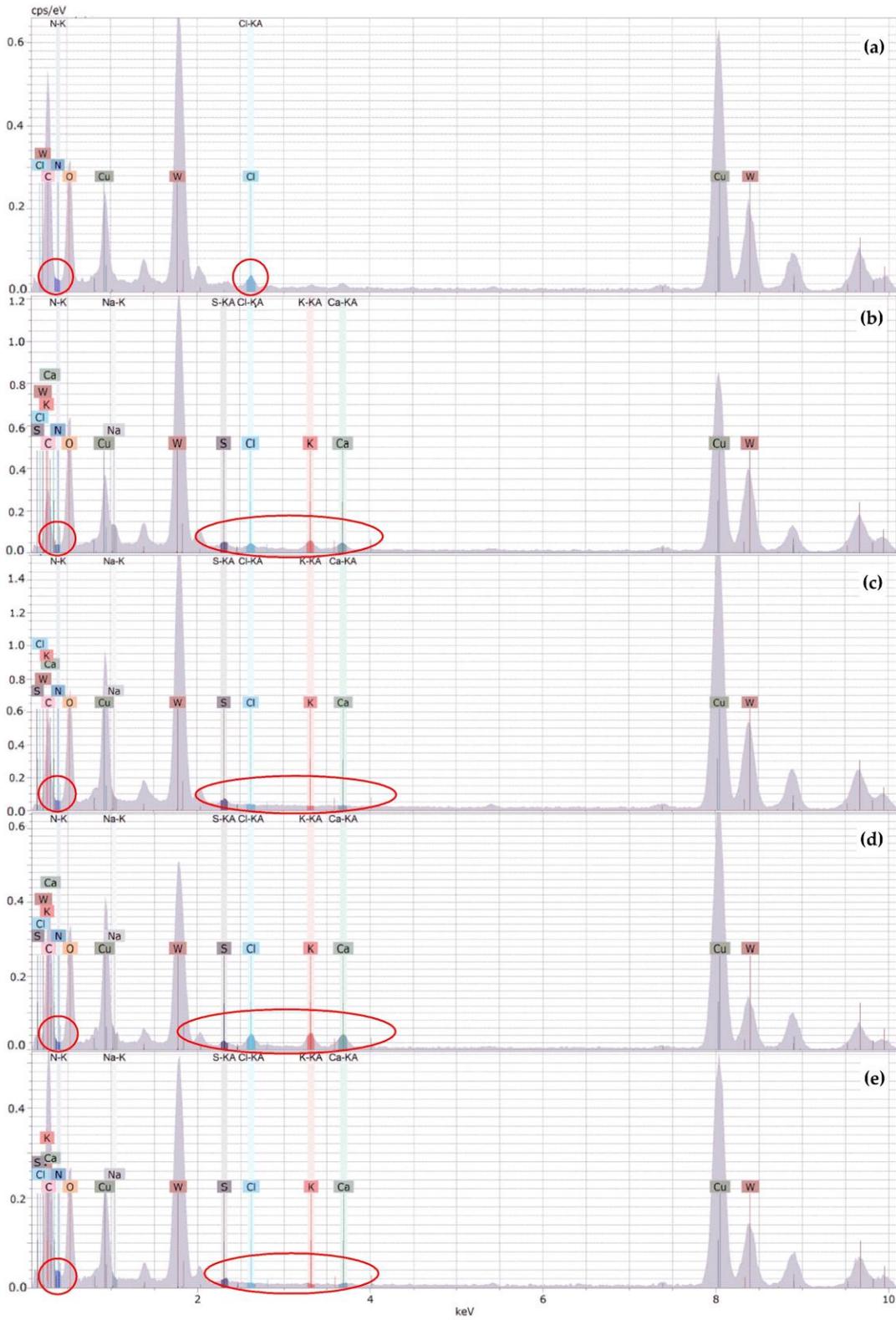


Figura 23. Espectros XEDS de a) NE, b) NE-κ-CAR, c) NE(κ-CAR/QUI)₁, d) NE(κ-CAR/QUI)₁-CAR y e) NE(κ-CAR/QUI)₂.

6.6.2. FTIR

6.6.2.1.NE

La Figura 24, muestra los espectros FTIR de aceite de oliva, el surfactante DTAC y el sistema de nanoemulsión (NE). En el espectro correspondiente al aceite de oliva, se pueden observar varias bandas características relacionadas con grupos funcionales de lípidos. En la región espectral de $3080-2800\text{cm}^{-1}$ aparecen las señales asignadas a la vibración de estiramiento C-H simétrico y asimétrico, de los grupos alifáticos CH_2 y CH_3 de los ácidos grasos y del resto alquilo de los triglicéridos, los cuáles se encuentran en grandes cantidades en los aceites vegetales. El pico de baja intensidad en 3005cm^{-1} puede ser explicado por la vibración de estiramiento del doble enlace cis $\text{CH} = \text{CH}$. La señal fuerte situada en 1743cm^{-1} se puede atribuir al modo de estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de triglicéridos ($\text{nC} = \text{O}$) y el hombro encontrado alrededor de 1700cm^{-1} es característico de la presencia de ácidos grasos libres (carboxílico $\text{nC} = \text{O}$). De igual manera, se detecta la vibración de estiramiento C-O de los grupos éster en 1238 y 1163cm^{-1} , y en general, se observa la deformación C-H entre 1500 y 900cm^{-1} , región espectroscópica que también se conoce como región de huella dactilar (Tay *et al.*, 2002; Vlachos *et al.*, 2006).

En el espectro del surfactante DTAC, la zona entre 3050 y 2800 representa las vibraciones de estiramiento características de C-H; el par de señales en 2919cm^{-1} y 2852cm^{-1} son asignadas a las señales de vibración de estiramiento simétrico y asimétrico, respectivamente del grupo $-\text{CH}_2$ correspondiente a la cadena hidrocarbonada. La señal de intensidad a 1486cm^{-1} corresponde a la flexión asimétrica del grupo CH_3-N^+ propia de la cabeza polar en la estructura del surfactante (Özcan and Gök, 2012). Alrededor de los 1400cm^{-1} se presentan regiones de estiramiento $-\text{CH}_2$ y entre los 1000 y 900cm^{-1} las regiones de estiramiento C-N (Rommel *et al.*, 2012)

En el espectro de la NE se pueden apreciar señales tanto del aceite de oliva como del surfactante DTAC. Las señales débiles alrededor de los 2900cm^{-1} corresponden a la vibración de estiramiento C-H tanto del aceite de oliva como a la cadena hidrocarbonada del surfactante DTAC. La banda a 1743cm^{-1} corresponde los grupos $\text{C}=\text{O}$ de los

triglicéridos del aceite de oliva. De igual manera, la señal a 1515 cm^{-1} se puede atribuir a los grupos $\text{CH}_3\text{-N}^+$ del surfactante.

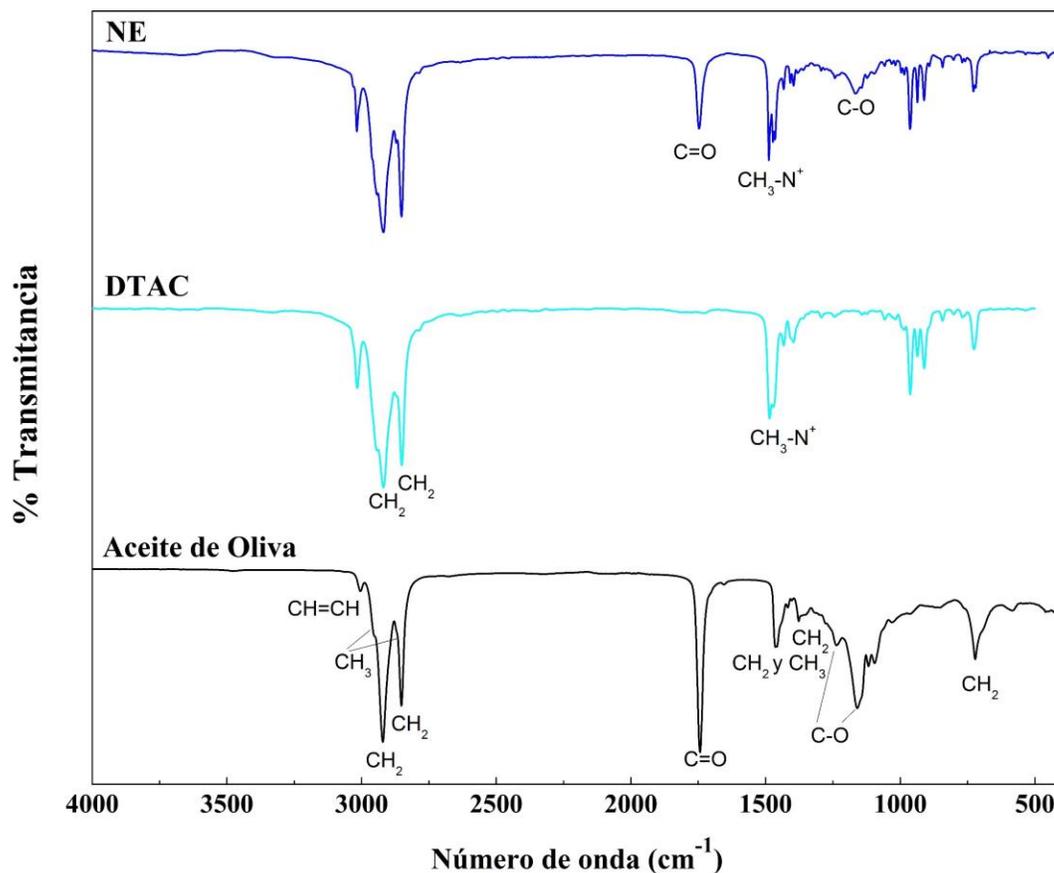


Figura 24. Espectro FTIR comparativo entre el aceite de oliva, el surfactante DTAC y la Nanoemulsión (NE).

6.6.2.2. Nanocápsulas poliméricas

Se realizaron análisis FTIR para evidenciar la presencia de grupos funcionales característicos de los componentes tanto de la NE como de las nanocápsulas $\text{NE}(\kappa\text{-CAR/QUI})_x$. La Figura 25 muestra los espectros FTIR obtenidos a partir del análisis de una

muestra de nanoemulsión (NE), κ -carragenina (κ -CAR) y quitosana (QUI), así como una muestra de nanocápsulas de κ -CAR y nanocápsulas con dos bicapas de κ -CAR y QUI [(NE(κ -CAR/QUI)₂]. En el espectro de la NE (Figura 25a), se pueden apreciar las bandas características tanto del surfactante DTAC como del aceite de oliva, como se discutió anteriormente. El análisis FTIR de κ -carragenina (Figura 25b) mostró varias señales, de las que es importante destacar un pico a 1246 cm⁻¹ correspondiente a los grupos sulfato, un pico alrededor de 1067 cm⁻¹ atribuido al enlace glucosídico, un pico a 928 cm⁻¹ que corresponde a la 3,6-anhidrogalactosa y otro a 850 cm⁻¹, que corresponde a la galactosa-4-sulfato (Carneiro *et al.*, 2013; Rosas-Durazo *et al.*, 2011a). Por su parte en el espectro de quitosana (Figura 25c), se muestran las señales típicas a 1633 y 1565 cm⁻¹ que corresponden a grupos carbonilos (C=O-NHR) y aminos (NH₂), respectivamente (Carneiro *et al.*, 2013). Por otra parte, se identificó un pico correspondiente a los enlaces glucosídicos en 1083 cm⁻¹ (Grenha *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2004).

En el espectro FTIR obtenido de las nanocápsulas de κ -carragenina (Figura 25d) se pueden apreciar algunas señales propias de la NE. Las señales débiles alrededor de los 2900 cm⁻¹ corresponden a la vibración de estiramiento C-H tanto del aceite de oliva como a la cadena hidrocarbonada del surfactante DTAC. La banda a 1743 cm⁻¹ corresponde los grupos C=O de los triglicéridos del aceite de oliva. De igual manera, la señal a 1515 cm⁻¹ se puede atribuir a los grupos CH₃-N⁺ del DTAC. Por otro lado, la banda típica del grupo sulfato de la carragenina se presentó unida en una sola banda ancha junto con la región de los enlaces glucosídicos (Grenha 2009). Sin embargo, las señales de 3,6-anhidrogalactosa y galactosa-4-sulfato (928 y 850 cm⁻¹ respectivamente) no se pudieron evidenciar como señales claras e individuales.

En el caso del espectro FTIR del sistema de nanocápsulas con dos bicapas de κ -CAR y QUI (Figura 25e), se presenta una banda de absorción a 1,633 cm⁻¹, correspondiente a grupos carbonilos (C=O-NHR) y aminos (NH₂) de quitosana, los cuáles se convierten en una sola banda (Grenha 2009). Además, la banda alrededor de 1388 cm⁻¹, también es propia del polímero catiónico (deformación simétrica de CH₃). En lo que respecta a κ -carragenina, se pueden apreciar mejor las señales correspondientes a 3,6-anhidrogalactosa y galactosa-4-sulfato (929 y 852 cm⁻¹ respectivamente). Estos resultados evidencian la

presencia de los polisacáridos de carga opuesta κ -carragenina y quitosana en las nanocápsulas.

Cabe mencionar que las interacciones principales en los sistemas son electrostáticas. Sin embargo, también se tiene la presencia de fuerzas hidrofóbicas que promueven la formación de la nanoemulsión (interacciones entre el DTAC y los triglicéridos del aceite de oliva), así como puentes de hidrógeno entre los polielectrolitos (Sankalia *et al.*, 2006). Ya que DTAC es un agente tensioactivo catiónico, las gotas de nanoemulsión tienen carga positiva (Figura 18). Cuando se agrega κ -carragenina al sistema, este polímero se une a las nanogotas de emulsión debido a la carga negativa de sus grupos sulfato (OSO_3^-). Cuando se agrega al sistema quitosana sus grupos NH_3^+ son electrostáticamente atraídos a κ -carragenina, estas interacciones electrostáticas promueven la formación de las capas de polielectrolito alrededor de las gotas de emulsión. Estas interacciones pueden ser las responsables de los desplazamientos en las bandas C=O y $\text{CH}_3\text{-N}^+$. En el espectro de la NE (Figura 25a), se observa la banda correspondiente a C=O debido a los triglicéridos del aceite de oliva, localizada a 1747 cm^{-1} y, la señal de $\text{CH}_3\text{-N}^+$ correspondiente a la cabeza polar del DTAC, la cual aparece en 1488 cm^{-1} . Con la primera capa de κ -carragenina, se aprecia un desplazamiento de estas señales a 1743 y 1515 cm^{-1} , respectivamente (Figura 25d). En el caso de la señal de $\text{CH}_3\text{-N}^+$, el desplazamiento se debe probablemente a las interacciones electrostáticas, mientras que el desplazamiento de los grupos C=O de las moléculas de los triglicéridos puede deberse a interacciones entre el surfactante DTAC y κ -carragenina; las moléculas de los triglicéridos podrían encontrarse paralelas a las colas hidrofóbicas del DTAC (Hamilton, 1989) y, por lo tanto, las modificaciones en la molécula del surfactante debido a las interacciones con κ -CAR, pudieran influenciar el comportamiento de vibración de los triglicéridos. Cuando QUI es añadido al sistema, la señal no muestra algún desplazamiento (Figura 25e), lo que pudiera significar que el principal efecto está dado por las interacciones entre DTAC y κ -CAR.

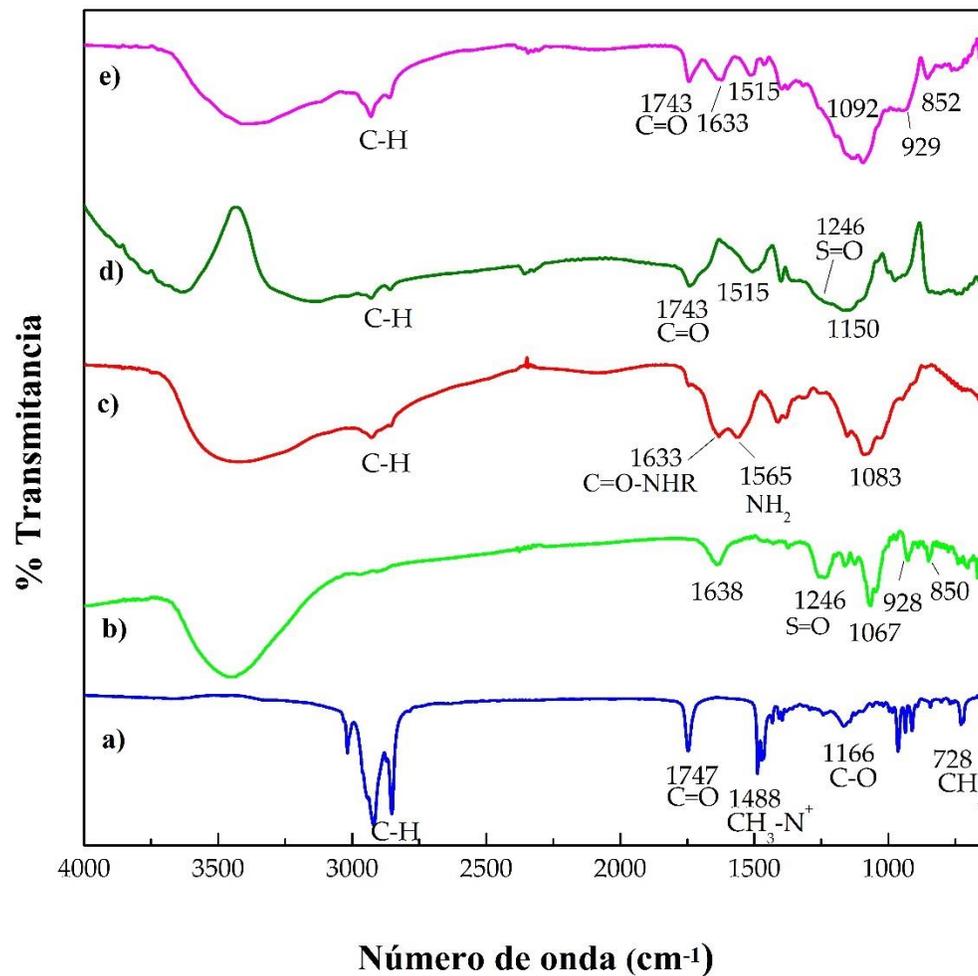


Figura 25. Espectro FTIR comparativo entre a) NE, b) κ -CAR, c) QUI, d) NE- κ -CAR y e) NE(κ -CAR/QUI)₂.

6.6.2.3. Nanocápsulas poliméricas cargadas con bioactivo

Los espectros FTIR para DF, NE y nanoemulsión cargada con diflunisal (NE.-DF) se muestran en la Figura 26 en un intervalo de 3500-500 cm^{-1} . El antiinflamatorio diflunisal presentó picos característicos. El estiramiento C-H aromático interfiere con la banda O-H y se observó un área de picos múltiples aproximadamente entre 3400-2800 cm^{-1} . Por otro lado, en el espectro de NE-DF (Figura 26), la banda de absorción a 1670 cm^{-1} está asociada con el estiramiento CO en el grupo carboxílico del DF, mientras que las señales observadas en la región de baja frecuencia (1600-600 cm^{-1}) representan picos atribuidos tanto al diflunisal como a la NE.

6.7. Liberación

6.7.1. Eficiencia de Encapsulación

Las nanocápsulas de núcleo oleoso de κ -CAR/QUI presentan por sí mismas potencial bioactivo debido a las propiedades del aceite de oliva y de los biopolímeros (Dutta *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2011). Sin embargo, para estudiar las propiedades de liberación de un modelo de fármaco hidrofóbico, se pre-encapsuló diflunisal en el sistema de emulsión, el cual fue posteriormente recubierto de capas de polielectrolito de κ -CAR y QUI. La liberación del fármaco se evaluó a partir de muestras de cero, una, dos, tres y cuatro capas polielectrolíticas. De esta manera, la eficiencia de encapsulación (EE%) es un parámetro importante para evaluar la capacidad de retención del DF en las nanocápsulas. Cada uno de los sistemas se evaluó por triplicado y se encontró que un $72.3 \pm 5.3\%$ del diflunisal fue encapsulado en la NE. Esta eficiencia de encapsulación se relaciona probablemente a una alta hidrofobicidad del fármaco y esto podría significar que el sistema es adecuado para retener activos lipofílicos.

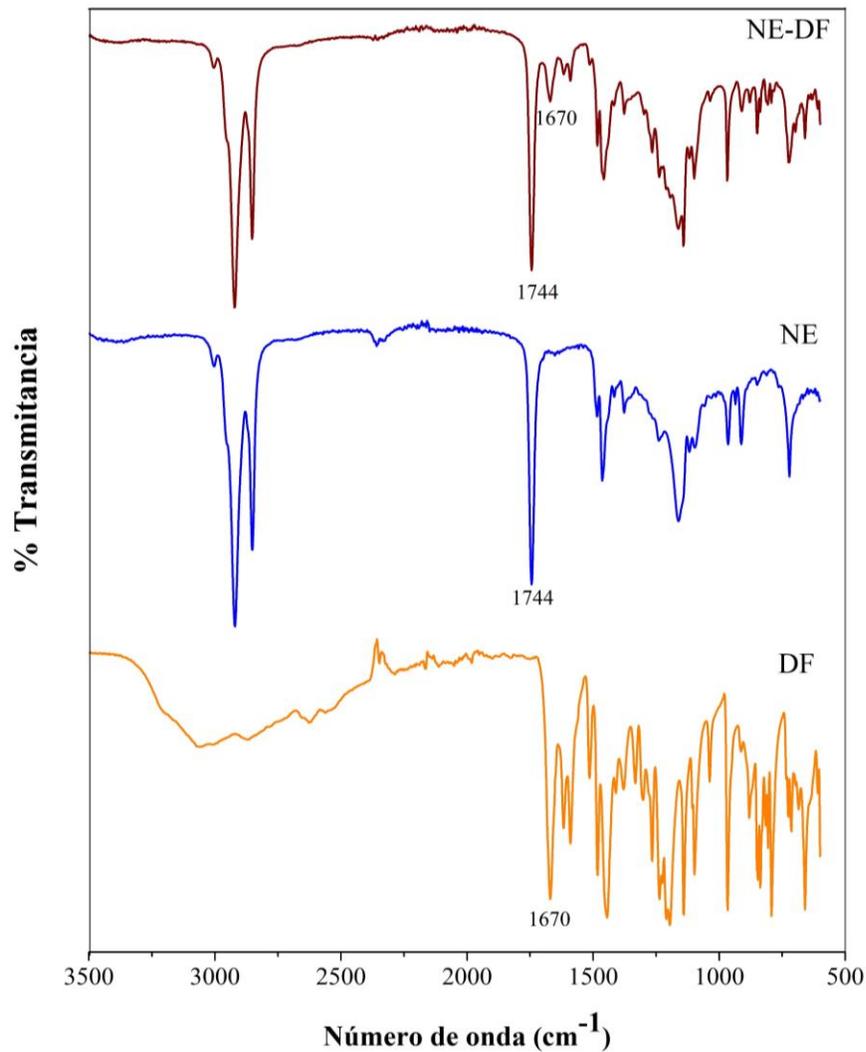


Figura 26. Espectro FTIR comparativo entre el DF, la NE y la nanoemulsión cargada con diflunisal (NE-DF).

6.7.2. Eficiencia de Liberación

Por otro lado, la Figura 27 muestra los perfiles de liberación del diflunisal a partir de la nanoemulsión y de las nanocápsulas con una, dos, tres y cuatro capas poliméricas a pH 7.4 y 37°C. La cantidad de DF liberada (M_t) se expresa como la fracción liberada con relación a la cantidad total liberada (M_∞). Al comparar dichos perfiles de liberación, es evidente que la presencia de una coraza de polielectrolito ofrece una barrera para la

liberación del DF cargado en los sistemas. En este sentido, en la Figura 27 se aprecia que, para los sistemas de cero (NE), una (NE- κ -CAR) y dos [$\text{NE}(\kappa\text{-CAR/QUI})_1$] capas poliméricas, se libera alrededor de 80% del diflunisal tras transcurrir los primeros 60 minutos, mientras que el sistema de cuatro capas poliméricas [$\text{NE}(\kappa\text{-CAR/QUI})_2$] libera la misma cantidad tras transcurrir 120 minutos.

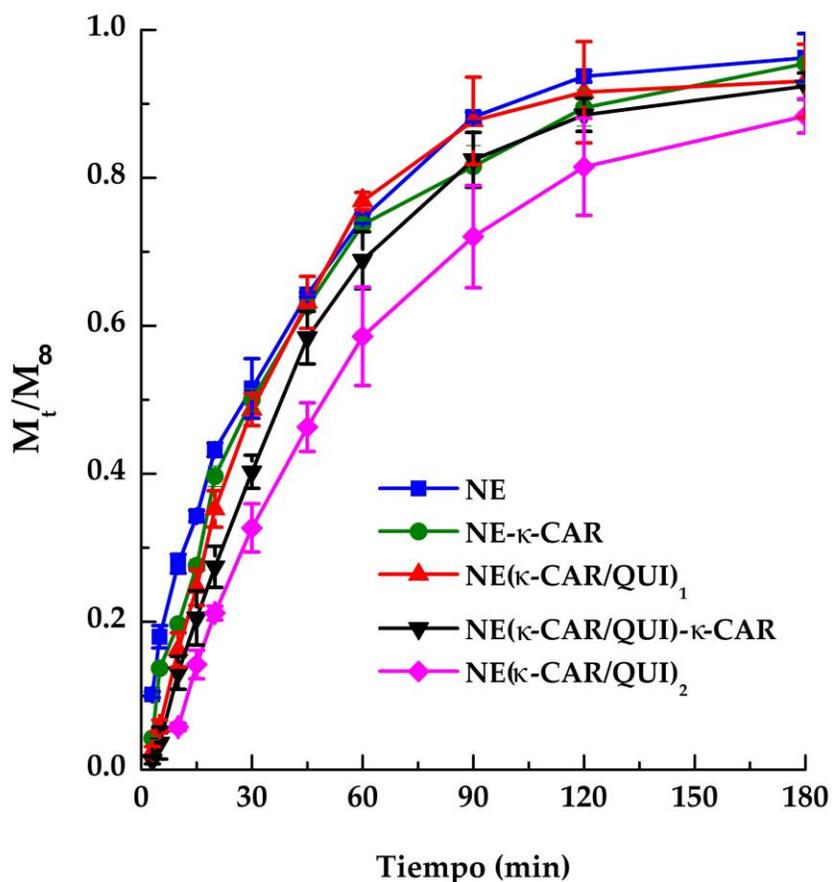


Figura 27. Perfiles de liberación de DF a pH 7.4 y 37°C a través de los diferentes sistemas de nanoemulsión (NE) y nanocápsulas con una (NE- κ -CAR), dos [$\text{NE}(\kappa\text{-CAR/QUI})_1$], tres [$\text{NE}(\kappa\text{-CAR/QUI})_1$ - κ -CAR] y cuatro [$\text{NE}(\kappa\text{-CAR/QUI})_2$] capas de PE, expresado como fracción liberada (M_t) con relación a la cantidad total liberada (M_∞). Desviación estándar indicada ($n = 3$).

La Figura 28 muestra el porcentaje de diflunisal liberado a pH 7.4 y 37°C respecto a la cantidad cargada inicialmente. Aproximadamente el 95% del DF encapsulado se liberó de la NE (Tabla 1). Por otro lado, conforme se incrementa el número de capas poliméricas en la coraza de las nanocápsulas, se observa una mayor barrera al escape del DF; así, en el caso de nanocápsulas con una (NE-κ-CAR) y dos capas poliméricas [NE(κ-CAR/CS)₁] se libera el 85 y 78% de fármaco, respectivamente; mientras que, se alcanza una liberación del 59 y 53% de diflunisal en los sistemas de nanocápsulas con tres [NE(κ-CAR/QUI)₁-κ-CAR] y cuatro capas poliméricas [NE(κ-CAR/QUI)₂], respectivamente (Tabla 1).

Cabe mencionar que, a un pH de 1.2, el DF no fue liberado de cualquiera de los sistemas, o al menos no fue detectable por análisis de espectrometría de fluorescencia. Estos resultados pudieran indicar que la liberación del DF a partir de las nanocápsulas de núcleo oleoso κ-CAR/QUI es sensible al pH, y este fármaco lipofílico podría liberarse en el medio gastrointestinal y el sistema sanguíneo en lugar de un ambiente ácido como el estómago (Natrajan *et al.*, 2015). Esto sería debido principalmente por la solubilidad del DF, que probablemente influye en la cinética de liberación, ya que este fármaco es prácticamente insoluble en condiciones acuosas (14.5 mg·L⁻¹; pKa = 2.94), y existe en su forma neutra a pH 1.2, mientras que a pH 7.4 la molécula se encuentra en su forma aniónica, presentando una mayor solubilidad.

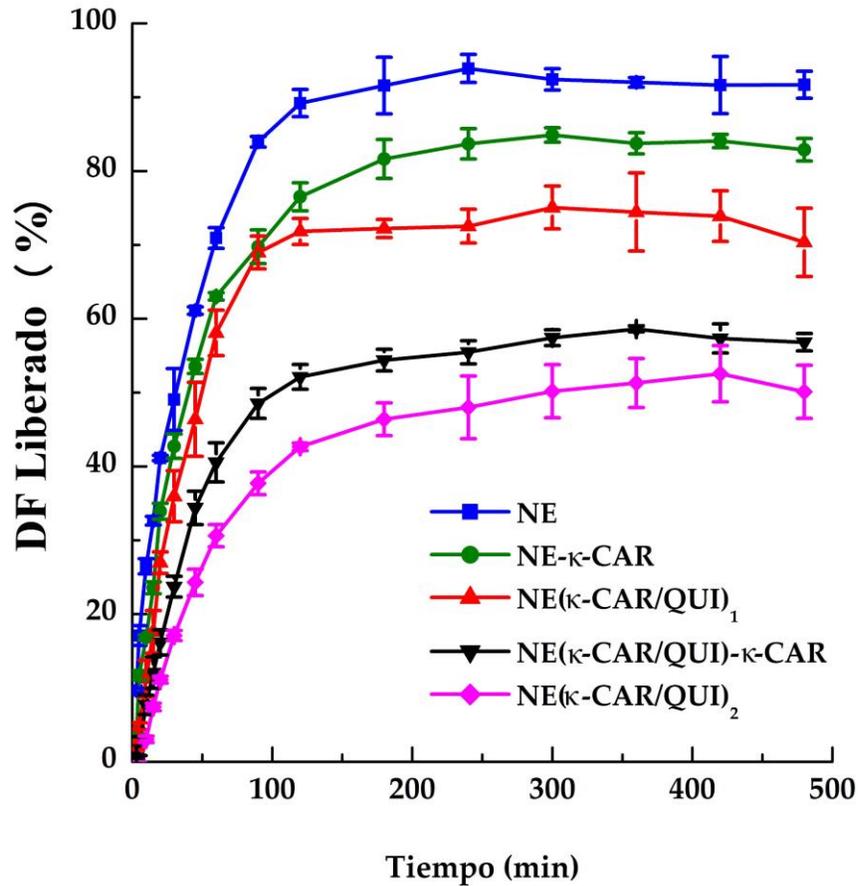


Figura 28. Perfiles de liberación de DF a pH 7.4 y 37°C a través de los diferentes sistemas de nanoemulsión (NE) y nanocápsulas con una (NE-κ-CAR), dos [NE(κ-CAR/QUI)₁], tres [NE(κ-CAR/QUI)₁-κ-CAR] y cuatro [NE(κ-CAR/QUI)₂] capas de PE, expresado como porcentaje liberado (%) con relación a la cantidad total encapsulada. Desviación estándar indicada ($n = 3$).

Tabla 1. Eficiencia de Liberación del DF a través de los sistemas de nanoemulsión y de nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x.

Sistema	% DF liberado (% \pm DV)
NE	95.2 \pm 1.2
NE- κ -CAR	84.9 \pm 1.0
NE(κ -CAR/CS) ₁	77.9 \pm 4.1
NE(κ -CAR /QUI) ₁ - κ -CAR	58.9 \pm 0.6
NE(κ -CAR/QUI) ₂	52.6 \pm 3.8

6.7.3 Mecanismo de Liberación

Con el fin de investigar el mecanismo de liberación del DF a través de las nanocápsulas, los datos experimentales fueron analizados aplicando los modelos matemáticos descritos en la sección 5.6.3. y los resultados se reportan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Los valores obtenidos del exponente de difusión n , derivados de los ajustes con el modelo Korsmeyer-Peppas, indican diferentes mecanismos de liberación entre los sistemas. Se obtuvieron, en todos los casos, buenos coeficientes de determinación.

El valor de n obtenido para el sistema de nanoemulsión fue de 0.56 ± 0.02 , lo que sugiere un mecanismo de transporte Fickiano (valor esperado alrededor de $n = 0.5$). Este resultado fue confirmado ajustando los datos cinéticos a partir de NE a la ecuación del modelo de Higuchi (2), típica de la difusión Fickiana. Como puede apreciarse en la Tabla 2, el ajuste con este modelo tiene una mejor correlación que con el modelo de primer orden y orden cero. Además, como es lógico, el valor de la constante cinética es mayor que en el

resto de los sistemas, en los que la constante va disminuyendo conforme aumenta el número de capas. En cuanto a las nanocápsulas, se obtuvieron valores de n mayores que los de NE; para NE- κ -CAR (una capa de polielectrolito) y NE(κ -CAR/QUI)₁ (dos capas de polielectrolito) los valores de n fueron 0.74 ± 0.01 y 0.89 ± 0.01 , respectivamente (Tabla 2). Estos datos cinéticos mostraron un ajuste aceptable para la ecuación del modelo cinético de primer orden (Ecuación 3), que indica un mecanismo de liberación anómalo o no Fickiano (mecanismo mixto de difusión y relajación, valores de n entre 0.5 y 1). La transición del mecanismo Fickiano (difusión simple) al no Fickiano se debe probablemente a la presencia de las capas de polielectrolito añadidas a las gotas de la nanoemulsión. La liberación del fármaco ocurre en un solo paso, sin presentarse el efecto “burst”, lo cuál podría ser indicativo que el fármaco se encuentra encapsulado, en concordancia con el valor de eficiencia de encapsulación (Santos *et al.*, 2013).

Tabla 2. Parámetros cinéticos para los sistemas de nanoemulsión y de nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x a pH 7.4 y 37°C.

Sistema	Korsmeyer-Peppas			Higuchi		First Order		Zero Order	
	$k_{KP} \times 10^2$ (min ⁻ⁿ)	n	R^2	$k_H \times 10^2$ (min ^{-0.5})	R^2	$K_I \times 10^2$ (min ⁻¹)	R^2	$K_0 \times 10^2$ (min ⁻¹)	R^2
NE	7.5 ± 0.4	0.56 ± 0.02	0.988	9.2 ± 0.1	0.980	2.6 ± 0.1	0.918	1.7 ± 0.1	0.689
NE- κ -CAR	3.8 ± 0.1	0.74 ± 0.01	0.976	8.4 ± 0.1	0.897	2.3 ± 0.1	0.988	1.6 ± 0.1	0.919
NE(κ -CAR/QUI) ₁	2.2 ± 0.1	0.89 ± 0.01	0.976	7.9 ± 0.3	0.827	2.1 ± 0.1	0.979	1.5 ± 0.1	0.973
NE(κ -CAR/QUI) ₁ - κ -CAR	1.4 ± 0.2	0.97 ± 0.02	0.988	7.1 ± 0.1	0.801	1.7 ± 0.1	0.972	1.3 ± 0.1	0.989
NE(κ -CAR/QUI) ₂	1.0 ± 0.1	0.99 ± 0.04	0.975	6.2 ± 0.5	0.765	Na	-	1.0 ± 0.1	0.979

Valores en negrita indican el modelo que mejor se ajusta después del análisis con la ecuación de Korsmeyer-Peppas; R^2 es el coeficiente de determinación, se indica la desviación estándar.

Los valores de n para los sistemas NE(κ -CAR/QUI)₁- κ -CAR (tres capas) y NE(κ -CAR/QUI)₂ (cuatro capas) se encontraron muy cercanos a 1 (ver Tabla 2), sugiriendo un mecanismo de transporte tipo Caso II en el modelo de Korsmeyer-Peppas. Como se esperaba, estos datos mostraron una mejor correlación con la Ecuación 4 del modelo de orden cero, especialmente para el sistema de tres capas. Por lo tanto, para estos dos sistemas, la velocidad de liberación del diflunisal es constante, independiente de la concentración; una propiedad que a menudo es deseada de un dispositivo de liberación controlada, ya que la liberación de formulaciones de forma constante aumenta la eficacia terapéutica y minimiza efectos tóxicos que pudieran presentarse (Bezemer *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2017). En la Tabla 2 se señala con números en negrita las mejores correlaciones de ajuste en las columnas asignadas a los modelos de Higuchi, de primer orden y de orden cero, tal como se describe en los párrafos anteriores.

Una característica interesante que observar en la Tabla 2, es que todos los valores de las constantes de liberación disminuyen conforme aumenta el número de capas poliméricas en las cápsulas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), así como una disminución sustancial de la tasa de liberación (Figura 27). El recubrimiento alterno de capas de PE puede proporcionar una red de empaquetamiento densa debido a las fuertes interacciones electrostáticas, lo que reduce la tasa de liberación del DF desde el núcleo NE al exterior (Madrigal-Carballo *et al.*, 2010).

7. CONCLUSIONES

Se sintetizaron nanocápsulas poliméricas multicapa, mediante la técnica Layer-by-Layer a base de nanogotas de emulsión y la subsecuente adsorción de dos bicapas polielectrolíticas de κ -CAR y QUI. El diámetro medio de las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)₂ presentó valores de tamaño adecuados (~ 300 nm) para interacciones con sistemas biológicos a nivel mesoscópico y, por lo tanto, para aplicaciones en el área de liberación de activos.

Se evidenció, por medio de la caracterización de la carga superficial de los sistemas mediante la técnica de Potencial Z, la adsorción consecutiva de los polielectrolitos, mediante el cambio de carga superficial de negativo a positivo después de cada capa depositada. Además, los valores de la carga en cada etapa demostraron la estabilidad de los sistemas debido a las fuertes fuerzas de repulsión electrostáticas entre ellos (valores de potencial- ζ menores a -30 mV y mayores a +30 mV, fuera de la zona metaestable).

La morfología tanto de la nanoemulsión como de las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)_x fue observada por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), observándose partículas de menor tamaño en comparación con el diámetro promedio hidrodinámico obtenido mediante el análisis DLS de los sistemas en diferente estado.

Por otro lado, los análisis FTIR y XEDS demostraron la presencia tanto de elementos así como de grupos funcionales característicos de los polímeros κ -carragenina y quitosana en las nanocápsulas multicapa NE(κ -CAR/QUI)_x.

La presencia de un núcleo de aceite líquido es beneficiosa en términos de una mayor eficiencia de encapsulación en el caso de sustancias hidrófobas como el diflunisal (más del 70%). Además, dependiendo del número de capas depositadas, el mecanismo de liberación del DF varía, logrando una liberación de orden cero del diflunisal desde las nanocápsulas NE(κ -CAR/QUI)₁- κ -CAR (tres capas de PE) y NE(κ -CAR/QUI)₂ (cuatro capas de PE). De manera general, las nanocápsulas poliméricas cargadas con DF exhibieron mejores

propiedades de liberación que la NE por sí sola durante los estudios de liberación acumulativa a pH 7.4. Estas propiedades podrían ser extremadamente útiles para incorporar sustancias lipofílicas en la industria alimentaria, agrícola o farmacéutica.

8. TRABAJO FUTURO

- Evaluar la estabilidad de las NC's por medio de mediciones de tamaño y potencial-Z a diferentes tiempos, temperaturas y ambientes fisiológicos.
- Determinar la toxicidad de los sistemas a través de ensayos con cultivos celulares para comprobar su biocompatibilidad en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas.
- Probar el encapsulamiento simultáneo de compuestos hidrofóbicos en el núcleo de la emulsión y sustancias hidrofílicas entre las capas de PE.
- Evaluar la liberación *in vitro* utilizando un sistema gastrointestinal artificial en presencia de cultivo celular para determinar la biodisponibilidad de los compuestos activos desde las nanoestructuras.

9. REFERENCIAS

- Abbas S., Karangwa E., Bashari M., Hayat K., Hong X., Sharif H. R. and Zhang X. 2015. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. *Ultrason. Sonochem.* 23; 81–92.
- Acharya S. and Sahoo S. K. 2011. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63; 170–183.
- Arhewoh M.I. and Okhamafe O.A. 2004. An overview of site-specific delivery of orally administered proteins/peptides and modelling considerations. *Journal of Biomedical Sciences.* 3(1); 720.
- Babič M., Horák D., Jendelová P., Glogarová K., Herynek V., Trchová M., Likavčanová K., Lesný P., Pollert E. and Hájek M. 2009. Poly(N,N-dimethylacrylamide)-Coated Maghemite Nanoparticles for Stem Cell Labeling. *Bioconjug. Chem.* 20; 283–294.
- Bazylińska U., Skrzela R., Szczepanowicz K., Warszyński P. and Wilk K. A. 2011. Novel approach to long sustained multilayer nanocapsules: influence of surfactant head groups and polyelectrolyte layer number on the release of hydrophobic compounds. *Soft Matter* 7; 6113-6124.
- Bazylińska U., Skrzela R., Piotrowski M., Szczepanowicz K., Warszyński P. and Wilk K. A. 2012. Influence of dicephalic ionic surfactant interactions with oppositely charged polyelectrolyte upon the in vitro dye release from oil core nanocapsules. *Bioelectrochemistry* 87; 147–153.
- Bechard S. and McMullen J. N. 1986. Diffusional release of a solute from a porous polymeric matrix. *Int J Pharm* 32; 71–77.
- Bezemer, J.M.; Radersma, R.; Grijpma, D.W.; Dijkstra, P.J.; Feijen, J. and Van Blitterswijk, C.A. 2000. Zero-order release of lysozyme from poly(ethylene glycol)/poly(butylene terephthalate) matrices. *J. Control. Release* 64; 179–192.
- Bottari E., Festa M.R. and Gentile L. 2014. A Study on Diflunisal: Solubility, Acid Constants and Complex Formation with Calcium (II) and Magnesium (II). *J Solution Chem* 43; 255–268.

- Brittain H. G., Elder B.J., Isbester P. K. and Salerno A.H. 2005. Solid-State Fluorescence Studies of Some Polymorphs of Diflunisal. *Pharmaceutical Research* 22(6); 999-1006.
- Brophy M. R. and Deasy P. B. 1987. Application of the Higuchi model for drug release from dispersed matrices to particles of general shape. *International Journal of Pharmaceutics* 31; 41-41.
- Buchmann S. 2001. "Main Cosmetic Vehicles," in Handbook of Cosmetic Science and Technology, A.O. Barel, M. Paye, H.I. Maibach, Eds. (Marcel Dekker, New York).
- Calvo P., Remuñan-Lopez C., Vila-Jato J.L. & Alonso M.J. 1997. *Colloid Polym. Sci.* 275; 46-53.
- Carneiro T. N., Novaes D. S., Rabelo R. B., Celebi B., Chevallier P., Mantovani D., Beppu M. M., Vieira R. S. 2013. BSA and Fibrinogen Adsorption on Chitosan/k-Carrageenan Polyelectrolyte Complexes *Macromolecular Bioscience* 13; 1072-1083.
- Cartensen J.T. 1996. Modeling and data treatment in the pharmaceutical sciences, Ed., Technomic Publishing Co. Inc., New York, Basel.
- Chopra M., Kaur P., Bernela M. and Thakur R. 2014. Surfactant assisted nisin loaded chitosan-carrageenan nanocapsule synthesis for controlling food pathogens. *Food Control* 37; 158-164.
- Costa P. and Lobo J. M. S. 2001. Modelling and Comparison of Dissolution Profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13; 123-133.
- Dash S., Murthy P.N. Nath L. and Chowdhury P. 2010. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm.* 67(3); 217-23.
- Decher G. and Hong J.D. 1991. Buildup of Ultrathin Multilayer films by a self-assembly Process. 2. Consecutive assembly of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces, Berich. Der Bunsen-Gesell. – Phys. Chem. Chem. Phys. 95; 1430-1434.
- Dhoot N. O., & Wheatley, M. A. 2003. Microencapsulated liposomes in controlled drug delivery: Strategies to modulate drug release and eliminate the burst effect. *Journal of Pharmaceutical Science* 92; 679-689.

- Dobrynina A.V. and Rubinstein M. 2005. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Prog. Polym. Sci.* 30;1049-1118.
- Donath E., Walther D., Shilov V. N., Knippel E., Budde A., Lowack K., Helm C. A. and Möhwald H. 1997. Nonlinear Hairy Layer Theory of Electrophoretic Fingerprinting Applied to Consecutive Layer by Layer Polyelectrolyte Adsorption onto Charged Polystyrene Latex Particles. *Langmuir* 13; 5294-5305.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4); 1173–1182.
- Elizarova and Luckham. 2016. Fabrication of polyelectrolyte multilayered nano-capsules using a continuous layer-by-layer approach. *Journal of Colloid and Interface Science* 470; 92-99.
- Elizarova I.S. and Luckham P.F. 2016. Fabrication of polyelectrolyte multilayered nano-capsules using a continuous layer-by-layer approach. *J. Colloid Interface Sci.* 470; 92–99.
- Grenha A., Gomes M. E., Rodrigues M., Santo V. E., Mano J. F., Neves N. M. and Reis R. L. 2009. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 1-8.
- Hamilton J. A. 1989. Interactions of Triglycerides with Phospholipids: Incorporation into the Bilayer Structure and Formation of Emulsions. *Biochemistry* 28; 2514–2520.
- Iler R. K. 1966. Multilayers of colloidal particles. *Journal of colloid and interface science* 21; 569-594.
- Iwanaga, K., Ono, S., Narioka, K., Kakemi, M., Morimoto, K., Yamashita, S., Namba, Y., & Oku, N. 1999. Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. *Journal Pharmaceutical Science* 88; 248–255.
- Kakran M. and Antipina M.N. 2014. Emulsion-based techniques for encapsulation in biomedicine, food and personal care. *Current Opinion in Pharmacology* 18; 47–55.
- Kim B. S. and Choi J. W. 2007. Polyelectrolyte multilayer microcapsules: Self-assembly and toward biomedical applications. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12; 323–332.

- Kittitheeranun P., Sajomsang W., Phanpee S., Treetong A., Wutikhun T., Suktham K., Puttipipatkachorn S. and Ruktanonchai U.R. 2015. Layer-by-layer engineered nanocapsules of curcumin with improved cell activity. *Int. J. Pharm.* 492; 92–102.
- Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P. and Peppas N.A. 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics.* 15(1); 25-35.
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczynski, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thoming, J. and Stepnowski, P. 2010. *Mar. Drugs.* 8; 1567.
- Kwak, J. C. T. 1998. ed., *Polymer-Surfactant Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Landry J. M., Marangoni D. G., Arden D. A., MacLennan I. J. and Kwak J. C. T. 2009. *J. Surfactants Deterg.* 12, 155–164.
- Li X., Zhang J., Hu Q. and Li X. 2011. From the 2-dimensional unstable polyelectrolyte multilayer to the 3-dimensional stable dry polyelectrolyte capsules. *Journal of Colloid and Interface Science.* 363(1); 64–72.
- Liu Y., Yang J., Zhao Z., Li J., Zhang R. and Yao F. 2012. Formation and characterization of natural polysaccharide hollow nanocapsules via template layer-by-layer self-assembly. *Journal of Colloid and Interface Science* 379; 130–140.
- Lima P. H.L., Pereira S. V.A., Rabello R. B., Rodriguez-Castellón E., Beppu M. M., Chevallier P., Mantovani D. and Vieira R. S. 2013. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 111; 719–725.
- López-Montilla J.C., Herrera-Morales P.E., Pandey S. & Shah D.O. 2002. *J. Dispersion Sci. Tehnol.* 23; 219–268.
- Lucio D., Zornoza A., Martínez-Ohárriz M.C. 2014. Influence of chitosan and carboxymethylchitosan on the polymorphism and solubilisation of diflunisal. *International Journal of Pharmaceutics* 467; 19–26.
- Lulevich V. V., Radtchenko I. L., Sukhorukov G. B., & Vinogradova O. I. 2003. Deformation properties of nonadhesive polyelectrolyte microcapsules studied with the atomic force microscope. *Journal of Physical Chemistry B* 107; 2735–2740.
- Machín R., Isasi J. R. and Vélaz, I. 2012. Cyclodextrin hydrogels as potential drug delivery systems. *Carbohydr. Polym.* 87; 2024–2030.

- Machín R., Isasi J. R. and Vélaz, I. 2013. Hydrogel matrices containing single and mixed natural cyclodextrins. Mechanisms of drug release. *Eur. Polym. J.* 49; 3912–3920.
- Madrigal-Carballo S., Lim S., Rodriguez G., Vila A. O., Krueger C. G., Gunasekaran S., Reed J. D. 2010. Biopolymer coating of soybean lecithin liposomes via layer-by-layer self-assembly as novel delivery system for ellagic acid. *Journal of functional foods* 2 (2010) 99–106.
- Mehrban, N., Hunt, N., Smith, A.M. and Grover, L.M. 2010. *Gums Stabilisers Food Ind.* 15; 407.
- Mehta, S. K., Bhasin, K. K., Chauhan, R. and Dham, S. 2005. *Colloids Surf., A*, 255; 153–157.
- Mora-Huertas, C.E., Fessi, H. and Elaissari, A. 2010. *Int. J. Pharm.* 385; 113.
- Najib N. and Suleiman M. S. 1985. The kinetics of drug release from ethylcellulose solid dispersions. *DRUG Dev. Ind. Pharm.* 11; 2169–2181.
- Natrajan D., Srinivasan S., Sundar K. and Ravindran A. 2015. Formulation of essential oil-loaded chitosan-alginate nanocapsules. *J. Food Drug Anal.* 23; 560–568.
- Oliveira L. T., de Paula M. A., Roatt B. M., Garcia G. M., Silva L. S. B., Reis A. B., de Paula C. S., Vilela J. M. C., Andrade M. S., Pound-Lana G. and Mosqueira V. C. F. 2017. Impact of dose and surface features on plasmatic and liver concentrations of biodegradable polymeric nanocapsules. *Eur. J. Pharm. Sci.* 105; 19–32.
- Özcan A. S. and Gök Ö. 2012. Structural characterization of dodecyltrimethylammonium (DTMA) bromide modified sepiolite and its adsorption isotherm studies. *Journal of Molecular Structure* 1007; 36–44.
- Ozturk S.S., Palsson B.O., Donohoe B. and Dressman J.B. 1988. Kinetics of release from enteric-coated tablets. *Pharmaceutical Research.* 5(9); 550-65.
- Paul D. R. 2011. Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 418; 13–17.
- Pereira L., Amado A. M., Critchley A. T., Velde F. v. d. and Ribeiro-Claro P. J. A. 2009. *Food Hydrocolloids* 23; 1903–1909.
- Piculell L. 2006. Food Polysaccharides and Their Applications, Taylor & Francis Group, LLC, New York. 239–288.

- Preetz C., Rube A., Reiche I., Hause G. and Mäder K. 2008. Preparation and characterization of biocompatible oil-loaded polyelectrolyte nanocapsules. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 4; 106–114.
- Ramos-Cabrer P. and Campos F. 2013. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. *International Journal of Nanomedicine* 8; 951–960.
- Ritger P. L. and Peppas N. A. 1987. A simple equation for description of solute release II. *J. Control. Release* 5; 23–36.
- Rivera M. C., Pinheiro A. C., Bourbon A. I., Cerqueira M. A. and Vicente A. A. 2015. Hollow chitosan/alginate nanocapsules for bioactive compound delivery. *Int. J. Biol. Macromol* 79: 95–102.
- Robinson J.R. and Lee V.H.L. 1987. Controlled drug delivery. Eds., Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.
- Rodrigues S., Rosa da Costa A.M., Grenha A. 2012. Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate Polymers* 89; 282–289.
- Rommel B. V. da Silva, A. B. F. and Pimentel, A. S. 2012. Infrared Spectroscopy of Anionic, Cationic, and Zwitterionic Surfactants. *Advances in Physical Chemistry* 2012; 14.
- Rosas-Durazo A., Hernández J., Lizardi J., Higuera-Ciapara I., Goycoolea F. M. and Argüelles-Monal W. 2011a. Gelation processes in the non-stoichiometric polyelectrolyte–surfactant complex between κ -carrageenan and dodecyltrimethylammonium chloride in KCl. *Soft Matter* 7; 2103.
- Rosas-Durazo A., Lizardi J., Higuera-Ciapara I., Argüelles-Monal W. and Goycoolea F. M. 2011b. Development and characterization of nanocapsules comprising dodecyltrimethylammonium chloride and κ -carrageenan. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 86(1);242–246.
- Sankalia M.G., Mashru R.C., Sankalia J.M. and Sutariya V.B. 2006. Stability improvement of alpha-amylase entrapped in kappa-carrageenan beads: Physicochemical characterization and optimization using composite index. *Int. J. Pharm.* 312; 1–14.

- Santos, S.S.; Lorenzoni, A.; Ferreira, L.M.; Mattiazzi, J.; Adams, A.I.H.; Denardi, L.B.; Alves, S.H.; Schaffazick, S.R.; Cruz, L. 2013. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and *in vitro* evaluation of antifungal activity against *Candida* species. *Mater. Sci. Eng. C* 33; 1389–1394.
- Shchukina E. M. and Shchukin D. G. 2012. Layer-by-layer coated emulsion microparticles as storage and delivery tool. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 17; 281–289.
- Schnittger S. and Sinha, M. 2007. The Materials Science of Cosmetics. MRS BULLETIN (VOLUME 32). Pp. 760-769.
- Shu S., Sun L., Zhang X., Wu Z., Wang Z. and Li C. 2011. Polysaccharides-based polyelectrolyte nanoparticles as protein drugs delivery system. *J. Nanoparticle Res.* 13; 3657–3670.
- Sukhorukov G. B., Donath E., Lichtenfeld H., Knippel E., Knippel M., Budde A. and Möhwald H. 1998. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids and Surfaces A.* 137; 253-266.
- Szczepanowicz K., Bazylińska U., Pietkiewicz J., Szyk-Warszyńska, L., Wilk K. A. and Warszyński P. 2015. Biocompatible long-sustained release oil-core polyelectrolyte nanocarriers: From controlling physical state and stability to biological impact. *Adv. Colloid Interface Sci.* 222; 678–691.
- Vachoud L., Zydowicz N. and Domard A. 2000. *Carbohydr. Res.* 326; 295.
- Velde F. v. d., Pereira L. and Rollema H. S. 2004. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydrate Research* 339; 2309–2313.
- Vlachos N., Skopelitis Y., Psaroudaki M., Konstantinidou V., Chatzilazarou A. and Tegou E. 2006. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta* 573–574; 459–465.
- Volery P., Besson R. and Schaffer-Lequart C. 2004. *J. Agric. Food Chem.* 52; 7457–7463.
- Tay A., Singh R.K., Krisshnan S.S. & Gore J.P. 2002. Authentication of olive oil adulterated with vegetable oils using Fourier transform infrared spectroscopy. *Lebensm–Wiss UTechnol.* 35; 99-103.

- Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, D. B., & Weiss, J. 2005. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45; 587–605.
- Wang A.H., Tao C., Cui Y., Duan L., Yang Y., and Li J.B. 2009. *J. Colloid Interface Sci.* 332; 271.
- Wang T., Turhan M. and Gunasekaran S. 2004. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol)hydrogel. *Polym Int* 53; 911–918.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. 2011. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids* 25(2); 170–179.
- Ye S., Wang C., Liu X. & Tong Z. 2005. Multilayer nanocapsules of polysaccharide chitosan and alginate through layer-by-layer assembly directly on PS nanoparticles for release, *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition* 16(7); 909-923.
- Zhao, Y.N.; Xu, X.; Wen, N.; Song, R.; Meng, Q.; Guan, Y.; Cheng, S.; Cao, D.; Dong, Y.; Qie, J.; *et al.* 2017. A Drug Carrier for Sustained Zero-Order Release of Peptide Therapeutics. *Sci. Rep.* 7; 1–9.

10. PRODUCTOS

Ponencia

- Rochín Wong C. S., Maldonado Arce A. D., Zavala Rivera P., Rosas Durazo A., Tánori Córdova J. C. Vélaz Rivas I. **Síntesis y caracterización de nanocápsulas layer-by-layer de κ -carragenina/quitosana con uso potencial en la liberación de activos.** Programa de Seminarios para la Formación Continua en Investigación. 12 de enero de 2017. Pamplona, España.

Carteles

- Rochín Wong C. S., Maldonado Arce A. D., Zavala Rivera P., Rosas Durazo A., Tánori Córdova J. C. **Preparation and characterization of κ -carrageenan/chitosan nanocapsules via Layer-by-layer for release of bioactive compounds.** XXV International Materials Research Congress, del 14 al 19 de Agosto del 2016. Cancun, México.
- Rochín Wong C. S., Tánori Córdova J. C., Zavala Rivera P., Maldonado Arce A. D., Rosas Durazo A. **Síntesis y caracterización de nanocápsulas de κ -carragenina para su potencial aplicación como modelo de liberación controlada de bioactivos.** XI Coloquio Bienal en Ciencias de Materiales, del 11 al 13 de Marzo del 2015. Hermosillo, Sonora, México.
- Rochín-Wong C.S., Maldonado-Arce A.D., Zavala-Rivera P., Rosas-Durazo A., Tánori-Córdova J.C. **“Biocompatible multilayer emulsions via layer-by-layer self-assembly for release”.** XXII Reunión Universitaria de Investigación en Materiales, del 22 al 24 de noviembre de 2017. Hermosillo, Sonora, México.

Estancia

- Estancia de Investigación Científica “**Evaluación de la eficiencia de encapsulación y liberación del antiinflamatorio no esteroideo diflunisal a través de nanocápsulas coloidales**”. Universidad de Navarra del 01 de octubre de 2016 al 31 de marzo del 2017. Pamplona, España.

Artículo Científico

- Rochín-Wong, S.; Rosas-Durazo, A.; Zavala-Rivera, P.; Maldonado, A.; Martínez-Barbosa, M.E.; Vélaz, I.; Tánori, J. **Drug Release Properties of Diflunisal from Layer-By-Layer Self-Assembled κ -Carrageenan/Chitosan Nanocapsules: Effect of Deposited Layers.** *Polymers* 2018, 10, 760.

Adhesiones

- Integrante de la Red Temática de CONACyT de **Nanociencias y Nanotecnología**.
- Integrante de la Red Temática de CONACyT de **La Materia Condensada Blanda**.

11. APÉNDICES

Apéndice 1

Caracterización de los polímeros por Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H RMN)

Espectros ^1H RMN se registraron en un espectrómetro Bruker que funciona a 400 MHz. Fueron adquiridos 16 scans con tiempo de relajación de 1 s, 8223.685 Hz de anchura espectral, con un pulso de 6 μs y la temperatura de trabajo fue de 20 $^{\circ}\text{C}$. Todos los espectros se registraron en D_2O con excepción de QUI que se realizó en cloruro de deuterio (DCl). El desplazamiento químico δ se dio en ppm y las asignaciones de los espectros de ^1H RMN se basaron en datos de literatura.

En la Figura A1, se puede observar los desplazamientos químicos (ppm) de ^1H RMN de κ - CAR. Generalmente, en la región entre 5.0 y 5.5 ppm, se presentan los desplazamientos correspondientes a los protones anoméricos de las unidades 3,6 anhidrogalactosa de las carrageninas. Alrededor de los 5.074 ppm es la señal característica de β -carragenina, mientras que κ -carragenina presenta una señal a los 5.093 ppm. El desplazamiento a 5.292 ppm indica presencia de ι -carragenina.

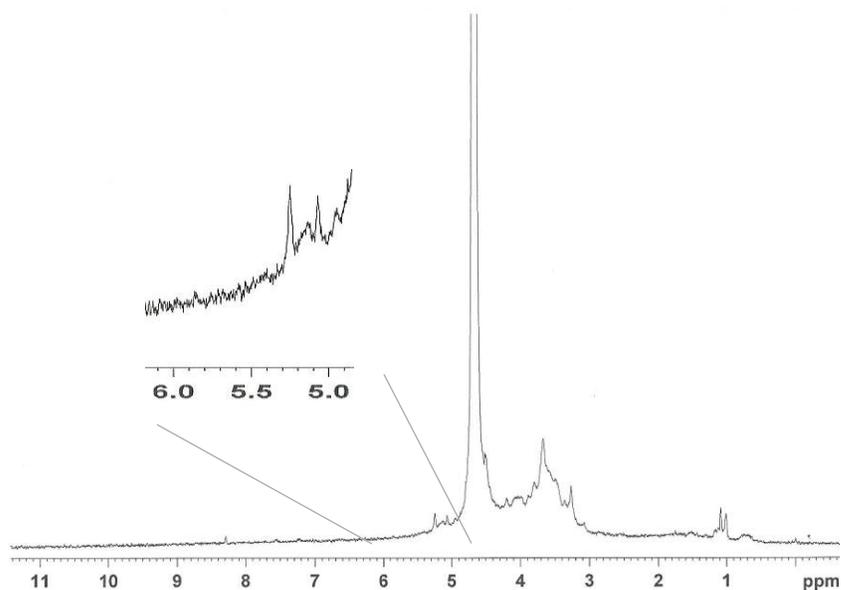


Figura A1. Espectro ^1H RMN de κ - carragenina.

El espectro de ^1H RMN de QUI se muestra en la Figura A2. La asignación correspondiente a los protones del carbono anomérico (H1) se localiza entre $\delta = 4.5\text{-}4.8$ ppm, mientras que los protones de los anillos (H2-H6 de la acetilglucosamina y H3-H6 glucosamina) se encuentran en la región $\delta = 3.4\text{-}4.0$ ppm. A $\delta = 3.0\text{-}3.2$ ppm se encuentra la señal de los protones característicos de la glucosamina (H2). Por su parte los protones correspondientes a la acetilglucosamina (NHCOCH_3) se localizan a $\delta = 1.95\text{-}2.1$ ppm (Piculell 2006).

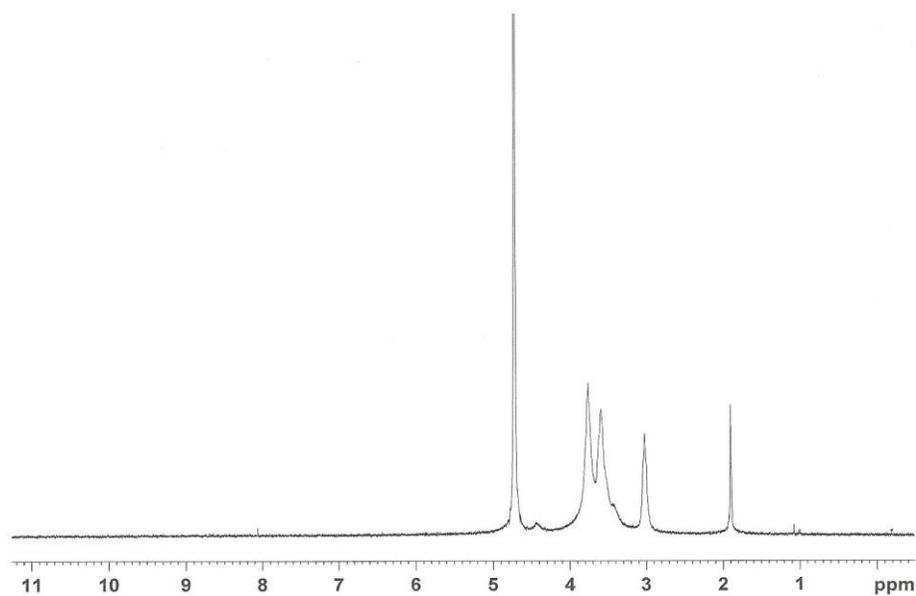


Figura A2. Espectro ^1H RMN de quitosana.

Article

Drug Release Properties of Diflunisal from Layer-By-Layer Self-Assembled κ -Carrageenan/Chitosan Nanocapsules: Effect of Deposited Layers

Sarai Rochín-Wong ¹, Aarón Rosas-Durazo ², Paul Zavala-Rivera ³ , Amir Maldonado ⁴,
María Elisa Martínez-Barbosa ¹ , Itziar Vélaz ^{5,*}  and Judith Tánori ^{1,*}

¹ Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Hermosillo 83000, Sonora, Mexico; sarai.rochin@unison.mx (S.R.-W.); memartinez@polimeros.uson.mx (M.E.M.-B.)

² Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V., 83210 Hermosillo, Sonora, Mexico; aaron.rosas@rubio-pharma.com

³ Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo 83000, Sonora, Mexico; paul.zavala@unison.mx

⁴ Departamento de Física, Universidad de Sonora, Hermosillo 83000, Sonora, Mexico; maldona@guaymas.uson.mx

⁵ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra, 31080 Pamplona, Navarra, Spain

* Correspondence: itzvelaz@unav.es (I.V.); jtanori@unison.mx (J.T.); Tel.: +34-948-425600 (I.V.); +52-662-2592161 (J.T.)

Received: 29 May 2018; Accepted: 7 July 2018; Published: 10 July 2018



Abstract: Engineering of multifunctional drug nanocarriers combining stability and good release properties remains a great challenge. In this work, natural polymers κ -carrageenan (κ -CAR) and chitosan (CS) were deposited onto olive oil nanoemulsion droplets (NE) via layer-by-layer (LbL) self-assembly to study the release mechanisms of the anti-inflammatory diflunisal (DF) as a lipophilic drug model. The nano-systems were characterized by dynamic light scattering (DLS), zeta potential (ζ -potential) measurements, transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), X-ray energy dispersive spectroscopy (XEDS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to confirm the NE-coating with polymer layers. In addition, kinetic release studies of DF were developed by the dialysis diffusion bag technique. Mathematical models were applied to investigate the release mechanisms. The results showed that stable and suitably sized nanocapsules (~300 nm) were formed. Also, the consecutive adsorption of polyelectrolytes by charge reversal was evidenced. More interestingly, the drug release mechanism varied depending on the number of layers deposited. The nanosized systems containing up to two layers showed anomalous transport and first order kinetics. Formulations with three and four layers exhibited Case II transport releasing diflunisal with zero order kinetics. Hence, our results suggest that these polyelectrolyte nanocapsules have great potential as a multifunctional nanocarrier for drug delivery applications.

Keywords: polyelectrolyte; kinetic models; chitosan; carrageenan; layer-by-layer; self-assembly; diflunisal; release mechanisms; nanoemulsion

1. Introduction

In recent years, interest in the field of active compounds release has increased. The result has been the development of innovative drug nanocarriers to enhance drug bioavailability, protect the molecules from the biological environment, and provide sustained release. This has great potential for multi-compartmental delivery devices [1]. Among the materials that have been proposed, biopolymer