



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

Encapsulación con alginato en industria farmacéutica: técnicas  
y aplicaciones

Trabajo Monográfico de Actualización

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Brenda Sánchez Montoya

DIRECTOR DE TESIS

M. EN F. MARÍA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Introducción</b> .....	1
<b>Objetivo general</b> .....	3
<b>Capítulo I</b> .....	4
<b>1. Generalidades de Encapsulación</b> .....	4
1.1. <i>Antecedentes</i> .....	4
1.2. <i>Microencapsulación</i> .....	5
1.2.1. Elementos esenciales de los sistemas encapsulados.....	5
1.3. <i>Material de recubrimiento</i> .....	7
1.3.1. Características de los materiales utilizados en la encapsulación .....	7
1.3.3. Materiales de encapsulación .....	9
<b>2. Biopolímeros</b> .....	10
2.1 <i>Biopolímeros utilizados en la encapsulación</i> .....	10
2.2. <i>Gomas</i> .....	11
2.2.1. Gelano y goma de xantana .....	11
2.2.2. Goma arábica .....	12
2.2.3. Carragenina.....	13
2.3. <i>Gelatina</i> .....	14
2.4. <i>Quitosano</i> .....	16
2.5. <i>Almidón</i> .....	17
2.6. <i>Alginatos</i> .....	19
<b>Capítulo II</b> .....	20
<b>3. Alginato</b> .....	20
3.1. <i>Estructura, obtención y propiedades características</i> .....	20
3.1.1. Propiedades fisicoquímicas .....	22
3.1.2. Propiedades biológicas.....	24
3.2. <i>Reticulación del alginato</i> .....	24
3.2.1. Reticulación iónica .....	26
3.2.2. Otros métodos de reticulación .....	29

<b>Capítulo III</b> .....	31
<b>4. Técnicas de encapsulación con alginato</b> .....	31
4.1. <i>Procesos químicos</i> .....	32
4.1.1. Conservación .....	32
4.1.2. Polimerización interfacial.....	33
4.1.3. Atrapamiento en liposomas. ....	33
4.1.4. Inclusión molecular. ....	34
4.1.5. Emulsión .....	34
4.2. <i>Procesos mecánicos</i> .....	37
4.2.1. Extrusión .....	37
4.2.2. Secado por atomización .....	38
4.2.3. Aspersión por congelamiento o por enfriamiento. ....	40
<b>Capítulo IV</b> .....	42
<b>5. Mecanismos de liberación</b> .....	42
5.1. <i>Liberación por difusión</i> .....	42
5.2. <i>Liberación por degradación o erosión</i> .....	43
5.3. <i>Liberación por hinchamiento</i> .....	44
<b>6. Sistemas de liberación de fármacos</b> .....	45
6.1. <i>Sistemas convencionales</i> .....	45
6.2. <i>Sistemas no convencionales</i> .....	46
6.2.1. <i>Liberación modificada</i> .....	47
6.2.1.1. Liberación retardada .....	47
6.2.1.2. Liberación extendida, prolongada o sostenida.....	48
6.3. <i>Sistemas de velocidad preprogramada</i> .....	48
6.3.1. Sistemas reservorios .....	48
6.3.2. Sistemas matriciales.....	48
6.3.2.1. Matrices inertes .....	49
6.3.2.2. Matrices hinchables .....	49
6.3.2.3. Matrices erosionables .....	49
6.4. <i>Sistemas modulados por activación</i> .....	50
6.5. <i>Sistemas vectorizados</i> .....	50
6.5.1. Vehículos y acarreadores. ....	51
<b>Capítulo V</b> .....	56
<b>7. Aplicaciones del alginato en la administración de fármacos</b> .....	56

7.1. <i>Microcápsulas de alginato</i> .....	56
7.2. <i>Microcápsulas de alginato recubiertas con polímeros policatiónicos</i> .....	58
7.3. <i>Micropartículas de Alginato y polímeros policatiónicos</i> .....	61
7.3.1. Encapsulación de proteínas .....	63
7.3.1.1. Cápsulas insulina .....	64
7.4. <i>Micropartículas de alginato- polímeros policatiónicos recubiertas</i> .....	66
7.5. <i>Otros sistemas</i> .....	66
7.5.1. <i>Micropartículas de alginato recubiertas de CaCO<sub>3</sub></i> .....	66
7.5.2. Encapsulación de ADN.....	67
7.5.3. Encapsulación de bacterias.....	68
7.6. <i>Nanopartículas de alginato</i> .....	72
7.6.1. Receptor folato.....	77
<b>Discusión</b> .....	80
<b>Conclusión</b> .....	83
<b>Referencias</b> .....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferentes tipos de micropartículas y liposomas .....	6
<b>Figura 2.</b> Gelana. Estructura química de sus cuatro monómeros.....	11
<b>Figura 3.</b> Goma arábiga, exudado natural de los árboles de Acacia Senegal .....	13
<b>Figura 4.</b> Carragenina tipo kappa .....	14
<b>Figura 5.</b> Estructura química del monómero de quitosano .....	16
<b>Figura 6.</b> Estructura química de los monómeros del almidón.....	18
<b>Figura 7.</b> Características estructurales del alginato: a) Monómeros, b) Cadena, c) Fracciones o bloques.....	20
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo de las especies del genero Laminaria .....	21
<b>Figura 9.</b> Esquema de los parámetros que controlan la cinética y las propiedades de los hidrogeles de alginato .....	25
<b>Figura 10.</b> Gráfico de la fuerza del gel (E) en función del contenido en bloques G .....	26
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática del modelo "Egg-box" con cationes calcio.....	27
<b>Figura 12.</b> Representación de dos ejemplos de reticulación iónica: a) Gelificación externa: Solución de CaCl <sub>2</sub> y b) Gelificación interna: Solución de CaCO <sub>3</sub> .....	28
<b>Figura 13.</b> Esquema de las diferentes técnicas de microencapsulación .....	31
<b>Figura 14.</b> Técnica de coacervación.....	32

<b>Figura 15.</b> Mecanismos de gelificación iónica. ....	35
<b>Figura 16.</b> Técnica de microencapsulación en emulsión .....	36
<b>Figura 17.</b> Tipos de dispositivos extrusores. A) Atomizador con corte sistemático del chorro. B) Boquilla vibratoria. C) Disco atomizador. D) Flujo de aire coaxial. E) Potencial electroestático .....	38
<b>Figura 18.</b> Sistema de encapsulación por atomización .....	40
<b>Figura 19.</b> Esquema de mecanismos de degradación/erosión en cápsulas.....	43
<b>Figura 20.</b> Esquema del mecanismo de liberación por hinchamiento.....	44
<b>Figura 21.</b> Perfil de concentración hipotética de fármaco con liberación inmediata con terapia multidosis .....	46
<b>Figura 22.</b> Perfiles de concentración plasmática. A) Forma convencional, B) Acción retardada) Acción repetida, D) Acción prolongada, E) Acción sostenida. ....	47
<b>Figura 23.</b> Esquema comparativo de un sistema matricial o reservorio. ....	49
<b>Figura 24.</b> Tipos de sistemas de liberación controlada.....	50
<b>Figura 25.</b> Microcápsulas de alginato poli- L-lisina alginato de 100 µm de diámetro. Fotografía de microscopía óptica.....	52
<b>Figura 26.</b> Representación esquemática de los diferentes tipos de sistemas de administración de fármacos liposómicos. ....	54
<b>Figura 27.</b> Representación esquemática de la estructura e interacción de las nanopartículas cargadas de quitosano con la capa de moco. ....	57
<b>Figura 28.</b> Micropartículas alginato cargadas de isoniazida obtenidas por un método de emulsión simple. ....	58
<b>Figura 29.</b> Perfil de supervivencia animal durante 17 semanas. ....	59
<b>Figura 30.</b> Tinción con tejido de hematoxilina y eosina de pólipos de ratones en el intestino delgado, colon y ciego para el control y grupos de tratamiento de oxaliplatino.....	60
<b>Figura 31.</b> Microscopía confocal de escaneo láser de micropartículas de quitosano-Ca-alginato cargadas con ácido 5-aminosalicílico. ....	61
<b>Figura 32.</b> Esquema de la eficacia de las MP de alginato/pectina cargadas de fármaco mejorando la absorción del fármaco a través del epitelio intestinal, aumentando así el fármaco disponible para la absorción.....	63
<b>Figura 33.</b> Concentración sérica de glucosa después de la administración oral de microesferas de ALG-quitosano sin insulina y cargadas con insulina (100 UI / kg) a ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina. ....	65
<b>Figura 34.</b> Morfología de los colidosomas (a) SEM y (b) microscopía de escaneo láser confocal; Las micropartículas de CaCO <sub>3</sub> se modificaron con isotiocianato de rodamina para la visualización de fluorescencia roja.....	67
<b>Figura 35.</b> Evaluación de dosis-respuesta que muestra el porcentaje de células positivas para GFP entre diversos órganos de ratones 24 h después de la administración de dosis de 50 µg, 100 µg y 150 µg. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.....	68

<b>Figura 36.</b> Microcápsulas de alginato que contienen bacterias <i>L. acidophilus</i> señaladas con flechas blancas examinadas por microscopia óptica. ....	69
<b>Figura 37.</b> (A) Fibroblastos inmovilizados en el interior de microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato. Aumentos de X10 y X4. (B) Producción de VEGF de los fibroblastos microencapsulados .....	71
<b>Figura 38.</b> Aislamiento inmunológico por encapsulación .....	72
<b>Figura 39.</b> Producción de nanopartículas de alginato usando plantillas liposómicas.....	74
<b>Figura 40.</b> Estudios de mucopenetración in vivo de CS-ALG PEC (Complejo polielectrolito de quitosano y alginato) en mucosa gástrica (aumento de microscopio digital-100X).....	75
<b>Figura 41.</b> Perfil de liberación de la proteína SmRho a partir de nanopartículas de quitosano recubiertas de alginato en SGF (A) y (B) SIF a 37 ° C .....	76
<b>Figura 42.</b> Liberación de fármaco via vectorización con ácido fólico .....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Materiales utilizados en la encapsulación .....	9
<b>Tabla 2.</b> Ejemplos de líneas celulares microencapsuladas y sus correspondientes aplicaciones terapéuticas.....	70

## ABREVIATURAS

<b>AINES</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
<b>APA</b>	Alginato-Polilisina-Alginato
<b>ASB</b>	Albumina de suero bovino
<b>A<math>\beta</math></b>	Proteína beta amiloide
<b>CD</b>	Ciclodextrinas
<b>CFU</b>	Colony forming units/ Unidades formadoras de colonias
<b>CpG</b>	Región de ADN
<b>CS-ALG PEC</b>	Complejo polielectrolito de quitosano y alginato
<b>DSC</b>	Differential Scanning Calorimetry/ Calorimetría diferencial de barrido
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FFLM</b>	Formas farmacéuticas de liberación modificada
<b>FLI</b>	Formas farmacéuticas de liberación inmediata

<b>G</b>	Ácido L-gulurónico
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein/ proteína verde fluorescente
<b>GRAS</b>	Generally Recognized as Safe/ Generalmente reconocido como seguro
<b>IgG1</b>	Inmunoglobulina G subclase 1
<b>IgG2a</b>	Inmunoglobulina G subclase 2
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LUV</b>	Larges unilamellar vesicles/ Grandes vesículas unilaminares
<b>M</b>	D-manurónico
<b>MLV</b>	Multilamellar vesicles/ vesículas multilaminares
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PLGA</b>	Ácido poliláctico-co-glicólico
<b>RGD</b>	Arginina-Glicina-Ácido aspártico
<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscopy/ Microscopía electrónica de barrido
<b>SGF</b>	Fluido gástrico simulado
<b>SIF</b>	Fluido intestinal simulado
<b>SLI</b>	sistemas farmacéuticos de liberación inmediata
<b>SmRho</b>	S. mansoni rhodopsin
<b>SUV</b>	Small unilamellar vesicles/ pequeñas vesículas unilaminares
<b>UFC/g</b>	Unidades formadoras de colonias por gramo
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor/ Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>w/o</b>	water/oil, agua en aceite



## Introducción

La encapsulación es definida como una tecnología de recubrimiento de materiales sólidos y líquidos. La cual incluye sustancias activas atrapadas; micropartículas y nanopartículas. Las cuales pueden liberar los contenidos a velocidades controladas bajo condiciones específicas, y pueden proteger el producto encapsulado de temperatura, humedad, luz, oxígeno y pH; manteniendo su estabilidad, viabilidad y controlando su liberación hasta llegar a su objetivo, así como mejorar la apariencia, color, sabor y textura de los productos.

La variedad de materiales que pueden emplearse para la encapsulación se ha ampliado gradualmente en la medida en que surgen nuevos materiales y se perfilan nuevas aplicaciones de esta técnica. Entre los biopolímeros más utilizados para la encapsulación se encuentran: alginato, goma arábica, goma xantana, carragenina, quitosano, almidón, gelatina y otros, las mezclas de varios de estos materiales pueden mejorar las propiedades del encapsulado.

Diversas investigaciones demuestran que el alginato al ser un biopolímero de fácil obtención, tiene como ventajas ser un material biocompatible, no tóxico y degradable, además de que puede mantener sus propiedades funcionales durante el procesamiento y almacenamiento sin alterar el producto. Por esto, resulta adecuado para muchas aplicaciones en la industria farmacéutica.

Se conocen diferentes métodos para encapsular entre los que se destacan: el secado por aspersión, la coacervación, el atrapamiento en liposomas, gelificación y la polimerización. La selección del método de encapsulación estará en función la sustancia a encapsular, tamaño medio de la partícula requerida, propiedades físicas del agente encapsulante y del mecanismo de liberación deseado.

Implementar la técnica de encapsulación como tecnología farmacéutica representa un enfoque prometedor para superar las limitaciones terapéuticas actuales, ya que con estos sistemas es posible llevar el fármaco selectivamente al sitio diana o de interés terapéutico, mejorando su eficacia y biodisponibilidad. Además de conducir a una reducción de biodistribución, efectos adversos y dosis empleadas; haciendo viable el formular formas farmacéuticas amigables para el paciente, mejorando la

aceptación de los medicamentos.

El creciente interés en relación a las tecnologías de encapsulación de fármacos con biopolímeros ha dado lugar a un mayor número de investigaciones en este campo, que pueden llegar a revolucionar la prevención y tratamiento de muchas patologías.

En este contexto, el presente trabajo monográfico de actualización, presenta aspectos generales de agentes encapsulantes como el alginato y técnicas comúnmente utilizadas en la industria farmacéutica para encapsular, las estrategias de liberación modificada de fármacos encapsulados, así como avances en dicha área y algunos ejemplos de su aplicación; teniendo como objetivo proporcionar una mayor información técnica para la aplicación en la industria farmacéutica, que permita la generación de nuevas ideas para el desarrollo de innovadores sistemas, ya que actualmente son muy pocos los productos que se encuentran al alcance del público que impliquen esta tecnología.

## Objetivo general

Hacer una revisión bibliográfica de la aplicación del alginato en el proceso de encapsulación y su empleo en el sector farmacéutico.

## Objetivos particulares

- Investigar, recopilar y depurar la información acerca de las técnicas de encapsulación con alginato con aplicación en la industria farmacéutica.
- Revisar acerca de la tecnología para liberación modificada de sistemas capsulares que contienen alginato y la importancia de mejorar las formas de dosificación convencionales para obtener formulaciones efectivas.

## Capítulo I

### 1. Generalidades de Encapsulación.

#### 1.1. Antecedentes

La encapsulación está tomando cada vez mayor importancia en diversas industrias tales como la farmacéutica, la cosmética, la agricultura y la alimentaria entre otras, esto a pesar de que sus orígenes no son recientes.

La técnica de encapsulado aparece en el año 1931, en la publicación de un estudio que describía la formación de microcápsulas de gelatina, con el descubrimiento de la técnica conocida como "coacervación"<sup>1</sup>. Esta técnica fue objeto de múltiples variaciones durante los años 40, y su aplicación más importante se dirigió al encapsulado de colorantes para la elaboración de papel para copiar.

Desde entonces, esta técnica ha sido utilizada industrialmente con la finalidad de dar valor agregado al producto, a través de la producción y transporte, o bien mediante la liberación controlada del agente activo en el tiempo y lugar más adecuados; logrando con esto mejorar la efectividad de los aditivos y ampliando sus aplicaciones.

La microencapsulación para el desarrollo de medicamentos comenzó en la década de los años 50 del siglo XX, cuando una compañía farmacéutica introdujo esta tecnología, con la finalidad de conseguir una liberación sostenida o prolongada de los fármacos<sup>1</sup>. Con esa intención y la de prevenir la irritación gástrica fue microencapsulada la aspirina, la cual aparece citada en la bibliografía como uno de los primeros medicamentos microencapsulados. A pesar de la aplicación tardía de este método en el campo de los medicamentos, su difusión fue muy rápida, y en un corto período llegó a ser una tecnología ampliamente extendida en la industria farmacéutica.

La industria médico-farmacéutica es, en la cual se han explotado más ampliamente las bondades de la microencapsulación con diversos propósitos: enmascarar propiedades organolépticas indeseables que pueden presentar algunas sustancias (olor, color, sabor desagradable); aislar algún componente de una formulación

sensible a las condiciones ambientales o también algún componente tóxico para los operarios o el ambiente; revestir partículas que, por su forma irregular, son difíciles de comprimir; convertir principios activos líquidos en sólidos, ya que son más fáciles de manipular; así como mejorar la apariencia y textura de los productos y sobre todo, en el diseño de formulaciones de liberación modificada de fármacos con diferente fines<sup>2,3</sup>.

## 1.2. Microencapsulación.

La microencapsulación es una tecnología que permite empacar o recubrir materiales sólidos, líquidos o gaseosos en una matriz homogénea o heterogénea, en este proceso se forman membranas semipermeables, utilizando diferentes agentes encapsulantes, para dar como resultado partículas a escala de tamaño micrométrico<sup>4</sup>.

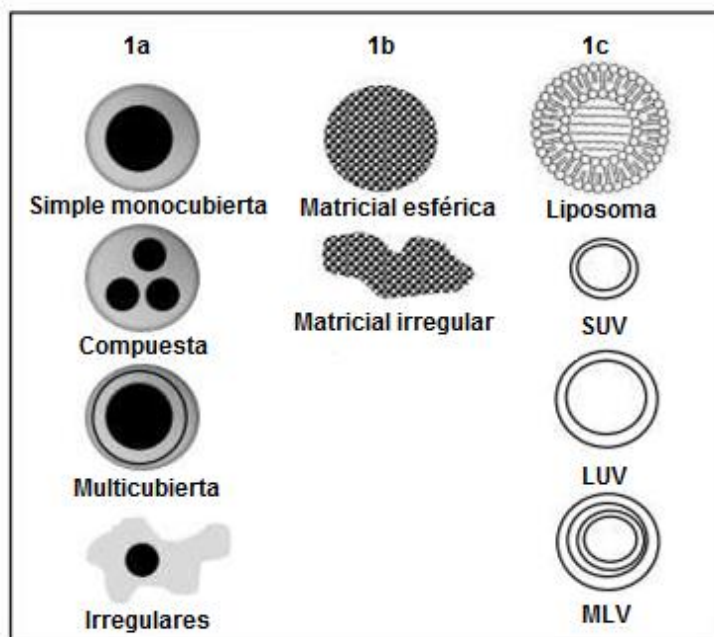
La microencapsulación se basa en la protección de materiales o sustancias activas, ya que reduce su actividad con factores externos como temperatura extrema, pH y humedad, manteniendo la estabilidad y su viabilidad; evitando la degradación durante los procesos industriales, administración o para el fin que fue creado<sup>5</sup>.

En un sentido amplio, la encapsulación provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su liberación posterior bajo condiciones controladas<sup>6,7</sup>.

### 1.2.1. Elementos esenciales de los sistemas encapsulados.

El producto de la microencapsulación recibe el nombre de micropartículas que incluyen microcápsulas, microesferas y liposomas (Figura 1), tienen como característica común su tamaño, el cual es siempre inferior a 1 mm; si fuese menor a 1  $\mu\text{m}$  se les denomina nanopartículas. La diferencia radica en su morfología y estructura interna<sup>8</sup>.

A continuación se describen los tipos de micropartículas como se muestran en la Figura 1:



**Figura 1.** Diferentes tipos de micropartículas y liposomas

[Valenzuela, C. V., (2013). Tecnología de encapsulación y su aplicación en ciencias veterinarias, Avances en ciencias veterinarias, 28(2), 59. (Figura 1)]

#### 1a) Microcápsulas,

Presentan una definición marcada entre el núcleo y pared, siendo un reservorio recubierto por una película del material, pueden ser simples (un núcleo) o compuestas (multinúcleos) de naturaleza líquida o sólida, presentar monocubierta o multicubierta, formando un sistema heterogéneo<sup>9</sup>.

#### 1b) Microesférás,

Están formadas por una red continua de material polimérico o de soporte, donde el material de interés se encuentra disperso en estado molecular, constituyendo un sistema homogéneo tipo matricial<sup>10</sup>.

### 1c) Liposomas,

Se caracterizan por ser formaciones micelares a partir de bicapas de fosfolípidos, y según el método empleado en su preparación, pueden obtenerse desde pequeños liposomas unilamelares (SUV, small unilamellar vesicles), grandes (LUV, larges unilamellar vesicles), hasta liposomas compuestos por múltiples bicapas concéntricas (MLV, multilamellar vesicles) <sup>11</sup>.

La obtención de un tipo de estructura u otra depende de las propiedades físico-químicas del principio activo y de la matriz, así como de la técnica empleada para su preparación<sup>8</sup>.

#### 1.3. Material de recubrimiento

A la hora de realizar el diseño experimental para la fabricación de microcápsulas el primer paso consiste en la selección del material de recubrimiento adecuado, conocido también como agente encapsulante.

La variedad de materiales que pueden emplearse para la microencapsulación se ha ampliado gradualmente en la medida en que surgen nuevos biomateriales y se perfilan nuevas aplicaciones de esta técnica

Los agentes encapsulantes son materiales capaces de formar películas, y resguardar o proteger del material interno de factores que pueden causar su deterioro y ser capaz de liberar el encapsulado bajo condiciones específicas<sup>12</sup>.

Los cuales pueden ser escogidos entre una amplia variedad de polímeros de origen natural o sintético, dependiendo del agente activo y las características deseadas para el producto. La composición del agente encapsulante es determinante en las características finales de las microcápsulas.

##### 1.3.1. Características de los materiales utilizados en la encapsulación

Son diversos los criterios para seleccionar un material apropiado para llevar a cabo el encapsulado, generalmente se tiene en cuenta el tipo de activo, sus características y la aplicación en la que se va a utilizar, siempre se pretende que sea inocuo, estable y biodegradable. El costo se mantiene como un factor clave para elegir el material más adecuado<sup>13</sup>. También las características físicoquímicas

de los materiales será la condición para el éxito del desarrollo del nuevo producto, con el fin de concluir y predecir su comportamiento bajo las condiciones de producción, almacenamiento y consumo<sup>14</sup>.

Algunas de las características ideales de los materiales que se utilizan para la cobertura de la cápsula se mencionan a continuación<sup>15</sup>.

- Buenas propiedades reológicas a altas concentraciones y fácil manejo.
- Habilidad de dispersarse o emulsificarse con el material a encapsular y mantener la estabilidad de la misma.
- No interactuar con el material a encapsular durante el proceso de encapsulación seleccionado, así como en el tiempo de almacenamiento.
- Capacidad para cubrir y mantener dentro de su estructura al material encapsulado.
- Capacidad de proteger al máximo el material encapsulado de la acción de factores externos (oxígeno, temperatura, humedad, luz, entre otros).
- Capacidad de liberar completamente los disolventes u otros materiales utilizados durante el proceso de microencapsulación.
- Controlar la liberación del material encapsulado en condiciones específicas.

La diversidad de los materiales que son utilizados en la encapsulación se debe a que no todos cumplen con las características anteriormente mencionadas. Por esta razón se ha implementado la combinación del material encapsulante con antioxidantes, agentes quelantes, surfactantes, etc., con el objetivo de generar sinergias favorables mejorando sus propiedades físicas y mecánicas del material encapsulante<sup>16, 17</sup>.



### 1.3.3. Materiales de encapsulación

De modo general, los materiales utilizados como agentes encapsulantes se clasifican en tres categorías: grasas, proteínas y polímeros. Tabla 1.

<b>Material para encapsular</b>	<b>Cobertura específica</b>
<i>Lípidos</i>	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico.
<i>Proteínas</i>	Gluten, caseína, albumina
<i>Carbohidratos</i>	Almidón, maltodextrinas, quitosano, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz.
<i>Gomas</i>	Acacia, agar, alginato de sodio, carragenina.
<i>Celulosas</i>	Etilcelulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, carboximetil-celulosa.
<i>Materiales inorgánicos</i>	Sulfato de calcio, silicatos.

**Tabla 1.** Materiales utilizados en la encapsulación

[García, C. A., (2012). Biopolímeros utilizados en la encapsulación, Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, 6(1); 87. (Tabla 1)].

Grasas: La cera de carnauba, el alcohol estearílico y el ácido esteárico son grasas que funden a una determinada temperatura y son erosionables por la acción de las lipasas que existen en la cavidad gástrica.

Proteínas: La gelatina fue el primer material utilizado en la microencapsulación, y en la actualidad, es un material con un importante potencial. La albúmina y el colágeno también se han empleado en la obtención de micropartículas<sup>18</sup>.

Polímeros: Debido a su gran versatilidad, la familia de los polímeros es la más utilizada en la microencapsulación de sustancias; en ella se encuentran los polímeros naturales, semisintéticos y los sintéticos<sup>19</sup>.

Los polímeros naturales principalmente son de naturaleza polisacárida, de origen animal y vegetal; se destacan el alginato, la dextrina, la goma arábiga y el quitosano<sup>20</sup>.

Los polímeros semisintéticos engloban los derivados de la celulosa, de los cuales existe una amplia variedad en el mercado con diferentes características de solubilidad. Por ejemplo, la etilcelulosa y el acetobutirato de celulosa son polímeros insolubles, mientras que el acetofalato de celulosa presenta una solubilidad dependiente del pH. Los polímeros sintéticos más utilizados son los derivados acrílicos y los poliésteres<sup>21, 22</sup>.

Entre los derivados acrílicos están los polímeros insolubles con diferente grado de permeabilidad y también variedades con solubilidad dependiente del pH. Estos ofrecen amplias posibilidades para controlar la liberación del material encapsulado.

Los poliésteres son polímeros de carácter biodegradable, lo que permite su administración por la vía parenteral, los más conocidos son la poli-ε-caprolactona, el ácido poliláctico, y los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico (PLGA, siglas en inglés)<sup>22</sup>.

## 2. Biopolímeros

Los biopolímeros son compuestos producidos por organismos vivos, contienen unidades monomérica orgánicas unidas covalentemente y pueden reaccionar para producir moléculas de elevado peso molecular.

### 2.1 Biopolímeros utilizados en la encapsulación.

Aproximadamente en el años de 1950, se inició el empleo de los biopolímeros en medicina con amplias y variadas aplicaciones como dispositivos terapéuticos cardiovasculares, en tejidos blandos, odontología, ortopedia y sistemas de liberación modificada de fármacos, entre otras.

Las ventajas de usar biopolímeros para liberación modificada de fármacos comparado con los polímeros sintéticos es que no presentan problemas de biocompatibilidad, en general no son inmunogénicos y no presentan toxicidad.

El descubrimiento y desarrollo de nuevos biopolímeros, así como las nuevas tecnologías de síntesis, purificación y modificación, han permitido grandes avances en la liberación modificada de principios activos, así como la localización a dianas

farmacológicas, sobrepaso de barreras fisiológicas, protección de principios activos frente a condiciones fisiológicas, entre otros<sup>14</sup>.

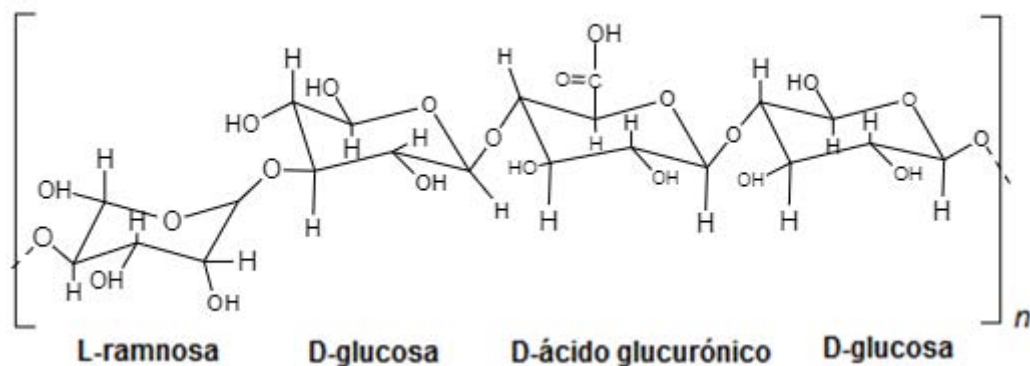
Adicionalmente los biopolímeros cuentan con propiedades que los hace sensibles a estímulos ambientales como cambios de temperatura, pH, agentes químicos, sales, tensión mecánica, sustratos de enzimas, entre otros. A continuación se presentaran algunos biopolímeros utilizados para encapsular.

## 2.2. Gomas

Las gomas son polisacáridos de alto peso molecular, son obtenidos de plantas o microorganismos. Tienen características hidrofílicas o hidrofóbicos, usualmente, tienen propiedades coloidales, con capacidad de producir geles al combinarse con solventes apropiados, tienen la capacidad de dispersar en agua fría y caliente, producen soluciones o mezclas viscosas. Entre las gomas más utilizadas como material de encapsulación se encuentran la goma xantana, gelana, goma arábiga y la carragenina

### 2.2.1. Gelano y goma de xantana

La goma gelana es un polisacárido extracelular producido por la fermentación de carbohidratos utilizando *Pseudomona elodea*. Es un hidrocoloide multifuncional con potencial para ser usado en una gran variedad de alimentos y medicamentos como gelificante, texturizante, estabilizante y formador de películas posee una estructura



**Figura 2.** Gelana. Estructura química de sus cuatro monómeros

[Kulkarni, N., (2015). Development of floating gelane-xanthan beads for oral controlled release of glipizide. International Journal of Pharmaceutical Investigation. 58(2); 75. (Figura 3)]

química lineal formada por cuatro unidades de sacáridos: glucosa, ácido glucurónico y ramnosa. Forma geles muy fuertes en concentraciones bajas como 0.05%. Figura 2.

La goma xantana es producida por la fermentación de carbohidratos con la bacteria *Xanthomonas campestris*. Está constituida por una estructura básica celulósica con ramificaciones de trisacáridos, es soluble en agua y produce elevadas viscosidades en bajas concentraciones, además de poseer una excelente estabilidad al calor y pH, pues la viscosidad de sus soluciones no cambia entre 0 y 100°C y 1 a 13 de pH; y, es utilizada en muchos productos como espesante, estabilizante y agente para mantener suspensiones.

Se ha utilizado una mezcla de goma xantana-gelana para encapsular células prebióticas ya que presenta una alta resistencia a condiciones ácidas<sup>23</sup>.

### 2.2.2. Goma arábica

También conocida como goma acacia, considerada la más vieja de las gomas, es el exudado natural de los árboles *Acacia de Senegal*, y en menor medida de los árboles *Acacia seyal*, es un heteropolisacarido de alto peso molecular, está formado por una cadena lineal de moléculas de D-galactosa unidas por enlaces  $\beta$  1,4 y  $\beta$  1,6. Figura 3.

Por sus características estructurales presenta carácter anfifílico, lo que le permite absorber en superficies lipofílicas y actuar como coloide protector; como un buen agente formador de cápsulas y películas para evitar la oxidación y volatilización de los componentes; es utilizada en la preparación de dulces con la finalidad de retardar la cristalización del azúcar, promover la emulsificación y espesante<sup>24</sup>.

Su solubilidad es independiente de la temperatura en concentraciones de hasta 50%, debido a su estructura ramificada compacta tiene un pequeño volumen hidrodinámico, por lo que las soluciones de este biopolímero se caracterizan por una baja viscosidad, lo que permite el uso de altas concentraciones de goma en diversas aplicaciones<sup>24</sup>. El pH de las soluciones es de alrededor de 4.5 hasta 5.5 pero la viscosidad máxima se encuentra a pH 6.0<sup>25</sup>.



**Figura 3.** Goma arábica, exudado natural de los árboles de *Acacia Senegal*

[Verbeken, D., (2003). Exudate gums: occurrence, production and applications. Applied Microbiology Biotechnology, 63(21), 15. (Figura 2)]

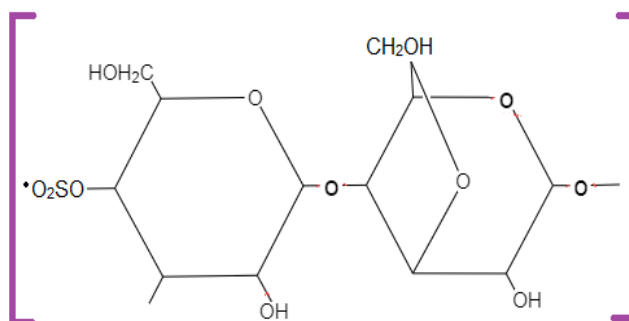
Li et al. (2011) formaron emulsiones múltiples con una mezcla de suero de leche y polisacáridos (goma arábica y goma guar a diferentes proporciones 5:0.1, 5:0.2, 5:0.3, 5:0.4, 5: 0.5), encapsulando vitamina E y B2 para determinar la protección de las cápsulas a diferentes proporciones. Demostraron que al aumentar la concentración de la mezcla 0.1 a 0.5 de la goma guar incrementa la protección de la encapsulación de 73% a 88% de retención de la vitamina E y B2<sup>26</sup>.

### 2.2.3. Carragenina

Es un polisacárido de alto peso molecular, extraída de algas rojas, destacando *Chondrus crispus*, también conocida como "musgo irlandés". Otras importantes fuentes de carragenina son *Eucheuma spp.* y *Gigartina spp.*, que se encuentran en África Oriental, Filipinas y Japón. Posee un contenido de éster sulfato del 15% al 40% formado por unidades alternadas de D-galactosa y 3,6-anhidro-galactosa, unidas por enlaces  $\alpha$ - 1,3 y  $\beta$ -1,4. La posición y el número de grupos de éster sulfato así como el contenido de 3,6-anhidro-galactosa determinan las diferencias primarias

entre los tipos de carragenina iota, kappa y lambda. Figura 4. Es usada como gelificante, espesante, estabilizante, y emulsionante; en pequeñas concentraciones (del orden de 0.01 a 0.03%) en la industria de los lácteos<sup>16</sup>.

Jones et al. (2010) utilizaron a la k-carragenina para encapsular a la  $\beta$ -lactoglobulina y determinar el efecto que puede tener el agente encapsulante y el agente activo. Asimismo evaluaron el grado de desnaturalización de la proteína mediante la aplicación de calor y enzimas, demostrando que la k-carragenina en presencia del agente activo no presento deterioro en ambas condiciones. Siendo una alternativa para la encapsulación de fármacos termosensibles<sup>27</sup>.



**Figura 4.** Carragenina tipo kappa

[García, C. A., (2012). Biopolímeros utilizados en la encapsulación, Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, 6(1), 87. (Figura 4)]

### 2.3. Gelatina.

El colágeno es probablemente la proteína más abundante en el organismo de los vertebrados. Su molécula consiste en tres cadenas polipeptídicas helicoidales denominadas cadenas  $\alpha$ , cada una está conformada por aproximadamente 1000 aminoácidos. Estas cadenas se enrollan formando una triple hélice que se mantiene mediante puentes de hidrógeno intermoleculares. Hasta el momento se han identificado 46 diferentes cadenas polipeptídicas en vertebrados, las cuales componen 28 diferentes tipos de colágeno<sup>28,29</sup>. Cada uno de estos tipos de colágeno lleva a cabo funciones especializadas en diversos tejidos y tienen modos distintivos de organización supramolecular. Los más abundantes forman la base estructural de la piel, tendones, huesos y cartílagos entre otros tejidos, concentrándose en mayor

proporción los de tipo I, II y III, siendo el colágeno de tipo I el predominante en la mayoría de animales<sup>30</sup>.

La gelatina es una proteína compleja que se obtiene mediante la hidrólisis parcial del colágeno. La estructura de triple hélice del colágeno se desintegra mediante la destrucción de los puentes de hidrógeno y los enlaces hidrofóbicos, seguido del desenredo de las cadenas y la disociación de las moléculas en componentes más pequeños provocando la solubilización del colágeno. La gelatina, por tanto, está constituida por un conjunto de cadenas polipeptídicas que tienen un peso molecular inferior al del colágeno, y dependiendo de la especie y del proceso de extracción puede variar entre ~10 y ~300 kDa<sup>31</sup>.

Las cadenas de gelatina son altamente solubles y dan lugar a la formación de una red tridimensional en frío, resultado de su tendencia a volver a formar parcialmente la estructura de colágeno nativo. De la extensión en la formación de enlaces y entrecruzamientos en la red dependerá la fuerza del gel y la estabilidad térmica. Estos dos parámetros son los principales indicadores de la calidad de la gelatina comercial<sup>32</sup>.

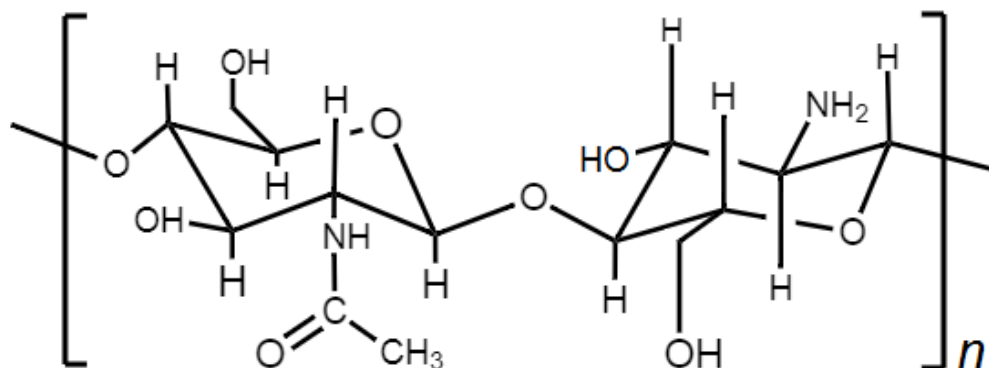
Este biopolímero es ampliamente usado en la industria alimentaria, tanto por sus propiedades funcionales, como por su elevado contenido en proteína. En el campo de la medicina y farmacia, la gelatina es utilizada para múltiples aplicaciones como por ejemplo como hidrogeles, como matriz para implantes, en microesferas para la liberación controlada de fármacos.

En la industria farmacéutica la gelatina es ampliamente usada para la fabricación de cápsulas blandas y duras, expansores plasmáticos y en la fabricación de apósitos para el tratamiento de heridas<sup>33</sup>. Industrialmente, la gelatina se obtiene principalmente a partir de pieles y huesos de cerdo y vacuno, siendo la piel de cerdo la principal fuente, ya que de esta materia prima procede el 44% de la gelatina producida a nivel mundial; mientras que sólo alrededor del 1% de la producción procede de especies distintas a la porcina y vacuna<sup>34</sup>.

Annan (2011) realizó un estudio en el que utilizó a la gelatina como recubrimiento de microesferas de alginato para encapsular al probiótico *Bifidobacterium adolescentes* 15703T, con el objetivo de aumentar la supervivencia durante la simulación de su paso por el tracto gastrointestinal, demostrando que al recubrir las microesferas de alginato con gelatina, favoreció la viabilidad y supervivencia del probiótico con una población de  $7.6 \times 10^7$  UFC/g<sup>35</sup>.

#### 2.4. Quitosano

El quitosano es un polímero no tóxico, bioadhesivo y biodegradable formado por unidades de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, se encuentra en el exo- esqueleto de los crustáceos y las paredes celulares de algunos hongos .Figura 5. Es insoluble en agua y soluble en soluciones ácidas comportándose en este medio como un polielectrolito catiónico (fácil de adherirse a superficies cargadas negativamente) por lo que tiene la capacidad de actuar como floculante, humectante y quelante<sup>36</sup>.



**Figura 5.** Estructura química del monómero de quitosano

[Rafiee, A., (2014). Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4(5), 375 (Figura 2)]

Ha sido utilizado ampliamente en diferentes áreas, como en la encapsulación de fármacos, microorganismos, aceites y probióticos. Un ejemplo de ello es el encapsulado de *Lactobacillus plantarum* B011 que realizó Bruschi y Zachia (2011), a partir de una mezcla de alginato-quitosano; mostrando que esta provee una mayor estabilidad en la viabilidad del probiótico adicionado a yogur, durante el almacenamiento en refrigeración (38 días), además de mejorar la supervivencia



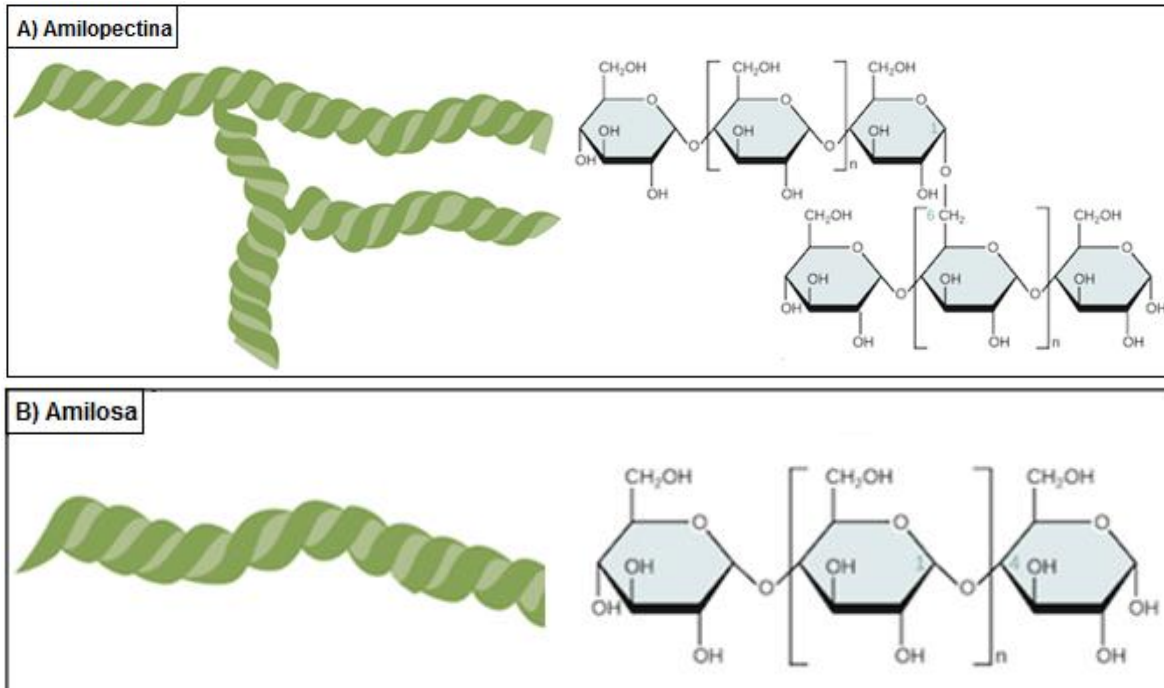
durante el paso por el tracto gastrointestinal en comparación con otras mezclas (alginato-pectina y alginato- caseína)<sup>37</sup>.

## 2.5. Almidón

El almidón es un polisacárido que consiste en un gran número de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos, consiste de dos polímeros de diferente estructura, amilosa (24 al 27%) y amilopectina (77 al 76%), La proporción de estos dos polímeros y su organización física dentro de la estructura granular le confieren propiedades fisicoquímicas y funcionales a los diferentes almidones<sup>35</sup>.

La amilosa es un polímero lineal que contiene en promedio, de 500 a 6000 unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces  $\alpha - (1-4)$ , sin embargo, se ha demostrado la presencia de cierta cantidad de enlaces  $\alpha - (1-6)$  en esta macromolécula que le confieren ramificaciones las cuales se encuentran de manera espaciada e infrecuente, por lo que se comporta como un polímero lineal y se asume que esta molécula le confiere al gránulo de almidón la parte amorfa, haciéndola más susceptible a formar complejos con moléculas anfipáticas (tales como algunas clases de lípidos) Figura 6B

La amilopectina es un polímero ramificado formado de unidades de glucosa unidos principalmente por enlaces  $\alpha-(1-4)$  y en los puntos de ramificación por enlaces  $\alpha-(1-6)$ . Las ramificaciones se localizan cada 15 a 25 unidades de glucosa. La amilopectina calentada en agua, proporciona soluciones claras y de alta viscosidad; su estructura, composición química y proporción en el almidón, contribuyen notablemente en sus propiedades funcionales, por esta razón, ha sido estudiada ampliamente en términos de su tamaño molecular, ramificaciones y longitud de las cadenas internas y externas. Figura 6A. La amilosa es el componente que contribuye a la característica de retrogradación, mientras que la amilopectina es la fracción no gelificante que contribuye a la viscosidad dando consistencia a los productos debido a su alta solubilidad<sup>36</sup>.



**Figura 6.** Estructura química de los monómeros del almidón.

A) Amilopectina, polímero ramificado y B) Amilosa polímero lineal flexible

[Aguilar C., (2007) Optimización del proceso de modificación del almidón de maíz ceroso por extrusión y el uso de mezclas de almidones modificados con murciélago de nopal para la encapsulación de aceite esencial de naranja empleando el secado por aspersión (Figura 3)]

### Modificación de almidones

Los procesos de modificación de los almidones se realizan para introducir alguna funcionalidad específica deseada cambiando sus propiedades para así obtener mejores productos; las modificaciones pueden ser físicas o químicas.

Las modificaciones químicas comprenden la oxidación, formación de enlaces cruzados, estabilización y despolimerización, estas modificaciones producen los mayores efectos de funcionalidad, sin embargo los almidones modificados generalmente son preparados mediante combinaciones de dos o más procesos, las modificaciones físicas producen productos pre gelatinizados y productos capaces de absorber agua fría<sup>37</sup>.

Cualquier almidón de maíz, papa, tapioca, trigo , arroz, etc., puede ser modificado, sin embargo las modificaciones más significativas en la práctica son las que se realizan al almidón de maíz y papa y en segundo término pueden citarse las modificaciones realizadas a los almidones de tapioca y trigo los cuales son recomendados para utilizarse como agentes encapsulantes<sup>38</sup>.

## 2.6. Alginatos.

El alginato es un biopolímero formado por ácido D-manurónico (M) y ácido L-gulurónico (G) unidos por enlace 1-4. Es abundante en la naturaleza y se puede encontrar como componente estructural de las algas marinas pardas y como polisacárido estructural de bacterias<sup>39</sup>. El alginato se solubiliza lentamente en agua, formando soluciones coloidales viscosas<sup>40</sup>. La propiedad del alginato para unirse selectivamente a iones es la base de sus propiedades gelificantes<sup>41</sup>. El entrecruzamiento de las cadenas de alginato se puede conseguir por métodos químicos o físicos, y la gran variedad de métodos de reacción hacen posible el control de la cinética de gelificación y de las propiedades del hidrogel formado<sup>42</sup>. Su biocompatibilidad junto con sus propiedades bioadhesivas y mucoadhesivas, justifican su utilización en sistemas de liberación de fármacos a través de mucosas<sup>43</sup>. Tanto el alginato como sus derivados representan una opción de futuro para la obtención de nuevos biomateriales para inmovilización de células, control de la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos<sup>42, 44</sup>.

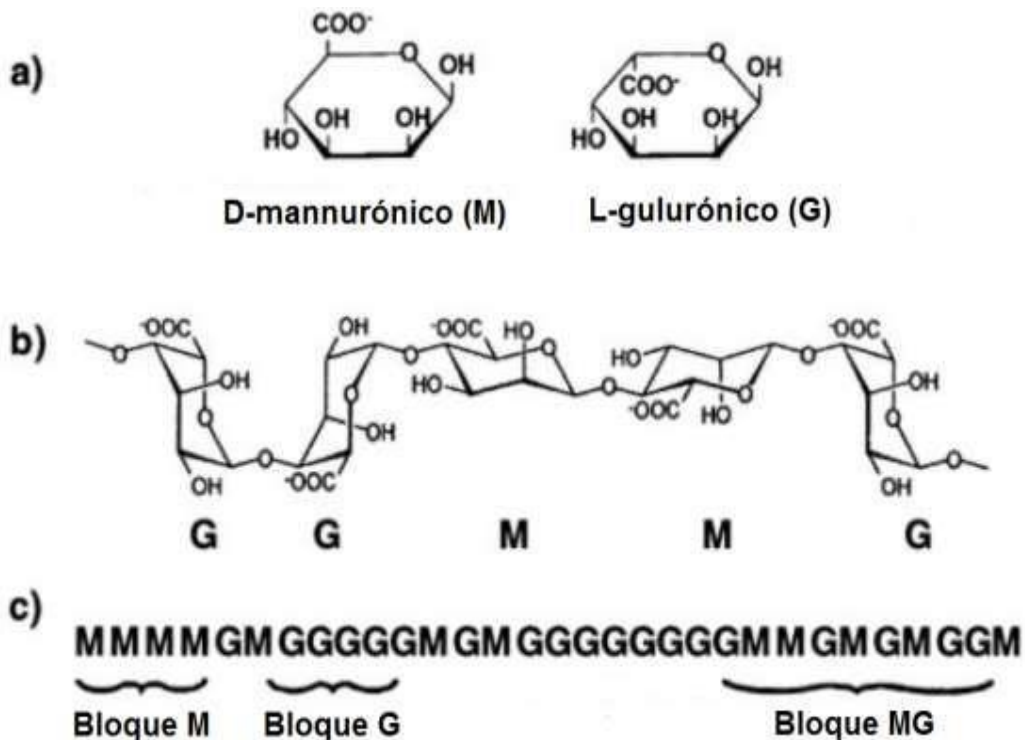
El uso de diferentes biopolímeros en la industria farmacéutica es muy amplio, en cada caso desempeñan un papel muy característico gracias a sus propiedades funcionales.

## Capítulo II

### 3. Alginato

#### 3.1. Estructura, obtención y propiedades características

Los alginatos son biomoléculas binarias copoliméricas que están formadas por ácido D- manurónico (M) y ácido L-gulurónico (G) unidos por enlace 1-4 (Figura 7).



**Figura 7.** Características estructurales del alginato: a) Monómeros, b) Cadena, c) Fracciones o bloques

[Draget, K. I., et al. (2005). Alginates from algae. Edición. Properties, production and patents p.5

(Figura 4)]

El alginato es abundante en la naturaleza y se puede encontrar como componente estructural de las algas marinas pardas y como polisacárido estructural de bacterias<sup>39</sup>. La composición química y la secuencia monómerica pueden variar ampliamente entre especies de algas aún en diversas partes de la misma y con el año de cosecha. El alginato comercializado se extrae de algas pardas

(*Phaeophyceae*) como *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lessonia nigrescens*, *Durvillea antarctica* y *Sargassum spp*<sup>45</sup>. (Figura 8). El alginato se encuentra en la matriz intracelular en forma de sal de varios cationes como el magnesio, el calcio o el sodio<sup>46</sup>.



**Figura 8.** Esquema representativo de las especies del género *Laminaria*

[Batista, G. A. et al. (2009). Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Rev Cubana Plant Med.* 14(2). P.1029 (Figura 8)]

También se puede obtener por biosíntesis bacteriana de *Azobacter vinelandii* y varias especies de *Pseudomonas*, resultando un alginato con estructura química y propiedades físicas mejor definidas que el procedente de las algas<sup>41, 46, 45</sup>. La biosíntesis bacteriana del alginato consiste en la oxidación de la fuente de carbono a acetil-CoA para entrar en el ciclo de Krebs y vía gluconeogénesis, formando fructosa-6-fosfato. Posteriormente, sobre esta fructosa-6-fosfato se producen una serie de reacciones para convertirla en ácido manurónico, que será el precursor del alginato<sup>47, 48</sup>.

El ácido algínico fue descubierto, extraído y patentado por Standford durante la década de 1880. La patente describe la obtención del alginato, sumergiendo las algas en agua o ácido diluido, haciendo una extracción con carbonato sódico y precipitando el alginato de la solución con ácido. Aunque Krefting fue el primero en obtener una forma de ácido algínico purificado<sup>49</sup>, no fue hasta 1930 cuando se describió la estructura del alginato<sup>50</sup>.

El alginato obtenido a partir de fuentes naturales puede presentar algunas impurezas, como endotoxinas, metales pesados o proteínas, entre otras impurezas las cuales se deben eliminar si se pretende utilizar el alginato para aplicaciones farmacéuticas<sup>46</sup>.

### 3.1.1. Propiedades fisicoquímicas

Los alginatos, como en general todos los polisacáridos, varían mucho en cuanto al peso molecular<sup>39</sup>. El peso molecular del alginato sódico comercializado puede oscilar entre 32000 y 400000 g/mol<sup>45</sup>. Se han realizado estudios de las propiedades fisicoquímicas y la reología de cápsulas de alginato en presencia de varios cationes divalentes y que muestran la influencia de la naturaleza del catión, la concentración del polímero, del catión y la fuerza iónica en las propiedades mecánicas de las cápsulas de alginato<sup>51</sup>.

El alginato sódico rico en ácido gulurónico es más soluble en agua que el alginato rico en ácido manurónico<sup>17</sup>. La viscosidad de las soluciones de alginato aumenta al disminuir el pH, alcanzando un máximo a pH 3-3,5 cuando los grupos carboxilo se protonan y forman enlaces de hidrógeno. Una solución de alginato es más viscosa cuanto más elevado sea el peso molecular del alginato<sup>39</sup>. El peso molecular del alginato tiene una gran importancia en sus aplicaciones, ya que su composición y la relación de bloques M/G pueden variar la viscosidad de las soluciones y los hidrogeles de alginato<sup>45</sup>.

En general, hay tres parámetros que determinan y limitan la solubilidad del alginato en agua: el pH del disolvente, la fuerza iónica del medio y la presencia de iones gelificantes en el disolvente<sup>41, 45, 48</sup>. Mediante potenciometría se ha determinado que las constantes de disociación (pKa) de los monómeros del ácido manurónico y gulurónico son 3,38 y 3,65 respectivamente<sup>39</sup>.

El alginato es prácticamente insoluble en etanol (95%), en éteres, cloroformo o en soluciones hidroalcohólicas en las que la concentración de etanol sea superior al 30%. También es prácticamente insoluble en otros disolventes orgánicos y en

soluciones acuosas ácidas en las que el pH es inferior a 3. El alginato se solubiliza lentamente en agua, formando una solución coloidal viscosa<sup>40</sup>.

Asimismo, la solubilidad del alginato depende del grupo carboxílico. Un ácido algínico con el grupo carboxílico en forma protonada no será totalmente soluble en agua<sup>45, 48</sup>. La propiedad del alginato para unirse selectivamente a iones es la base de sus propiedades gelificantes<sup>41</sup>. La unión a iones divalentes depende de la composición en bloques G del alginato, ya que los bloques M no han demostrado tener afinidad selectiva por dichos iones, tal como se ha indicado anteriormente. La afinidad de los alginatos por los iones divalentes de los metales alcalinos aumenta según el orden: Mn < Co, Zn, Ni < Ca < Sr < Ba < Cd < Cu < Pb<sup>46, 48</sup>.

Esta característica unión selectiva a iones se explicará más detalladamente en la formación de geles de alginato según el modelo denominado caja de huevos ("Egg-box model")<sup>52</sup>.

El alginato sódico en forma de polvo seco es estable durante meses si se almacena en un lugar seco, fresco y protegido de la luz solar de lo contrario es poco estable. En el congelador, el alginato sódico puede mantenerse estable durante varios años. En cambio, el ácido algínico desecado tiene una estabilidad limitada a temperatura ambiente debido a la degradación intramolecular catalizada por ácidos<sup>39</sup>.

Los alginatos pueden degradarse en presencia de ácidos y bases y también a pH neutro en presencia de compuestos reductores como hidroquinona, sulfito sódico, cisteína, ácido ascórbico o sulfato de hidrazina, entre otros. El mecanismo de degradación implica la formación de un peróxido que da lugar a la formación de radicales libres que finalmente provocan el rompimiento de la cadena de alginato<sup>41, 45, 48</sup>. También se produce la degradación del alginato por técnicas de esterilización por calor, con óxido de etileno o rayos gamma<sup>41</sup>.

### 3.1.2. Propiedades biológicas

El alginato no es tóxico y es biodegradable; está incluido entre los compuestos considerados seguros (GRAS o Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration). Se utiliza ampliamente en la industria alimentaria como emulsificante y estabilizante<sup>53</sup>.

La biocompatibilidad del alginato se ha estudiado tanto in vivo como in vitro. Estudios han demostrado que un alginato con un elevado contenido en bloques M es inmunogénico y aproximadamente 10 veces más potente que un alginato rico en bloques G, en cuanto a inducir la producción de citoquinas<sup>45</sup>. Otros estudios, en cambio, han encontrado escasa o nula inmunorespuesta cuando se han aplicado implantes de alginato. La respuesta inmunológica se podría atribuir a impurezas tales como metales pesados, endotoxinas o compuestos polifenólicos, ya que el uso de alginato purificado no ha demostrado reacción inmune<sup>53</sup>.

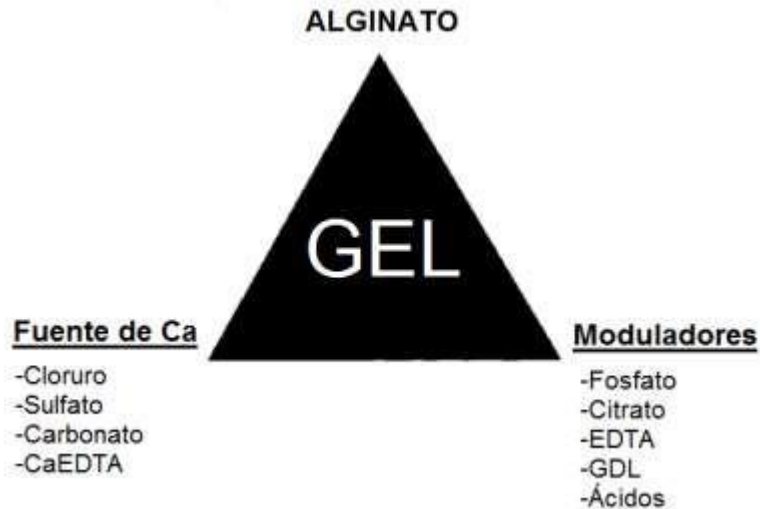
La bioadhesión se refiere al contacto entre dos superficies, cuando una de ellas es un sustrato biológico. Si una de las superficies es una mucosa, se denomina mucoadhesión. El alginato tiene propiedades bioadhesivas y mucoadhesivas, por lo que es un buen candidato para ser utilizado en sistemas de liberación de fármacos a través de mucosas<sup>53, 43</sup>.

Tanto el alginato como sus derivados obtenidos por modificaciones químicas en los grupos carboxilo e hidroxilo, representan una opción de futuro para la obtención de nuevos biomateriales.

### 3.2. Reticulación del alginato

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales reticuladas compuestas por polímeros hidrófilos con un elevado contenido en agua (alrededor del 95%)<sup>45, 58</sup>. La formación de un hidrogel depende de las características del polímero y del reticulador. En el caso de los hidrogeles de alginato, depende de la naturaleza y propiedades de la cadena polimérica, del tipo de reticulador o fuente de calcio y del tipo de modulador o agente auxiliar reticulador<sup>45</sup>, tal como se resume en la Figura 9.





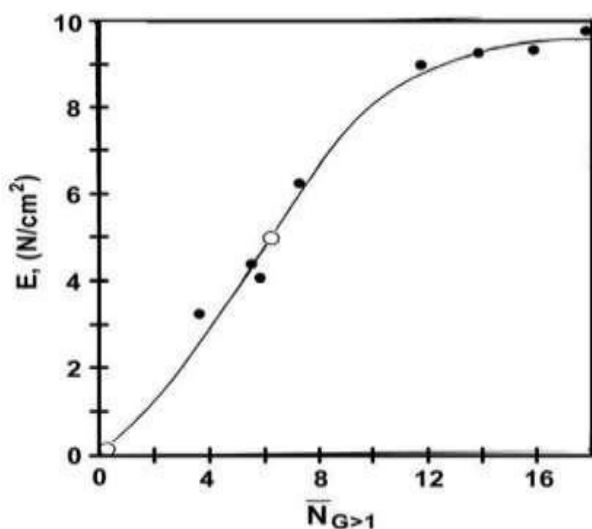
**Figura 9.** Esquema de los parámetros que controlan la cinética y las propiedades de los hidrogeles de alginato

[Draget K. I. (2009). Alginates: Handbook of Hydrocolloids, 2a. Edición. Editorial Woodhead. Cambridge p.381 (Figura 4)]

El alginato se utiliza en forma de hidrogel en biomedicina, en aplicaciones tales como la curación de heridas, inmovilización de células, liberación de fármacos y en ingeniería de tejidos<sup>42, 54, 55, 56, 57</sup>. También se puede preparar esponjas oleosas de alginato los cuales puede ser útiles como vehículos para contener sustancias solubles en fase oleosa como ciertos saborizantes, vitaminas o colorantes<sup>59</sup>.

El entrecruzamiento de la cadena de alginato se puede conseguir por métodos químicos o físicos, y la gran variedad de métodos de reacción hacen posible el control de la cinética de gelificación y de las propiedades del hidrogel formado<sup>42, 60</sup>. Tal como se puede observar en la figura 10, los geles procedentes de alginatos con un elevado contenido en bloques G tienen tendencia a formar geles fuertes, rígidos y porosos<sup>41</sup>, en cambio, los geles procedentes de alginato con un elevado contenido en bloques M tenderán a formar geles más débiles y elásticos<sup>45, 58</sup>.

A continuación, se describen brevemente los principales métodos de reticulación de las cadenas de alginato.



**Figura 10.** Gráfico de la fuerza del gel ( $E$ ) en función del contenido en bloques G

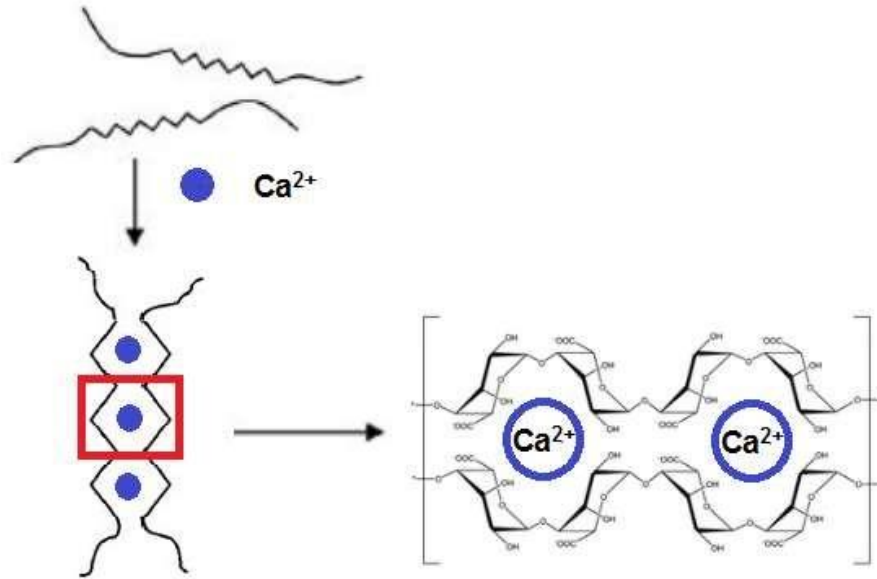
[Draget, K. I., et al. (2005). Alginates from algae. Edición. Properties, production and patents p.512 (Figura 7)]

### 3.2.1. Reticulación iónica

El método más utilizado para preparar hidrogeles de alginato consiste en mezclar una solución de alginato con un agente reticulador iónico, como son los cationes divalentes. El alginato con un alto contenido de ácido gulurónico proporciona importantes propiedades mecánicas en la formación de hidrogeles<sup>61</sup>. Los alginatos presentan diferente afinidad por los cationes divalentes, lo que dará lugar a geles con diferentes propiedades fisicoquímicas y estabilidad<sup>42</sup>. Los cationes divalentes como el calcio se unen preferentemente en los bloques de guluronato (bloques G), por ello, un alginato con una elevada proporción de bloques G formará un gel mucho más rígido que con otro alginato con baja proporción de guluronato<sup>45, 48</sup>.

El bloque G de un polímero se une con el bloque G de otro polímero formando una estructura característica en forma de caja de huevos ("egg-box model")<sup>52</sup>, que dará lugar a la formación de un gel<sup>58</sup>, tal como se representa en la figura 11. El alginato se une específicamente a iones divalentes para formar hidrogeles de alginato, sin embargo, esta afinidad no se manifiesta en presencia de  $Mg^{2+}$  e iones monovalentes, por lo que no se forman hidrogeles en presencia de dichos iones<sup>53</sup>,

<sup>46</sup>.

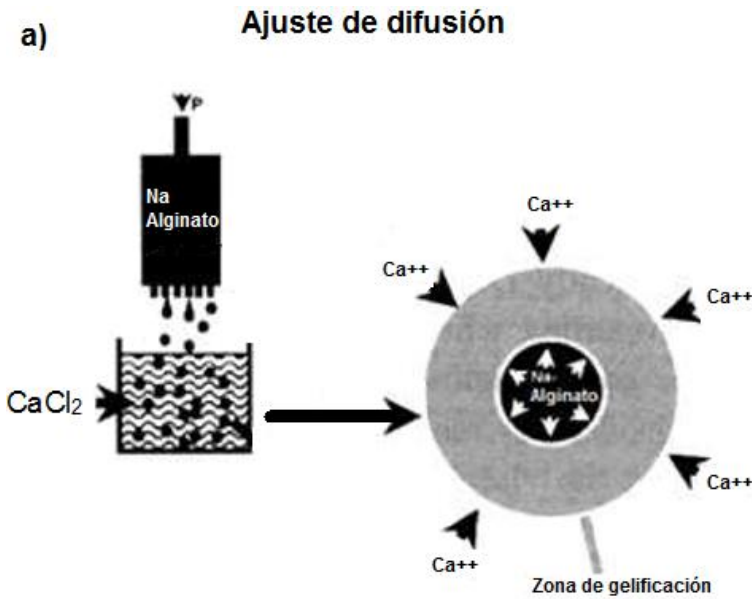


**Figura 11.** Representación esquemática del modelo "Egg-box" con cationes calcio.

[Paques, J. P. et al. (2014). Preparation methods of alginate nanoparticles. Adv. Colloid Interface Sci p.167 (Figura 2)]

El cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) es uno de los agentes más utilizados para la reticulación iónica debido a su solubilidad en soluciones acuosas, aunque el proceso de gelificación puede resultar rápido y descontrolado. Para reducir la velocidad de gelificación se puede utilizar una solución reguladora que contenga fosfato, ya que entonces los grupos fosfato compiten con los grupos carboxilos del alginato para unirse a los cationes divalentes, retardando así la gelificación.

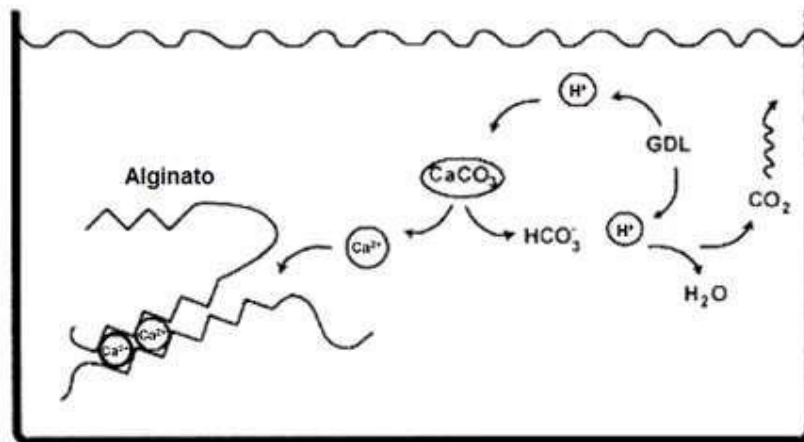
Otros agentes reticulantes son el sulfato cálcico ( $\text{CaSO}_4$ ) y el carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ), ya que debido a su menor solubilidad en soluciones acuosas permiten reducir la velocidad de gelificación<sup>45</sup>. La gelificación de las soluciones de alginato mediante cationes se puede producir por dos métodos, denominados gelificación externa (o método de difusión) y gelificación interna (o gelificación in situ), tal como se representa en la Figura 12.



**Figura 12.** Representación de dos ejemplos de reticulación iónica: a) Gelificación externa: Solución de  $\text{CaCl}_2$  y b) Gelificación interna: Solución de  $\text{CaCO}_3$

[Draget K. I. (2009). Alginates: Handbook of Hydrocolloids, 2a. Edición. Editorial Woodhead. Cambridge p382 (Figura 6)]

b) **Gelificación interna**



El  $\text{CaCl}_2$  se utiliza como reticulante en el método de gelificación externa, en donde los iones calcio difunden desde una fase continua (solución de  $\text{CaCl}_2$ ) al interior de gotas de alginato, formando una matriz gelificada<sup>58</sup>. En el método de gelificación interna se utiliza como reticulante una sal insoluble en agua, como el  $\text{CaCO}_3$ , que se mezcla con la solución de alginato. Los iones calcio se liberan desde el interior de la mezcla cuando se disminuye el pH y/o se aumenta la solubilidad de la sal de calcio, dando lugar a la formación del gel de alginato<sup>58</sup>.

Barbetta y colaboradores describen la formación de hidrogeles de alginato poroso para obtener matrices por medio de la formación de CO<sub>2</sub> in situ, al ser desplazado por un ácido y posterior formación de burbujas de gas, que al ser desplazadas dejan una formación porosa<sup>62</sup>.

La cinética de gelificación es un factor muy importante en el control de la fuerza y uniformidad del gel cuando se utilizan cationes divalentes, ya que una gelificación lenta permitirá obtener estructuras más uniformes y más integradas, de lo contrario se pueden obtener estructuras porosas y no homogéneas y se pueden producir pérdidas del material encapsulado<sup>63</sup>.

La temperatura de gelificación también afectará a la cinética de gelificación y a las propiedades finales del hidrogel, ya que a bajas temperaturas se puede reducir la reactividad de los agentes reticulantes y, en consecuencia, la formación de gel<sup>45</sup>.

Uno de los puntos críticos de la gelificación iónica, que puede resultar beneficioso o perjudicial en sus aplicaciones, es la limitada estabilidad a largo plazo en condiciones fisiológicas y el intercambio de cationes divalentes por cationes monovalentes así como la liberación de calcio en el interior del organismo. Además, los hidrogeles de alginato pueden utilizarse como matriz para la agregación de plaquetas y eritrocitos<sup>45</sup>.

### 3.2.2. Otros métodos de reticulación

La reticulación covalente se ha estudiado para mejorar las propiedades físicas de los geles, sobretodo en el campo de la ingeniería de tejidos. Uno de los primeros agentes reticulantes utilizados en la reticulación covalente fueron los polietilenglicoles de diferente peso molecular, con los que se prepararon una gran variedad de geles con diversas propiedades mecánicas. También se ha utilizado la PEG-diamina. Es importante tener en cuenta que el exceso de agente reticulante que no haya reaccionado debe eliminarse del gel para no inducir toxicidad<sup>45</sup>.

En la reticulación iónica hay pérdida de agua y deformación plástica, lo que se observa cuando los enlaces sometidos a tensión se disocian y se vuelven a

asociar<sup>48</sup>. Este hecho también se ha constatado en la reticulación covalente pero la imposibilidad de disociarse hace que la deformación sea elástica.

La foto-reticulación es la gelificación in situ que se puede realizar en condiciones de reacción suaves. El alginato modificado con metacrilato y reticulado por la exposición a un láser (Láser de iones de argón, 514 nm) durante 30 segundos en presencia de eosina y trietanolamina, forma hidrogeles claros y flexibles. Estos geles tienen potencial en cirugía sin suturas ya que se podrían aplicar en el sellado de la córnea in vivo en casos de perforación<sup>45</sup>. Al tratarse de un nuevo método de reticulación, se requieren más estudios para evaluar su efectividad<sup>54</sup>.

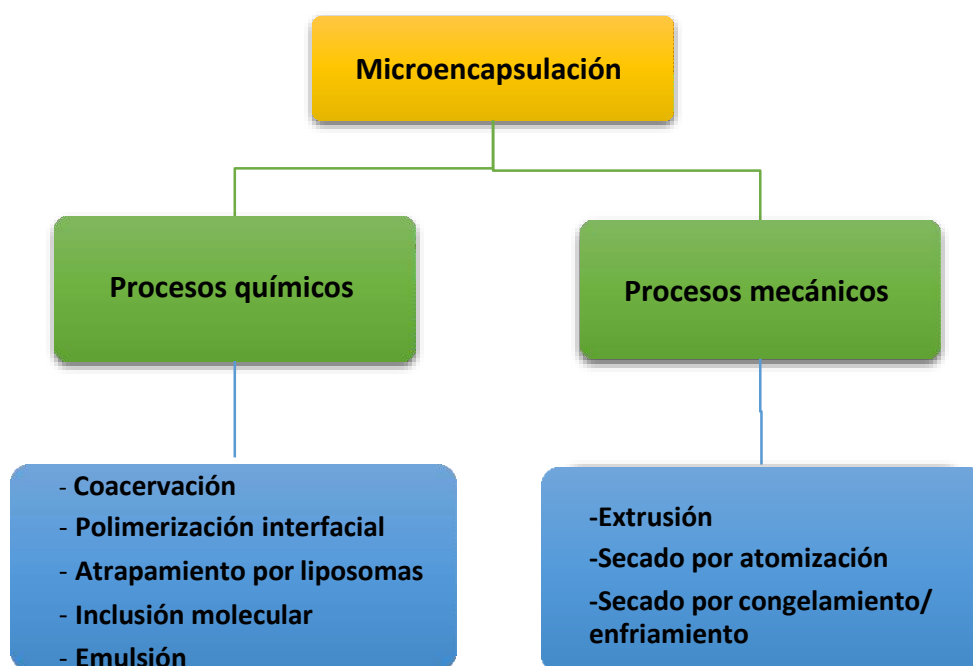
La reticulación celular se basa en la capacidad de las células para contribuir en la formación de geles. Cuando el alginato se modifica con ligandos de adhesión celular, la capacidad para unir varias cadenas poliméricas puede llegar a gran distancia y mediante la unión receptor-ligando se puede formar una red uniforme. Por otra parte, las células añadidas a una solución de alginato no modificado, se agregan y forman una estructura no uniforme<sup>45, 48</sup>.

Esta estructura no uniforme es el resultado del predominio de las interacciones célula- célula y no receptor-ligando. Cuando se rompe la estructura del gel por una fuerza de cizalla, las estructuras de entrecruzamiento se recuperan en pocos minutos. El sistema se puede aplicar a la liberación de células en ingeniería de tejidos, ya que el gel podría estar en estado líquido durante la inyección al paciente y solidificar al entrar en contacto con las células del organismo. La reticulación celular de alginato constituye un reto en biomedicina con numerosas potenciales aplicaciones<sup>45, 54</sup>.

## Capítulo III

### 4. Técnicas de encapsulación con alginato

Flores (2013) reporta diversas técnicas de microencapsulación, las cuales se dividen en dos: químicas y mecánicas. Esta tipificación se esquematiza en la figura 13, en donde se puede apreciar las subdivisiones de las clasificaciones mencionadas anteriormente.



**Figura 13.** Esquema de las diferentes técnicas de microencapsulación

[Flores-Belmont, I. A. *et al.* (2013). Microencapsulación de compuestos activos con quitosano. Temas selectos de ingeniería de alimentos. p.52, (Figura 1)].

Cada técnica, tiene aplicaciones relativamente específicas, por lo que su elección va a depender del uso final<sup>65</sup>. Para fines particulares de este trabajo monográfico de actualización, se revisaran diversas técnicas de encapsulación; al emplear el alginato como matriz polimérica, las técnicas de microencapsulación en

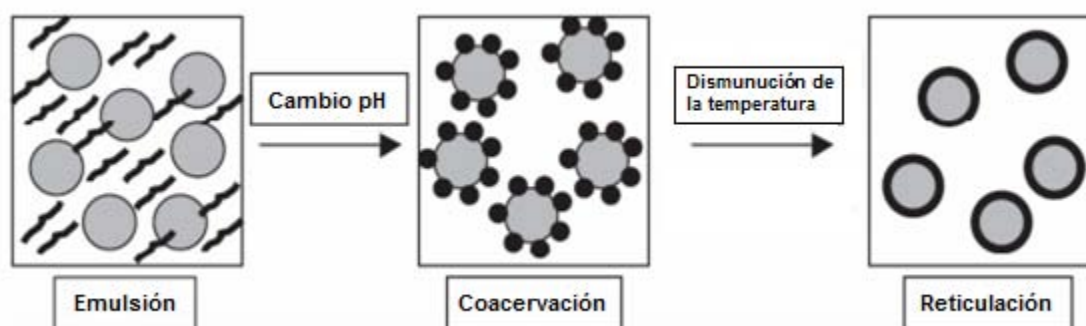
aplicaciones farmacéuticas se reducen a: secado por atomización (Spray drying), emulsión y extrusión<sup>66</sup>.

#### 4.1. Procesos químicos

##### 4.1.1. Conservación

Esta técnica se refiere a un método químico de separación de fases líquido- líquido de forma espontánea, que puede ocurrir al mezclar polielectrolitos de cargas opuestas en un medio acuoso, El coacervado se considera el soluto polimérico separado en forma de pequeñas gotitas líquidas insolubles que forma cápsulas, Es un fenómeno que se presenta en soluciones coloidales y se considera como el método original de encapsulación<sup>67</sup>.

El proceso consta de las siguientes etapas: *Dispersión* mediante agitación del compuesto que se va encapsular en una disolución de polímero formador del recubrimiento. *Inducción de la coacervación* por modificación de pH, temperatura o fuerza iónica por adición de una segunda sustancia (sal iónica o polímero incompatible), *Adsorción* de las gotas de coacervado alrededor de los núcleos a encapsular y *Endurecimiento* de la cubierta de coacervado, sometiéndola a enfriamiento<sup>68</sup>. En la figura 14, se presentan los pasos para este proceso.



**Figura 14.** Técnica de coacervación

[Madene, A., J. *et al.* (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. International Journal of Food Science and Technology 4(1), p.8 (Figura 3)]



Esta técnica puede ser simple o compleja, la técnica simple involucra solamente un tipo de polímero con la adición de agentes fuertemente hidrofílicos a la solución coloidal. La compleja son dos tipos de polímeros y se caracteriza por ser altamente inestable a agentes químicos, como glutaraldehído. Este método es eficaz, pero caro; el tamaño de partícula que se puede conseguir es de 1-1000  $\mu\text{m}$ <sup>69</sup>. Este proceso se utiliza preferentemente para encapsular diferentes tipos de aceites, vitaminas y enzimas<sup>70</sup>.

#### 4.1. 2. Polimerización interfacial

En esta técnica se produce la polimerización de un monómero en la interfase de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana, que da lugar a la pared de la microcápsula<sup>71</sup>.

El tamaño de partícula que se puede obtener es de 1-1000  $\mu\text{m}$ ; mediante esta técnica se lleva a cabo la formación de poliamida (nylon) como consecuencia de la reacción interfacial 1,6- hexametildiamina, monómero soluble en agua, y cloruro de adipilo, soluble en medio orgánico, otros polímeros que forman coberturas mediante esta técnica son poliamidas, poliuretanos y poliéster, los cuales son ampliamente utilizados para preparar microcápsulas de proteínas, fármacos, entre otros<sup>72</sup>.

#### 4.1. 3. Atrapamiento en liposomas.

Los liposomas son estructuras formadas por una bicapa de lípidos que engloban un volumen acuoso, es decir, encapsula. Se elaboran con moléculas que poseen sitios hidrofóbicos (ácidos grasos, fosfolípidos, etc.) y sitios hidrofílico. Característica que los hace selectivamente permeables a los iones y les permite interaccionar con membranas biológicas y células, con un tamaño de partícula de 30 nm a varios micrones<sup>64</sup>.

La permeabilidad, estabilidad, actividad superficial y afinidad pueden variar con el tamaño y composición del lípido. Los hay con cargas positivas utilizando aminos o con cargas negativas por la adición de fosfatidil-serina o diacetil-fosfato permitiendo que materiales hidrofóbicos e hidrofílicos pueden ser atrapados en liposomas. La liberación del compuesto encapsulado se realiza por difusión a través de la bicapa,

por destrucción de la vesícula, por medio de una concentración crítica de iones de calcio o por un cambio de pH<sup>73</sup>.

#### 4.1.4. Inclusión molecular.

Esta técnica es definida como el resultado de interacciones entre componentes en los cuales una molécula se ajusta dentro de otra, siendo esta última el agente encapsulante, por ejemplo la ciclodextrina.

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos producidos por la degradación enzimática del almidón mediante la acción de la glucosiltransferasa proveniente del *Bacillus macerans*. Los compuestos más comunes son las  $\alpha$ - ,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs las cuales contienen 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosas respectivamente, unidos por enlaces  $\alpha$ -1, 4 glicosídicos. Su estructura les confiere una cavidad apolar la cual es capaz de incluir o encapsular algunas moléculas orgánicas mediante fuerzas de interacción no covalentes (enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals), mientras que la superficie exterior es hidrofílica<sup>74</sup>.

Teóricamente no siempre será obtenido un máximo rendimiento ya que una molécula de ciclodextrina normalmente incluye solamente una molécula de agente activo o huésped, otra desventaja son la falta de estabilidad frente a la oxidación y el alto costo de esta técnica.

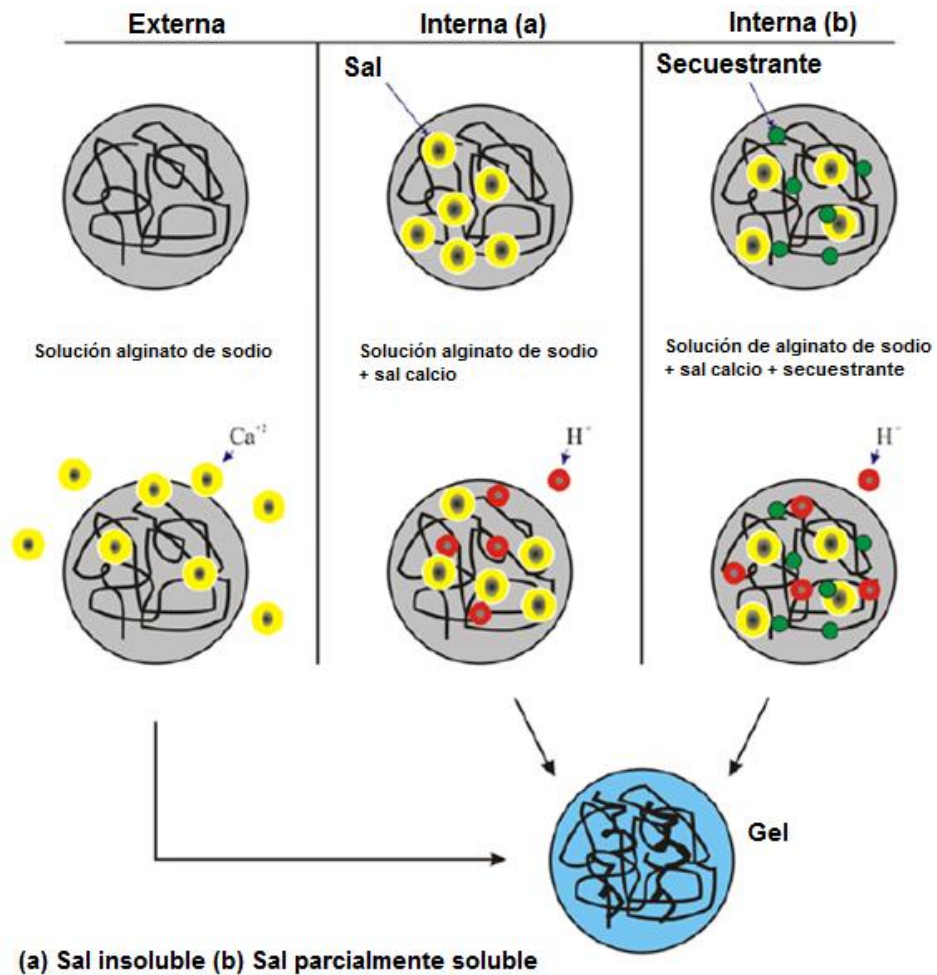
Los complejos formados por las CDs y sus derivados pueden modificar favorablemente la estabilidad, la solubilidad y la biodisponibilidad del compuesto encapsulado. Las aplicaciones de esta técnica se orientan hacia la protección de materiales sensibles al calor<sup>74</sup>.

#### 4.1.5. Emulsión

La técnica de encapsulación por emulsión se ha definido como el proceso de dispersión de un líquido en otro líquido inmiscible donde la fase dispersa consta de la matriz que incluye el componente a encapsular y una fase continua (aceite vegetal)<sup>75,76</sup>.

Para que se forme una emulsión de agua en aceite esta técnica requiere de tensoactivo o surfactante para que sea homogénea y estable a la mezcla. Luego se

adiciona un agente solidificante como el cloruro de calcio para formar las cápsulas, que después serán filtradas<sup>77</sup>.



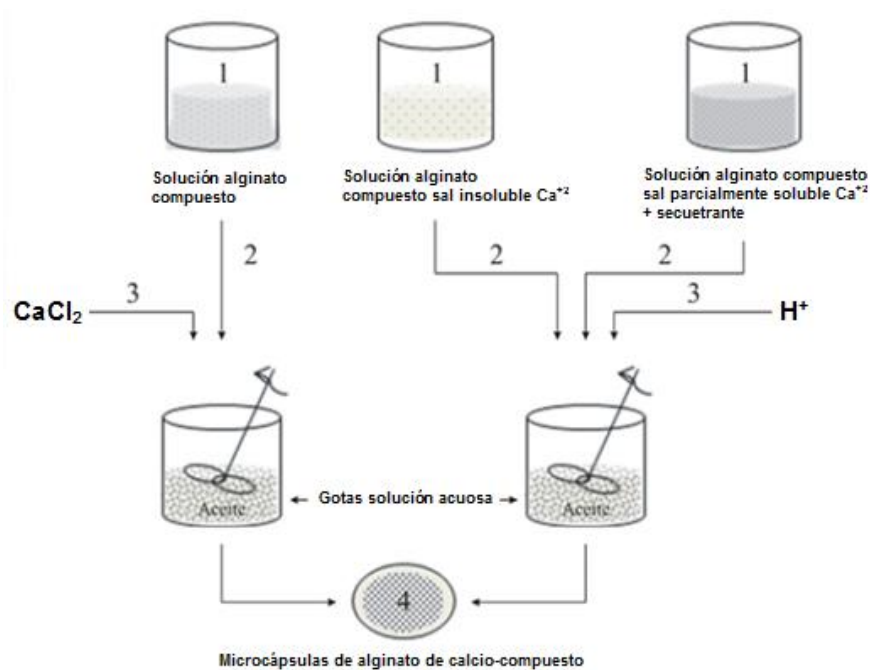
**Figura 15.** Mecanismos de gelificación iónica.

[Lupo, P. B., *et al.* (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 3 (1), p.136. (Figura 3)].

En este sentido, la preparación de microcápsulas por emulsificación puede llevarse a cabo empleando el mecanismo de gelificación externa o interna como se observa en la figura 16. Para el primer caso, la gelificación externa en emulsión consta en la

dispersión de una mezcla solución de alginato-componente en una fase continua no acuosa, seguido de la adición de una fuente de calcio que al difundirse a la fase dispersa inicie la gelificación permitiendo la encapsulación, y a su vez, la desestabilización de la emulsión para la separación de las cápsulas formadas<sup>78</sup>.

La técnica en emulsión por gelificación interna se fundamenta en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble o parcialmente soluble en cuyo caso se adiciona un agente secuestrante, contenido en una solución de alginato-componente el cual es dispersado en una fase continua no acuosa generando una emulsión agua en aceite (W/O)<sup>65, 79</sup>. La liberación del ion calcio ocurre con la adición de un ácido orgánico soluble en la fase continua que al difundirse disminuye el pH del medio solubilizando la sal y produciendo la gelificación<sup>80</sup>. Figura 16.



**Figura 16.** Técnica de microencapsulación en emulsión

[Champagne, C. P. *et al.* (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(2), p.187. (Figura 7)]

Las cápsulas obtenidas pueden variar de tamaño entre 25  $\mu\text{m}$  y 2 mm, dependiendo de la velocidad de agitación y la proporción aceite/agua<sup>81</sup>. Varios estudios han demostrado que la microencapsulación bajo esta técnica utilizando polímeros como

el alginato, quitosano y xantana aumenta la viabilidad de los sistemas en condiciones gástricas simuladas<sup>82, 83</sup>.

Es importante considerar para aplicaciones en la industria farmacéutica la presencia de aceites residuales sobre la superficie de las cápsulas, ya que se ve afectada la textura y propiedades sensoriales del producto si se administra por vía oral, así como la interacción de los surfactantes o emulsificantes utilizados con los compuestos encapsulados<sup>77</sup>.

## 4.2. Procesos mecánicos

### 4.2.1. Extrusión

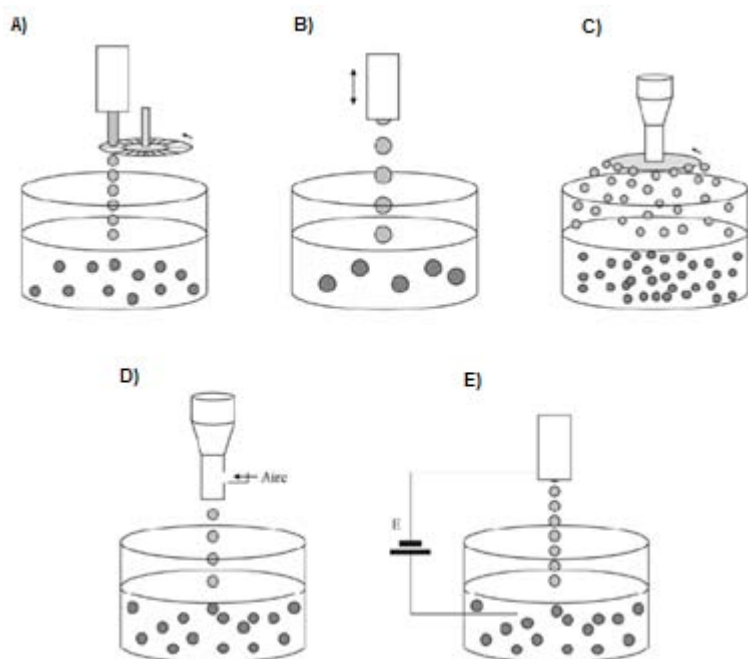
Es la técnica más estudiada y antigua para producir cápsulas con polisacáridos como el alginato debido a su bajo costo y simplicidad<sup>84</sup>. Consiste en la formación de gotas de la solución de alginato que contiene el componente a encapsular al hacer pasar dicha solución por un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de goteo controlado. Estas gotas caen sobre un baño que contiene la fuente del ión divalente, quien induce la gelificación mediante el mecanismo de gelificación externa<sup>79</sup>.

Cuando se trabaja a escala de laboratorio se utiliza una jeringa, cuando se trabaja a escala piloto se utiliza un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de conteo controlada. El tamaño de las perlas puede controlarse con la variación del diámetro de la aguja o de la boquilla del dispositivo extrusor lo que da origen a varios sistemas de extrusión<sup>76, 85</sup>.

Estudios recientes, demuestran que la aplicación de esta técnica mejora notablemente al incorporar dispositivos extrusores como boquillas múltiples y discos aspersores<sup>86</sup>, inyectores con impulsos vibratorios<sup>87</sup> e incluso con flujo de aire incorporado<sup>88</sup>, todos diseñados bajo el mismo objetivo, la producción masiva de microcápsulas, en la figura 18 se muestra diferentes tipos de dispositivos extrusores para la preparación de microcápsulas<sup>89</sup>.

Adicionalmente, otros factores que influyen en la forma esférica y tamaño son: la distancia de separación de la boquilla al baño, el efecto de la gravedad y la tensión

superficial de la solución que induce la gelificación<sup>79</sup>. A pesar de todos estos factores, esta técnica ha sido empleada tradicionalmente al permitir la producción de microcápsulas con tamaños uniformes.



**Figura 17.** Tipos de dispositivos extrusores. A) Atomizador con corte sistemático del chorro. B) Boquilla vibratoria. C) Disco atomizador. D) Flujo de aire coaxial. E) Potencial electrostático

[Zuidam, N. J. *et al.* (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. p.16 (Figura 8)].

Adicionalmente estudios han demostrado que esta técnica no causa daño celular por lo que asegura una alta viabilidad de los microorganismos probióticos, además de que puede realizarse bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas y no utiliza solventes tóxicos<sup>75</sup>. Algunos de los inconvenientes de esta técnica es la baja capacidad de producción y el tamaño de las partículas que se obtienen<sup>77</sup>.

#### 4.2.2. Secado por atomización

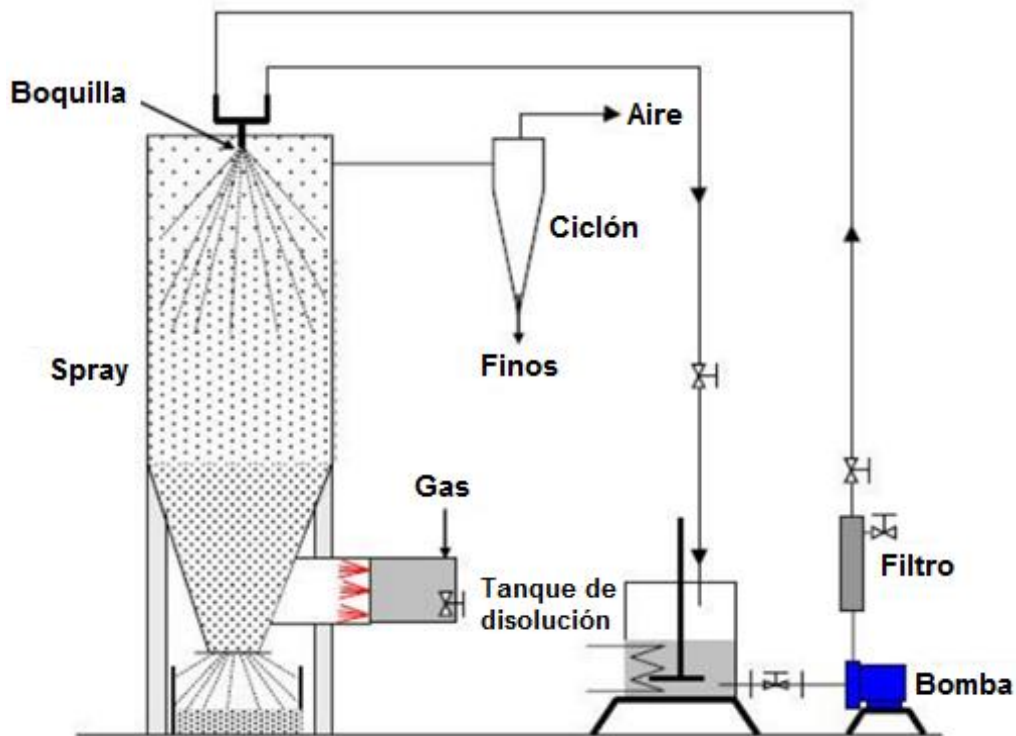
El secado por spray o atomización ha sido una tecnología ampliamente usada por la industria debido a su reproducibilidad y economía<sup>76, 90</sup>. Su aplicación principal se ha usado para enmascarar sabores, aromas y la encapsulación de vitaminas. El procedimiento consiste en la preparación de una emulsión o suspensión que contenga al compuesto a encapsular y el material polimérico, el cual es atomizado dentro de una cámara con un gas caliente, generalmente aire, el cual promueve la evaporación del agua, permitiendo que el compuesto a encapsular quede atrapado

dentro del material encapsulante dando lugar a la formación de micropartículas, las micropartículas en polvo obtenidas son separadas del gas a bajas temperaturas<sup>76</sup>.

Es una técnica muy simple, además es apropiado para materiales sensibles a altas temperaturas debido a que los tiempos de exposición son muy cortos (5 a 30 s)<sup>91</sup>. Estudios recientes reportan que se ha empleado en la microencapsulación de probióticos incluyendo bacterias ácido lácticas<sup>95, 96</sup> y bifidobacterias<sup>97, 98</sup>.

La preparación de microcápsulas con esta técnica requiere primeramente, la selección del tipo de atomizador considerando la viscosidad de la solución, así como el tamaño de gota deseado a fin de generar la mayor área de contacto entre el aire caliente y el líquido. La forma de contacto entre las gotas y el aire caliente dependiendo de la sensibilidad al calor del producto, el tiempo de contacto gota-aire, la temperatura del aire. Por lo anterior se sugiere el uso de agentes termoprotectores como la inulina que minimiza el estrés mecánico, oxidativo y osmótico al que pueden ser sometidos el compuesto a encapsular después del secado y durante el almacenamiento<sup>92, 93</sup>, así como el tipo de método de separación de los sólidos secos<sup>94</sup>. Básicamente su aplicación con alginato se resume en tres etapas: dispersión del principio activo en el alginato, atomización de la mezcla y deshidratación<sup>89</sup>.

A pesar que esta técnica se ha limitado a formulaciones acuosas, trabajos recientes han demostrado que la combinación de distintos biopolímeros como las gomas (carragenina, goma arábiga y alginato), proteínas (suero, caseinatos y gelatina), maltodextrinas, dextrosas, ceras y sus mezclas, creando nuevas matrices poliméricas altamente versátiles y que por tanto facilitan ser empleadas en otras formulaciones.



**Figura 18.** Sistema de encapsulación por atomización

[Velasco, J. W., *et al.* (2014). Simulation and operation of a spray dryer for the production of sodium pentabrate. *Información Tecnológica*, p.92 (Figura 5)]

#### 4.2.3. Aspersión por congelamiento o por enfriamiento.

También llamada (Spray cooling/ chilling), esta técnica es semejante a la encapsulación por secado por aspersión: el núcleo se dispersa en un medio líquido y se somete posteriormente a una atomización.

Las técnicas de aspersión a bajas temperaturas son tecnologías que producen agentes activos recubiertos con lípidos y se pueden aplicar en los siguientes casos:

1. La dispersión de ingredientes solubles en una grasa o cera fundida
2. La disolución del agente en el lípido.
3. La suspensión del principio activo como partículas sólidas o como emulsión acuosa.



La diferencia de estas dos técnicas es determinada por el punto de fusión de los lípidos. Se emplea el material de recubrimiento fundido y al ser sometido a atomización se produce un enfriamiento que provoca su congelamiento y se solidifica produciendo la microencapsulación de la sustancia que se encuentra dispersa.

Por ejemplo, en la aspersion en frío, la dispersión se realiza a través de inyectores con calefacción dentro de una cámara a temperatura ambiente o temperatura de refrigeración; si la cámara está a temperatura ambiente, el material de encapsulación tendría un punto de fusión entre 45 y 122°C, y si la cámara esta fría, los materiales fundirían entre 32-42°C. En este caso, las partículas se mantienen a una temperatura baja en una configuración similar a la aspersion en lecho fluidizado. Esta técnica posibilita altos rendimientos y se puede correr en los modos de procesamiento en lote o continuos<sup>99</sup>.

La limitante principal de esta técnica es que requiere un manejo y condiciones de almacenaje especiales; así como cierta parte del material a encapsular puede quedar en la superficie de la microcápsula; sin embargo se pueden lograr esferas perfectas que permiten el libre flujo de los polvos<sup>100</sup>.

Esta técnica se ha utilizado para encapsular vitaminas hidrosolubles, sales de hierro, materiales líquidos a bajas temperaturas, materiales sensibles al calor y aquellos materiales no solubles en el solvente.

## Capítulo IV

### 5. Mecanismos de liberación

Los mecanismos más importantes que regulan la velocidad de liberación de un compuesto activo, son: difusión, hinchamiento, biodegradación/ erosión y presión osmótica en el caso de los sistemas osmóticos. La relevancia de cada uno de ellos dependerá en gran medida de la composición del medicamento y el medio circundante, por lo que el agente activo puede ser liberado al medio por uno o por varios mecanismos actuando simultáneamente<sup>101</sup>.

#### 5.1. Liberación por difusión

El fenómeno de difusión se da a partir de la liberación de agentes activos a través de el/los polímeros, mediante una transferencia de masa en la interfase polímero/líquido<sup>102</sup>. La migración del compuesto activo al medio de liberación puede darse directamente a través de la estructura molecular del polímero o bien a través de macro o microporos existentes en la matriz polimérica<sup>103</sup>. El modelo más común para estudiar la difusión es el propuesto en las leyes de Fick:

##### • Primera ley de Fick

La primera ley de Fick establece que en estado estacionario, la velocidad de transferencia de una sustancia que difunde a través de la unidad de área de una sección, es proporcional al gradiente de concentración (Ec.1).

$$J = -D \cdot \left( \frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad \text{Ec. 1}$$

En esta ecuación  $J$  es la velocidad de flujo por unidad de área,  $C$  es la concentración del compuesto que difunde,  $x$  es la dirección espacial normal a la sección y  $D$  el coeficiente de difusión.

##### • Segunda ley de Fick

La mayoría de las situaciones prácticas de difusión son en estado no estacionario. Es decir, el flujo de difusión y el gradiente de difusión varían con el tiempo. En

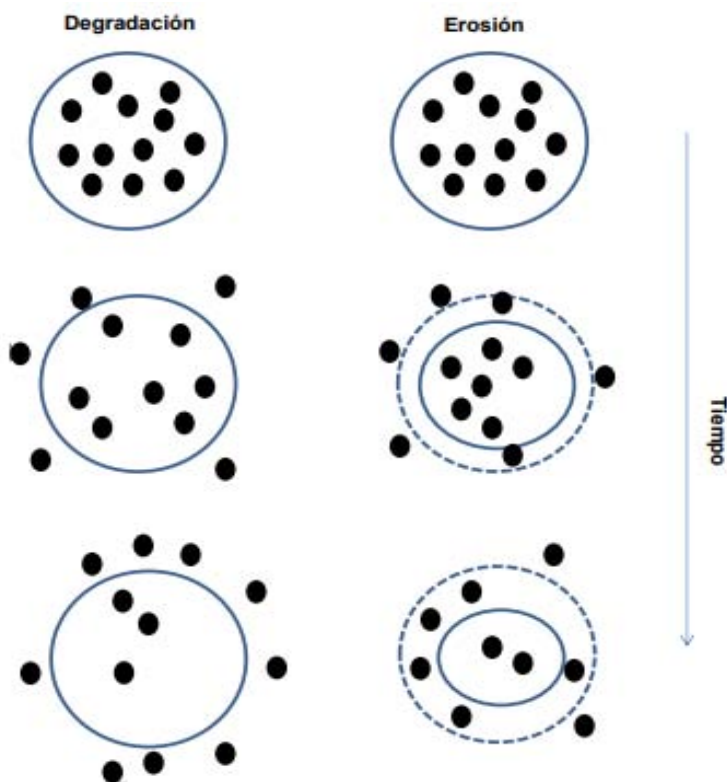
condiciones no estacionarias el uso de la segunda ley de Fick resulta más apropiado (Ec. 2).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \cdot \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) \quad \text{Ec. 2}$$

En esta ecuación  $C$  es la concentración de la especie que difunde,  $t$  el tiempo,  $D$  el coeficiente de difusión y  $(x, y \text{ y } z)$  las coordenadas espaciales. Las condiciones iniciales y de frontera a tener en cuenta para la resolución de las ecuaciones varían para cada tipo de sistema de liberación<sup>103</sup>.

## 5.2. Liberación por degradación o erosión

Los mecanismos de degradación/erosión, tienen mayor importancia en sistemas en los que el compuesto activo se encuentra disperso dentro del polímero y se libera a



**Figura 19.** Esquema de mecanismos de degradación/erosión en cápsulas.

[Lao, L. L., *et al.* (2011). Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1), p.35 (Figura 2)]

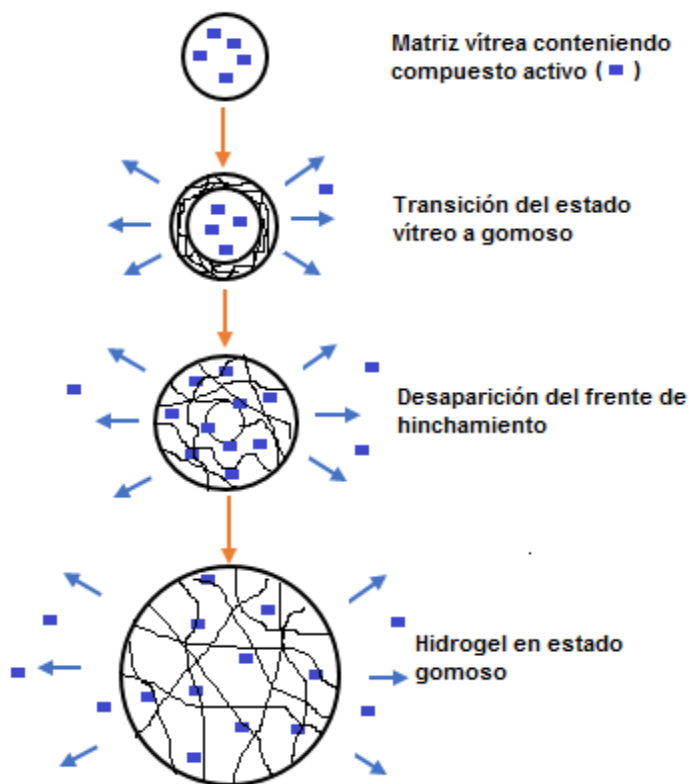
medida que éste se degrada<sup>104</sup>. En la literatura se suelen usar dichos términos indistintamente, no obstante para evitar confusiones algunos autores han establecido claras diferencias: la degradación es el proceso mediante el cual las cadenas del polímero matriz sufren ruptura o hidrólisis de sus enlaces, generándose cadenas más cortas, sin pérdida de materia. Mientras que la erosión está referida a la disminución de masa de

la matriz, la cual puede deberse a la pérdida de monómeros y otros productos solubles en el medio circundante<sup>105</sup>.

La degradación ocurre de forma homogénea en toda la matriz, mientras que la erosión se limita a la capa superficial del sistema<sup>106, 107</sup>. (Fig.20).

### 5.3. Liberación por hinchamiento

En el mecanismo de liberación por hinchamiento, el polímero se hincha debido a la adsorción del medio y el principio activo puede difundir a través de la zona de la matriz que ha sufrido hinchamiento<sup>106, 108</sup> (Fig. 29)



**Figura 20.** Esquema del mecanismo de liberación por hinchamiento.

[Peppas, N. A. *et al.* (1993). Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11(1), p.17 (Figura 3)]

En este mecanismo las matrices pueden someterse a una transición de fase desde un estado vítreo, donde las moléculas atrapadas poseen poca movilidad, a un estado gomoso, de mayor movilidad donde las moléculas difunden con rapidez. La velocidad de liberación del compuesto activo depende de la velocidad de hinchamiento del gel. Por lo que el tiempo de difusión y el tiempo de relajación de las cadenas son dos parámetros fundamentales en los mecanismos de liberación de sistemas poliméricos susceptibles de sufrir hinchamiento<sup>109</sup>.

## 6. Sistemas de liberación de fármacos

La forma farmacéutica es la disposición individualizada a la que se adaptan los principios activos y excipientes para poder ser administrados al organismo, permitiendo la adecuada dosificación, conservación y administración del fármaco.

En la actualidad los principios activos pueden administrarse al organismo en sistemas convencionales, que son los típicamente empleados, pero también pueden variarse algunos aspectos de su liberación, en un sistema no convencional.

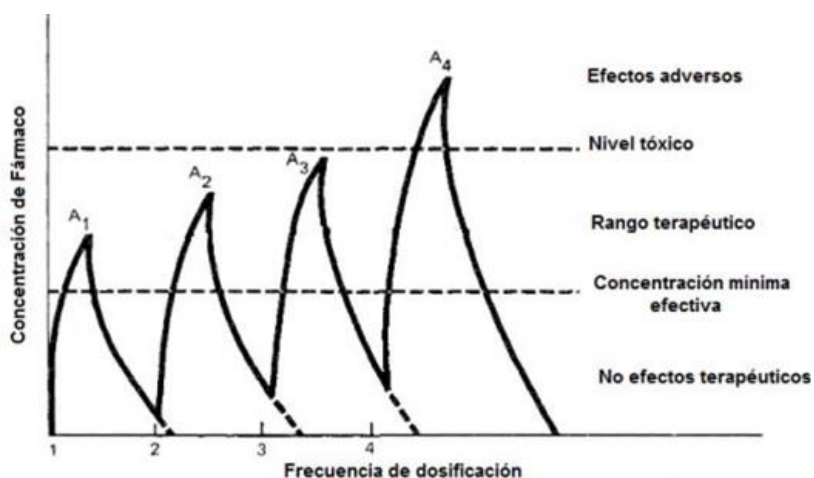
### 6.1. Sistemas convencionales

Existen muchas desventajas asociadas al empleo de las formas farmacéuticas convencionales, tales como su no especificidad, ligada a su liberación inmediata

Los sistemas o formas farmacéuticas de tipo convencional o de liberación inmediata (FLI o SLI). siguen la vía que implica la liberación del fármaco antes de su distribución, por lo que ésta no es específica. De este modo, el principio activo se distribuye en el organismo según sus propiedades físicas, tales como solubilidad, coeficiente de partición y carga. En consecuencia, los fármacos pueden alcanzar una gran variedad de sitios, pudiendo llegar a ejercer una acción indeseada o nociva, que se traduce en efectos secundarios negativos<sup>110</sup>.

Las formas farmacéuticas convencionales no tienen la capacidad para controlar la liberación temporal. Existen diversas estrategias para intentar mantener los niveles de fármaco en la sangre dentro del rango terapéutico por largos periodos, por

ejemplo, aumentar la dosis inicial, sin embargo pueden alcanzarse niveles tóxicos en tiempos tempranos, lo cual resulta poco práctico. Otra alternativa es una terapia multidosis, que consiste en la administración repetida de principio activo, a través de un intervalo de dosis frecuente. Existen varios problemas potenciales ligados a la terapia de dosis múltiple. En primer término, si el intervalo entre dosis no es apropiado para la vida media del fármaco, pueden aparecer grandes picos y valles en los niveles sanguíneos del fármaco, además que el nivel de fármaco en la sangre podría no encontrarse dentro del rango terapéutico en tiempos tempranos, lo cual debe considerarse en algunos estados patológicos. Finalmente, se dificulta el cumplimiento del paciente con el régimen multidosis, lo cual puede resultar en el fracaso de esta estrategia<sup>111</sup>. Figura 22.



**Figura 21.** Perfil de concentración hipotética de fármaco con liberación inmediata con terapia multidosis

[Chien, Y. *et al.* (1991) *Novel Drug Delivery Systems* 2 edition Informa Medical p2 (Imagen 1)]

## 6.2. Sistemas no convencionales

Los principales inconvenientes que representan las formas convencionales han creado la necesidad de generar nuevas estrategias farmacéuticas, que sean capaces de brindar una acción prolongada y específica del fármaco en cuestión.

Las formas farmacéuticas no convencionales pueden diseñarse de manera que se disminuya la velocidad de liberación del fármaco o que la liberación de éste se dé después de alcanzar una zona específica de acuerdo a las características físicas, químicas o biológicas de la enfermedad o del principio activo.

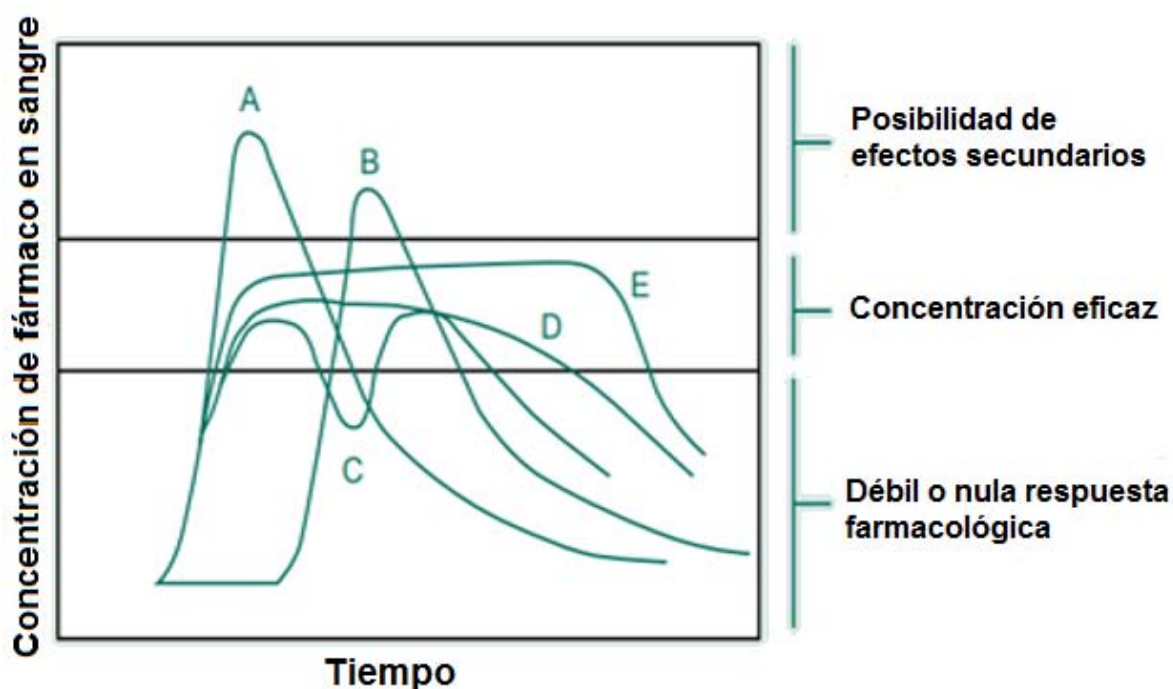
### 6.2.1. Liberación modificada

Las formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM), también llamadas de liberación controlada, son aquellas en las que la velocidad, el lugar o el momento de liberación del principio activo es diferente de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía. La liberación modificada puede ser retardada y extendida, prolongada o sostenida<sup>114</sup>.

#### 6.2.1.1. Liberación retardada

Las formas farmacéuticas de liberación retardada son sistemas que liberan al principio activo en un momento no inmediatamente a su administración.

Por lo general, se utilizan para proteger al fármaco de la degradación ocasionada por el medio ácido del estómago o para proteger al estómago de la irritación por el principio activo. Además, en otras vías de administración como la intravenosa que se puede controlar la liberación del fármaco en pH específicos. (Figura 23)



**Figura 22.** Perfiles de concentración plasmática. A) Forma convencional, B) Acción retardada, C) Acción repetida, D) Acción prolongada, E) Acción sostenida.

[Suñé, N. *et al.* (2002) Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración, En: Formación continuada para farmacéuticos de hospital. Fundación Promoción Médica, p.32 (Figura 1)]

#### 6.2.1.2. Liberación extendida, prolongada o sostenida

Los sistemas de liberación prolongada permiten que el fármaco se libere durante periodos de tiempo alargados. De este modo, al extender el perfil de liberación de un principio activo, la frecuencia de dosificación puede reducirse. (Figura 31)

Cualquier medicamento formulado como FLM debe demostrar en ensayos clínicos controlados una eficacia similar o superior, o bien un perfil de seguridad/tolerabilidad más favorable o igual de eficacia, comparado con la forma de liberación inmediata.

#### 6.3. Sistemas de velocidad preprogramada

En este grupo de sistemas farmacéuticos, la liberación del principio activo es preprogramada a una velocidad específica. Las características de estos sistemas de liberación permiten su clasificación en sistemas reservorios o capsulares y matriciales o monolíticos<sup>112</sup>.

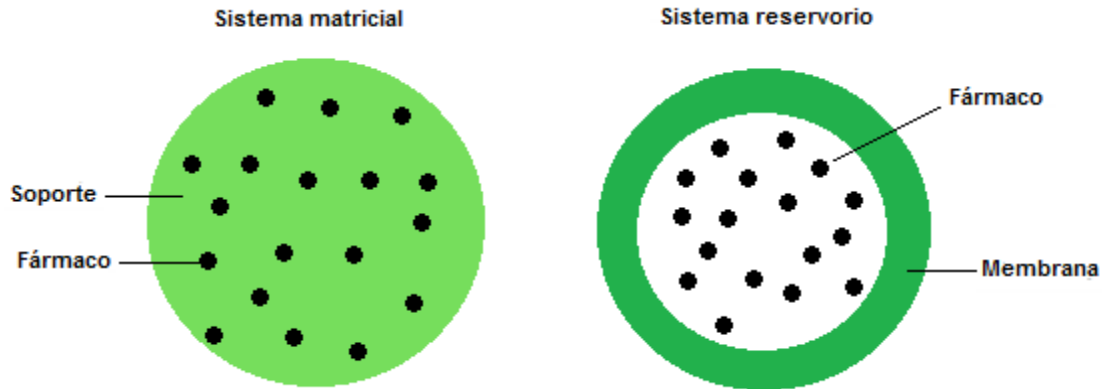
##### 6.3.1. Sistemas reservorios

Los sistemas reservorios , también llamados capsulares constan de un compartimento donde se aloja el fármaco, el cual está rodeado por una membrana o cápsula. El grado de liberación del principio activo depende de la naturaleza de la membrana, del tipo de material empleado y su grosor, así como de las características fisicoquímicas del fármaco y su interacción con la membrana<sup>115</sup>.  
Figura 32.

##### 6.3.2. Sistemas matriciales

Los sistemas matriciales o sistemas monolíticos están compuestos por el fármaco homogéneamente disperso en un soporte que controla su liberación. De acuerdo al material que los conforma y a su mecanismo de liberación , estos sistemas pueden ser inertes , hinchables y erosionables<sup>116</sup>.





**Figura 23.** Esquema comparativo de un sistema matricial o reservorio.

[Kushal, M., et al. (2013). Oral controlled release drug delivery system. *International Research Journal of Pharmacy*. 4(3), p.75, (Figura 4-5)]

#### 6.3.2.1. Matrices inertes

También conocidas como plasticas. Son matrices no solubles ni desintegrables, compuestas por una red porosa. Para su disolución se requiere de la disolución del fármaco, una vez disuelto, penetra en la pared porosa del sistema por capilaridad, difundiendo a través de los canales de la misma<sup>116</sup>.

#### 6.3.2.2. Matrices hinchables.

Por lo general están compuestas de materiales hidrofílicos. Cuando entran en contacto con el agua o fluidos biológicos, forman una barrera de gel, denominada frente de hinchamiento, que controla la velocidad de salida del fármaco, el cual se disuelve y difunde hacia el exterior. Aunado al proceso de difusión, se sabe que puede existir un proceso de erosión de la matriz<sup>117</sup>. Figura 24.

#### 6.3.2.3. Matrices erosionables

Normalmente las conforman matrices lipídicas, su liberación se da por un proceso de degradación de la superficie por lipólisis que conlleva a la formación de canales por donde difunde el fármaco<sup>116</sup>.

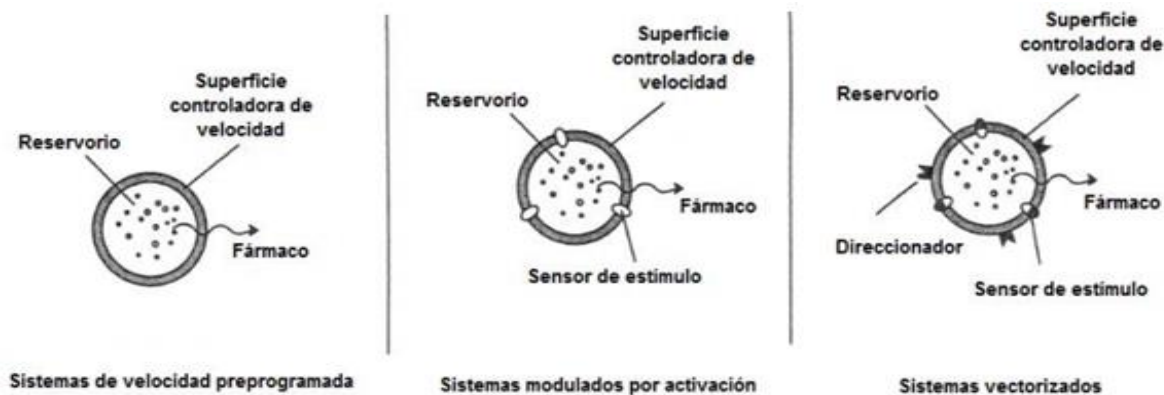
#### 6.4. Sistemas modulados por activación

Estos sistemas son activados por un estímulo físico, químico o bioquímico, mismo que es seleccionado de acuerdo a la naturaleza y característica de la patología a la cual son destinados. De esta forma la liberación del fármaco es exclusiva a las condiciones a las cuales es programada<sup>112</sup>.

#### 6.5. Sistemas vectorizados

Este tipo de sistema contienen un elemento direccionador que lo lleva a un sitio específico, en el cual libera su contenido<sup>118</sup>. La especificidad de acción del vector, mejora la actividad terapéutica del fármaco con dosis menores, además evita la generación de efectos adversos. (Figura 34)

En varias enfermedades sistémicas existen cambios estructurales en el microambiente del tejido dañado que permiten el direccionamiento de agentes terapéuticos<sup>119</sup>.



**Figura 24.** Tipos de sistemas de liberación controlada.

[Chien, Y. (1991) *Novel Drug Delivery Systems*. 2ª edición Informa Medical p. 4 (Imagen 3)]

Respecto a la naturaleza de los vectores, pueden ser biológicos y fisicoquímicos. Los vectores biológicos (eritrocitos, bacterias, virus, priones) presentan dos claros problemas, el primero es debido a que al ser material biológico va a existir una heterogeneidad en los lotes, el segundo es económico debido a las técnicas de confinamiento, de preparación, cumplimiento de normas, limpieza y formación de

personal para llevarlos a cabo. Por ello, los vectores más prometedores y con gran potencial en la actualidad son los fisicoquímicos, que se pueden clasificar en tres generaciones: a la primera generación pertenecen las micropartículas; las nanopartículas y liposomas son de segunda generación, y de tercera generación los vectores piloteables, autopilotados, furtivos y de liberación específica<sup>120, 121</sup>.

#### 6.5.1. Vehículos y acarreadores.

Como parte de los sistemas vectorizados se encuentran los vehículos y acarreadores, que son sistemas que contienen al fármaco y son capaces de protegerlo y transportarlo a un sitio específico donde este se liberara<sup>122</sup>. Los vehículos usados deben ser preferentemente biodegradables o fácilmente eliminables del cuerpo, por aclaramiento renal. Así mismo deben generarse por métodos reproducibles, económicamente viables y escalables<sup>123</sup>. De acuerdo a sus características y composición, estos sistemas se clasifican en sistemas moleculares y coloidales.

Los sistemas moleculares, su estructura básica se basa en una molécula *per se*, tales como las ciclodextrinas, de las cuales se habló en capítulo anterior. Mientras que los sistemas coloidales se pueden clasificar en partículas y liposomas.

- Partículas

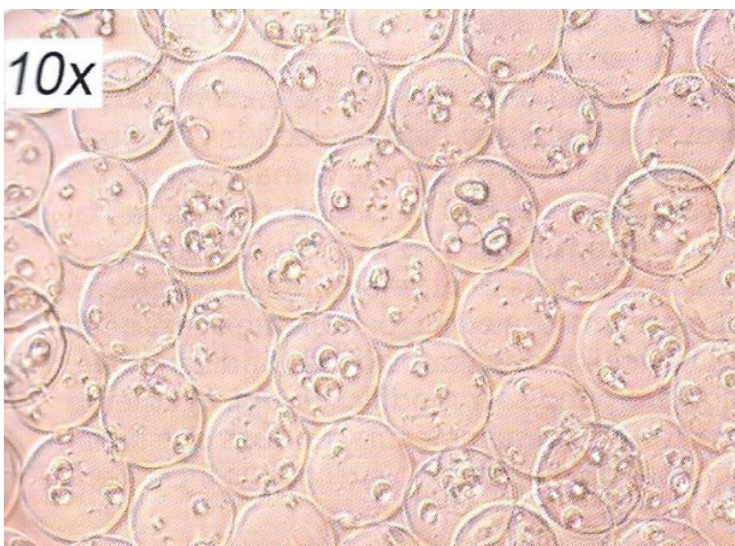
Existen diversos tipos de partículas poliméricas empleadas en la administración de medicamentos. En función de su tamaño, se pueden clasificar en micro y nanopartículas. Las micropartículas son partículas poliméricas con tamaños que oscilan desde 1 a 250  $\mu\text{m}$  (idealmente diámetros  $<125 \mu\text{m}$ ). Dentro de este grupo se incluyen las microcápsulas y las microesferas. Las nanopartículas son sistemas poliméricos submicrónicos ( $<1 \mu\text{m}$ ). De acuerdo al proceso empleado para preparar nanopartículas, pueden obtenerse nanocápsulas o nanoesferas<sup>124</sup>.

El tamaño de partícula es una característica importante de los sistemas de liberación polimérica<sup>125</sup>. Las partículas poliméricas por lo general están cargadas de acuerdo

a las características eléctricas de las moléculas usadas. Las propiedades eléctricas son usualmente caracterizadas por su potencial zeta<sup>126</sup>.

La morfología y estado de agregación de las partículas han sido estudiadas por diferentes grupos de investigadores usando distintas formas de microscopía. La microscopía convencional óptica es usada para estudiar la microestructura de las partículas<sup>127</sup>. Las tinciones y fluorescencias pueden ayudar a la visualización de los componentes específicos. La microscopía confocal se usa con muestras fluorescentes para la obtención de mejores imágenes en 3D. La microscopía electrónica de barrido (SEM), permite información de las características superficiales de las partículas, como composición y topología<sup>125</sup>. ( Figura 28).

Es un reto determinar la composición y distribución del principio activo en las partículas debido al pequeño tamaño en cuestión. Algunas de las técnicas empleadas para estos propósitos incluyen la espectroscopia IR y difracción de rayos X de bajo ángulo, para el análisis químico de la composición superficial. DSC se utiliza para detectar cristales en un compuesto encapsulado, además para la detección de interacciones entre polímeros que componen a la partícula<sup>126</sup>.



**Figura 25.** Microcápsulas de alginato poli- L-lisina alginato de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. Fotografía de microscopía óptica.

[Hernandez, R. M., Orive, *et al*, (2011). *Utilización de la microencapsulación de célula en terapias avanzadas: ¿Una alternativa para terapia ocular?*, Visión, 39, p. 30. (Figura 4)]

En algunos casos las partículas son reconocidas, capturadas y eliminadas rápidamente de la circulación sanguínea por macrófagos. Una de las estrategias que se han usado es la PEGilación, método para evadir la captura de las partículas y que permanezcan más tiempo en circulación sin ser eliminadas ya que presentan algunas peculiaridades destacables como: reducción de la inmunogenicidad y de la antigenicidad, mejoría del perfil de toxicidad, menor susceptibilidad a la degradación enzimática, mayor estabilidad física y térmica, aumento de la solubilidad, reducción del aclaramiento plasmático con el correspondiente aumento de la semivida de eliminación<sup>128</sup>.

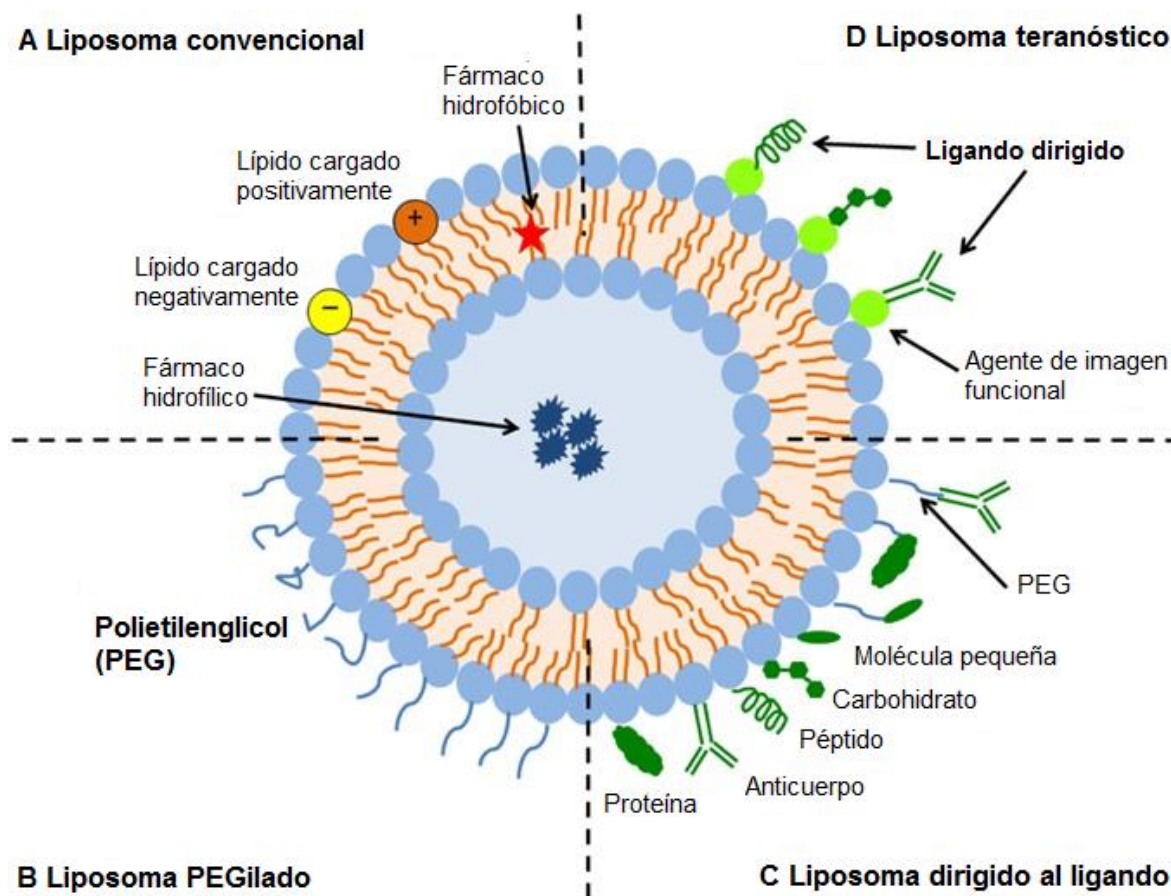
Estos efectos se producen por la modificación de diversas propiedades fisicoquímicas que incluyen cambios conformacionales, interferencias estéricas, cambios en las propiedades de fijación electrostática, incremento de la lipofilia, etc. Estas modificaciones suponen cambios en el comportamiento de la molécula pegilada, y especialmente de su proceso farmacocinético. Dos de las cuestiones de mayor interés son la gran estabilidad del enlace del PEG-molécula y el aumento del tamaño de la molécula una vez pegilada.

La primera cuestión justifica que la pegilación resulta una modificación casi irreversible. Una vez pegilado, el fármaco se comporta como un nuevo derivado y así el derivado pegilado se absorbe, distribuye, elimina y produce los efectos farmacológicos que son inherentes a su estructura y que no tienen por qué coincidir en su totalidad con los de la molécula no pegilada. La segunda cuestión, relacionada con el aumento del tamaño y con los otros cambios mencionados, va a conducir a las modificaciones farmacocinéticas que presentan los derivados pegilados, a todos los niveles de este proceso. La absorción tras la administración por vía subcutánea o intramuscular se ve notablemente enlentecida en relación con el tamaño elevado de la molécula<sup>128, 130</sup>.

- Liposomas

Consisten en un lípido bicapa que puede estar compuesto de lípidos catiónicos, aniónicos o neutros (fosfo) y colesterol, que encierra un núcleo acuoso. Tanto la

bicapa lipídica como la acuosa el espacio puede incorporar compuestos hidrofóbicos o hidrofílicos, respectivamente. Para modificar las características fisicoquímicas de los sistemas liposomales y contrarrestar problemas de fagocitosis por opsonización se han desarrollado liposomas pegilados mediante la adición de un recubrimiento de polímero hidrófilo, polietilenglicol (PEG), a la superficie del liposoma para conferir estabilización estérica tanto los liposomas clásicos como los pegilados van a conseguir una acumulación de sustancia activa encapsulada en el sitio de interés por las propias características anatómicas y fisiopatológicas del medio, es lo que se denomina EPR (efecto de permeación y retención aumentada) que es un tipo de vectorización pasiva vectorización pasiva<sup>129</sup>.



**Figura 26.** Representación esquemática de los diferentes tipos de sistemas de administración de fármacos liposómicos.

[Sercombe, L. *et al.* (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery, *Frontiers in Pharmacology*, 286(6), p.2 (Figura 1)]

Con el fin de conseguir la llegada y penetración de los liposomas en el sitio concreto, se ha desarrollado la incorporación de ciertas moléculas en la superficie del liposoma, que interaccionarán con un receptor concreto del sitio diana. Esto es lo que llamamos vectorización activa. Los cuales son liposomas dirigidos a ligando, empleados para la dirección específica mediante la unión de ligandos (por ejemplo, anticuerpos, péptidos y carbohidratos) a su superficie o al extremo terminal de las cadenas de PEG unidas. Así como los liposomas de teranóstico, sistema que consiste en una nanopartículas, un elemento de direccionamiento, un componente de formación de imágenes y un componente terapéutico<sup>131, 132</sup>.



## Capítulo V

### 7. Aplicaciones del alginato en la administración de fármacos

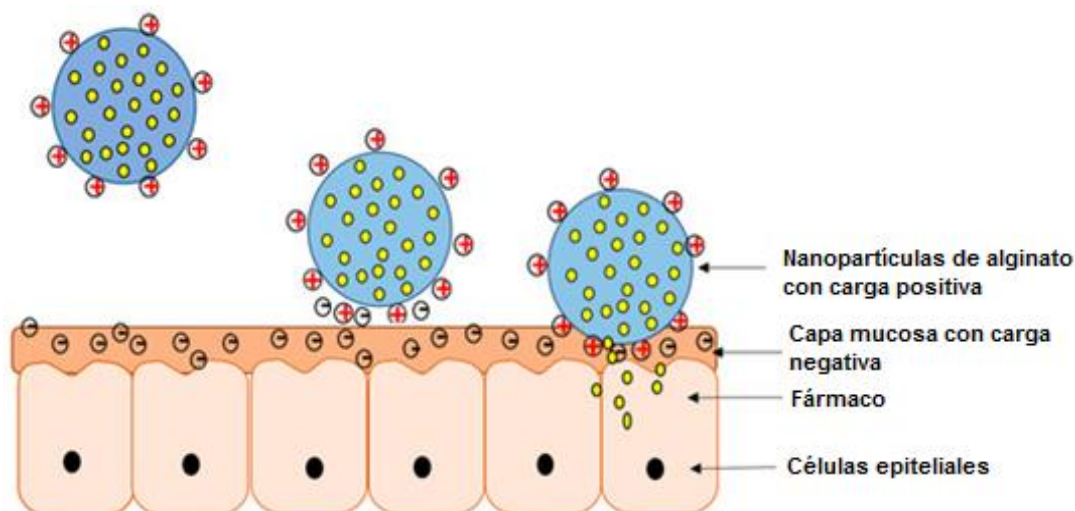
El alginato en el área biomédica ha sido empleado por décadas en diferentes aplicaciones, basándose en las múltiples y favorables propiedades, de las cuales destaca la biocompatibilidad, biodegradabilidad y ausencia de toxicidad, entre otras. Una de sus aplicaciones es fungiendo como agente encapsulante de fármacos, células, bacterias y/o diversas biomoléculas, siendo parte de un sistema innovador de administración. El presente capítulo se centrará en micropartículas y nanopartículas ya que hoy en día representan los desarrollos más innovadores y prometedores.

#### 7.1. Microcápsulas de alginato

Para prolongar el tiempo de residencia de los sistemas de liberación de fármacos se han utilizado varias técnicas: flotabilidad, mucoadhesión, hinchamiento, etc. La mucoadhesión se puede producir mediante uniones covalentes, electrostáticas, hidrofóbicas, o puentes de hidrógeno. Se ha reportado que polímeros iónicos poseen una mayor adhesión que polímeros neutros, y a medida que se incrementa la densidad de carga pueden ser más mucoadhesivos. Esto está ligado directamente a las características de la cubierta mucosa que recubre al tracto gastrointestinal. (Figura 27).

Esta consiste principalmente en glicoproteínas que contienen grupos éter sulfato y ácido siálico, los que le otorgan la característica de ser altamente negativa. El alginato es un polianión mucoadhesivo y estudios han mostrado que tiene una mayor fuerza de adhesión en comparación con otros polímeros como por carboximetilcelulosa. Además, en presencia de quitosano ha mostrado tener excelentes propiedades bioadhesivas, las cuales han manifestado una fuerte afinidad por la mucosa gástrica<sup>133</sup>.





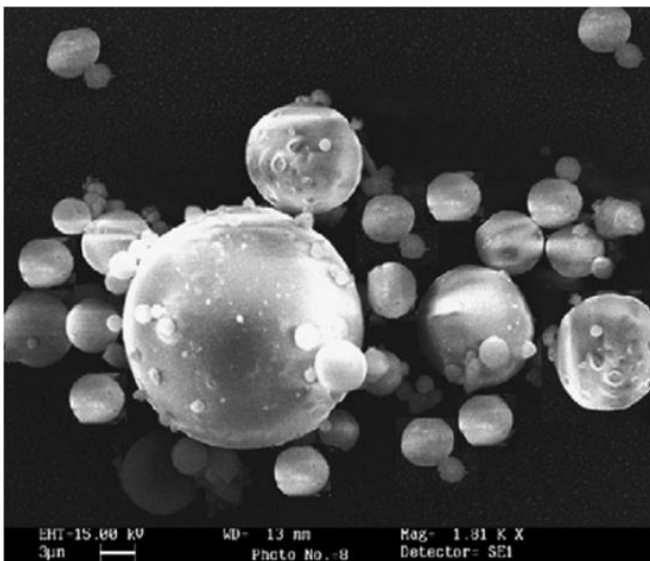
**Figura 27.** Representación esquemática de la estructura e interacción de las nanopartículas cargadas de quitosano con la capa de moco.

[Mohammed, M. A., (2017). *An Overview of chitosan nanoparticles and its application in nonparenteral drug delivery*. *Pharmaceutics*. 9(4); 53 (Figura 4)].

Esta característica del alginato puede ser de gran utilidad para sistemas de liberación de fármacos en tejidos mucosos como por ejemplo el tracto gastrointestinal, y aumentar el tiempo de residencia en las superficies de absorción de fármacos, mejorando su biodisponibilidad y efectividad<sup>134</sup>, así como protección en el estómago y prevenir los efectos nocivos del fármaco encapsulado en la mucosa gastrointestinal, como la ulcerogénicidad del diclofenaco sódico y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES)<sup>135</sup>.

Hoy, nuevas investigaciones apuntan al uso del alginato, en la forma de partículas de tamaño controlado de micro o nano-escala, compuestas de una cubierta mono o multicapa del biopolímero permitiendo disponer de diferentes vías de administración.

Teniendo la capacidad de encapsular eficazmente fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos<sup>136, 137, 138, 139</sup>.



**Figura 28.** Micropartículas alginato cargadas de isoniazida obtenidas por un método de emulsión simple.

[Sosnik, A., et al., (2014). *Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art*. ISRN Pharmaceutics. 2014; 17 (Figura 13)].

Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Sosnik y cols. Donde estudiaron la encapsulación con alginato de la isoniazida, un fármaco antituberculosis soluble en agua, para la liberación entérica empleando una técnica de emulsión con una eficacia de encapsulación del 91% pero la viscosidad de las soluciones de alginato fue relativamente alta poniendo en peligro la producción de micropartículas obteniendo una amplia distribución de tamaño de partícula (Figura 28)<sup>136</sup>.

Por el contrario, los fármacos hidrofóbicos se pueden incorporar en forma de pequeños cristales homogéneamente dispersos en la matriz alginato, como se informó para el fármaco hipoglucémico gliclazida<sup>137</sup> y la prednisolona antiinflamatoria<sup>139</sup>.

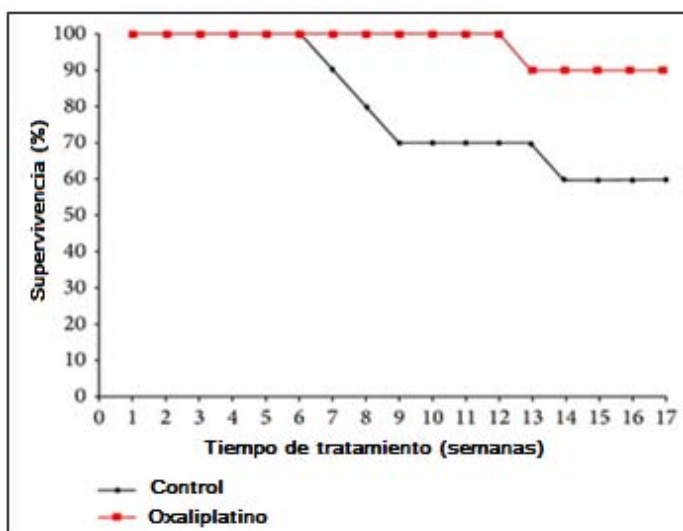
## 7.2. Microcápsulas de alginato recubiertas con polímeros policatiónicos

Como se expuso anteriormente, una de las ventajas de la microencapsulación de moléculas activas en microcápsulas de alginato de calcio es que el procedimiento se realiza en condiciones moderadas, lo que permite mantener la actividad de moléculas biológicas. Sin embargo, estas microcápsulas tienen la limitación de ser muy porosas, presentado una baja capacidad de retención de las moléculas encapsuladas cuando son expuestas en medios de liberación o en el proceso de formación de las microcápsulas y de sobre manera si éstas son de bajo peso molecular<sup>134</sup>.

Además, estas microcápsulas son inestables en presencia de cationes univalentes provocando su rompimiento y la liberación de las sustancias encapsuladas rápidamente, y además son susceptibles a la erosión.

Para limitar la pérdida de material encapsulado y proteger a las microcápsulas de los fenómenos ya nombrados, éstas pueden ser recubiertas con polímeros policatiónicos (quitosano, poli-L-lisina, etc.) para formar una membrana en la superficie.

Microcápsulas que poseen el centro o núcleo de alginato y una membrana de poliacrilato han sido ampliamente investigadas como inmovilizadores de enzimas<sup>141</sup>, sistemas de liberación de fármacos, para la protección de células y bacterias del ambiente gástrico<sup>140</sup>.



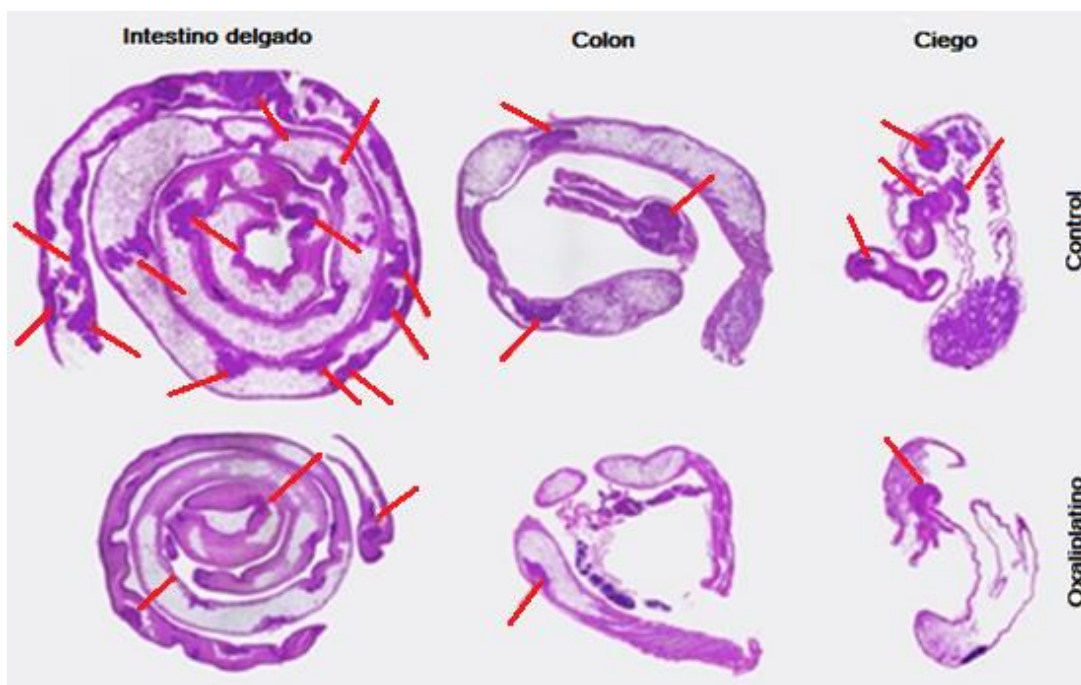
**Figura 29.** Perfil de supervivencia animal durante 17 semanas.

[Urbanska, A., et al., (2012). Therapeutic effect of orally administered microencapsulated oxaliplatin for colorectal cancer, *Biomaterials*, 33; 18 (Figura 6)].

Recientemente, Urbanska y cols. Encapsularon oxaliplatino, un fármaco antitumoral ligeramente soluble, dentro de micropartículas de alginato recubiertas de quitosano para la administración oral para cáncer colorrectal. Esta formulación prolongó significativamente la supervivencia de los ratones con respecto a las micropartículas vacías (Figura 29). El estudio se complementó con histopatología, donde los diferentes compartimentos

gastrointestinales se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los grupos control mostraron adenomas tubulares que sobresalían en la luz del colon y adenomas

polipoideos en el intestino delgado, indicados con flechas rojas, mientras que los grupos de oxaliplatino mostraron microadenomas (Figura 30)<sup>142</sup>.

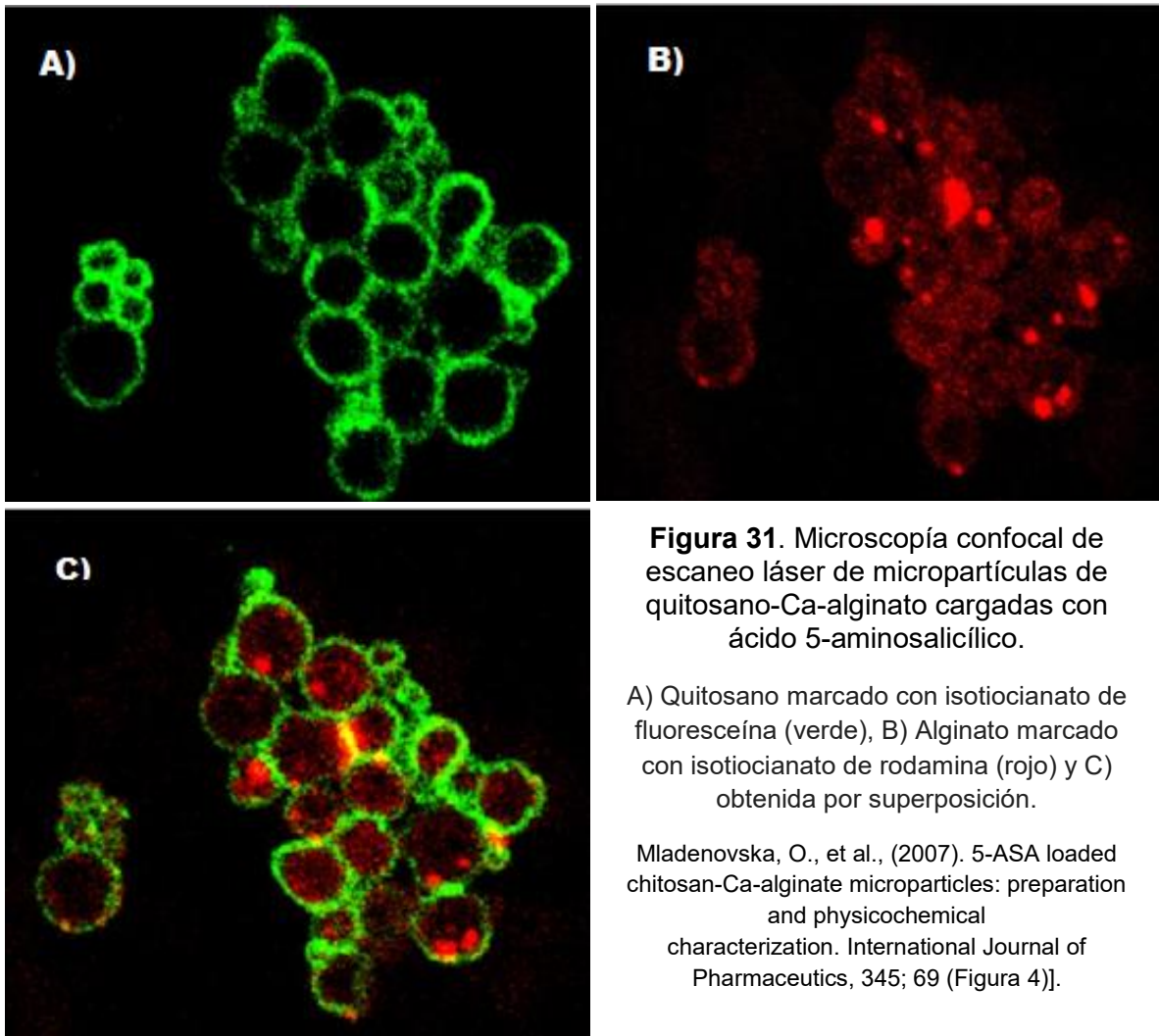


**Figura 30.** Tinción con tejido de hematoxilina y eosina de pólipos de ratones en el intestino delgado, colon y ciego para el control y grupos de tratamiento de oxaliplatino.

[Urbanska, A., et al., (2012). Therapeutic effect of orally administered microencapsulated oxaliplatin for colorectal cancer, *Biomaterials*, 33; 18 (Figura 7)].

Dentro del mismo marco conceptual, Mladenovska y sus colaboradores han desarrollado micropartículas de alginato cargadas con ácido 5-aminosalicílico, un fármaco que presenta propiedades antiinflamatorias, las cuales fueron recubiertas con quitosano, empleando una técnica de secado por atomización para su aplicación en la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>143</sup>.

Además, utilizaron marcadores fluorescentes que les permitió observar la distribución de ambos biopolímeros en las micropartículas (Figura 31). Estos resultados confirmaron que el recubrimiento de quitosano estaba restringido a la superficie de la macropartícula y no penetraba en la matriz



La incrustación de micropartículas de alginato dentro de estructuras monolíticas tales como hidrogeles también se ha evaluado para reducir el efecto de primer paso. Por ejemplo, Zhu et al. Encapsuló el fármaco hidrocloreto de berberina dentro de las microesferas de alginato utilizando un método de emulsificación / gelificación y luego las atrapó en hidrogeles de carboximetil quitosano para producir un nuevo sistema compuesto de administración de fármacos, las partículas aumentaron la resistencia a la compresión del hidrogel<sup>144</sup>.

### 7.3. Micropartículas de Alginato y polímeros policatiónicos

A su vez, la creación de partículas con múltiples capas se proyecta como un sistema de encapsulación aún más interesante de explorar, ya que aumentaría la biodisponibilidad del compuesto encapsulado, mejoraría la capacidad de carga,

eficiencia de encapsulación del agente y retrasaría la erosión de las partículas en el medioambiente gastrointestinal.

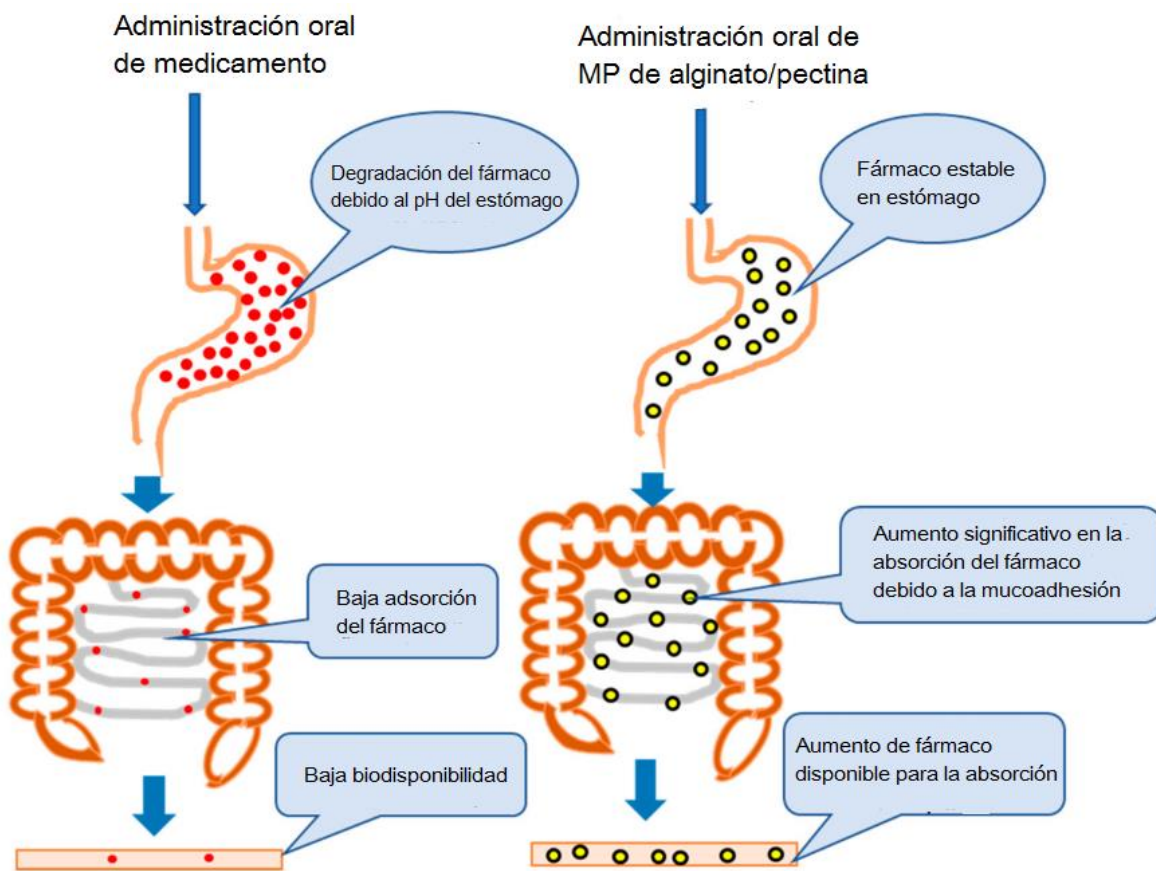
Estudios han reportado la producción de micropartículas de alginato cargadas con fármaco usando microcristales de fármaco como plantilla para producir multicapas de polielectrolito<sup>145, 146</sup>. O formando redes poliméricas intercaladas de alginato con otros polímeros que se reticulan inotrópicamente y / o covalentemente<sup>147, 148, 149</sup>.

Las propiedades del sistema final se pueden ajustar cambiando los parámetros como la relación fármaco / polímero, el peso molecular de los componentes poliméricos, la concentración del polímero contraiónico y los iones de calcio en el medio de endurecimiento y el tiempo de endurecimiento<sup>150</sup>. Permitiendo un mejor control de la porosidad e hinchazón de la matriz y de las propiedades mecánicas y, en consecuencia, de la velocidad de liberación. A continuación se hablara de algunos ejemplos de estos sistemas.

Coppi et al. Produjeron micropartículas de alginato que se entrecruzo con quitosano y calcio con diámetro inferior a 3  $\mu\text{m}$  mediante secado por atomización para la captación de células M de las placas de Peyer con direccionamiento de la polimixina B al tejido linfoide asociado al intestino, resultando ser gastrorresistentes<sup>151</sup>.

Jaya et al. Encapsuló ácido acetilsalicílico dentro de microesferas de alginato / pectina (90  $\mu\text{m}$ ) por medio de un método de atomización y reticulación de calcio y se evaluó el efecto de la composición sobre la cinética de liberación. La liberación fue lenta y controlada en el rango de pH entre 1.2 y 8.2, lo que cubre las condiciones del tracto gastrointestinal. Además, un aumento del contenido de pectina disminuyó la velocidad de liberación. Estos resultados arrojan a la luz la versatilidad de alginato y la capacidad de ajustar el rendimiento biofarmacéutico al modificar las composiciones cualitativas y cuantitativas, las cuales se podrían adaptar dependiendo el punto de entrega de interés. Figura 32<sup>152</sup>





**Figura 32.** Esquema de la eficacia de las MP de alginato/pectina cargadas de fármaco mejorando la absorción del fármaco a través del epitelio intestinal, aumentando así el fármaco disponible para la absorción.

[Jaya, S., et al., (2015). *Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules*. Journal of Microencapsulation. 26; 150 (Figura 5)]

### 7.3.1. Encapsulación de proteínas

La administración oral de péptidos y proteínas sin efectos perjudiciales debido a la rápida liberación y degradación de la carga útil en los fluidos gastrointestinales agresivos es uno de los desafíos del desarrollo farmacéutico contemporáneo. Su encapsulación suele exigir estudios más intensos debido a que los procesos de producción deben ser poco agresivos para mantener inalterada su estructura y función. Además, las composiciones son más complejas y normalmente incorporan diversos polímeros para mejorar la eficacia de la encapsulación.

Yu et al. Informaron sobre micropartículas compuestas de ALG/quitosano y pectina, sensibles al pH para la encapsulación de albúmina sérica bovina como una proteína modelo. El método fue la complejación electrostática de la pectina con quitosano, y la gelificación ionotrópica de alginato con iones de calcio. La liberación a valores de pH de 1.2 y 5.0 fue sustancialmente más lenta que en 7.4, lo que respalda el potencial de este sistema para la administración oral<sup>153</sup>.

En otro trabajo, Chen y sus colegas desarrollaron microcápsulas de complejo de poli (L-histidina) quitosan / alginato para la encapsulación de la hemoglobina. Las micropartículas eran esféricas y con una distribución de tamaño estrecho y una superficie lisa, la eficacia de la encapsulación fue superior al 85% y la carga útil de la proteína de 40-48%. Además, la liberación siguió una cinética de primer orden con cantidades liberadas entre 72% y 87% después de 72 horas a pH 6,8. El principal parámetro que afecta el rendimiento de las micropartículas fue el peso molecular de quitosano que se utilizó en una concentración de 0,05%, sistema útil para mejorar la capacidad de entrega del interferón  $\alpha$  por vía oral sin degradación<sup>154</sup>.

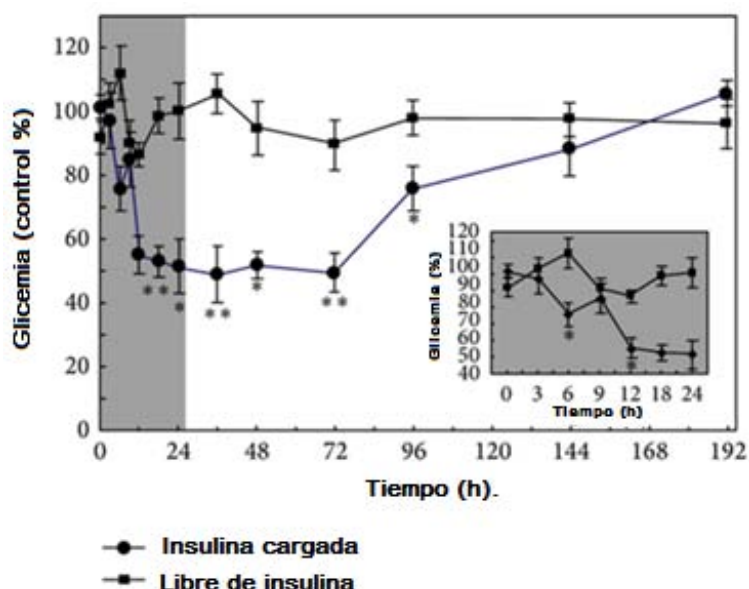
Los sistemas explicados anteriormente proporcionan una liberación sostenida y controlada a lo largo del tiempo según el tamaño de las capas subyacentes. De este modo la obtención de partículas a partir de mezclas de polímeros, abre nuevas oportunidades para la administración de fármacos o principios activos sensibles al medio biológico, permitiendo por ejemplo la administración de proteínas por vía oral, lo cual mejora de manera sustancial su estabilidad y por consiguiente, su biodisponibilidad, disminuyendo la frecuencia de administración de estos fármacos<sup>155</sup>.

#### **7.3.1.1. Cápsulas insulina**

Debido a la naturaleza crónica del tratamiento de la diabetes tipo 1 que implica inyecciones frecuentes, dolorosas y estresantes y la gran morbilidad en el mundo debido a esta enfermedad, la insulina aparece como una de las proteínas más atractivas para investigar nuevos sistemas de administración de fármacos por rutas no parenterales.



En este contexto, Woitiski et al. Han dedicado esfuerzos para desarrollar diferentes plataformas para insulina oral empleando un método de emulsión / gelificación interna, produjeron pequeñas micropartículas de alginato cargadas con insulina (10  $\mu\text{m}$ ) con alta eficacia de encapsulación. Para mejorar la recuperación, se implementó un proceso de centrifugación y deshidratación, la estabilidad de la insulina en el medio gástrico también se incrementó al reforzar micropartículas de alginato con quitosano y sulfato de dextrano<sup>156</sup>.



**Figura 33.** Concentración sérica de glucosa después de la administración oral de microesferas de ALG-quitosano sin insulina y cargadas con insulina (100 UI / kg) a ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina.

Zhang, Y., et al., (2013). *Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 77; (15 Figura 4)]

Un concepto similar fue seguido por Zhang et al. Que evaluaron los niveles de glucemia en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina con resultados prometedores. Los niveles de glucosa se mantuvieron en un nivel mínimo durante 72 h<sup>157</sup>. (Figura 33).

El mantenimiento de bajas concentraciones plasmáticas de glucosa de manera constante es fundamental para prevenir el desarrollo de complicaciones y el deterioro orgánico asociado con la enfermedad (Nathan, 1993).

Abdelbary et al. Encapsuló glibizida, fármaco antidiabético dentro de micropartículas de alginato combinado con quitosano y poli (ácido acrílico) mostrando a una liberación sostenida que se extendió de 4 a 9 h<sup>158</sup>.

También se han investigado las mezclas de alginato con derivados de celulosa, poli (acrilatos) modificados. Por ejemplo, Babu et al. Prepararon micropartículas de alginato / metilcelulosa mediante un método de emulsión y las recubrieron con glutaraldehído, cargadas de nifedipina. El fármaco se dispersó a nivel molecular y la liberación se controló durante más de 12 h. En otro tipo de aplicación, el mismo grupo de investigación utilizó un sistema similar para la liberación de un insecticida organofosforado<sup>159</sup>.

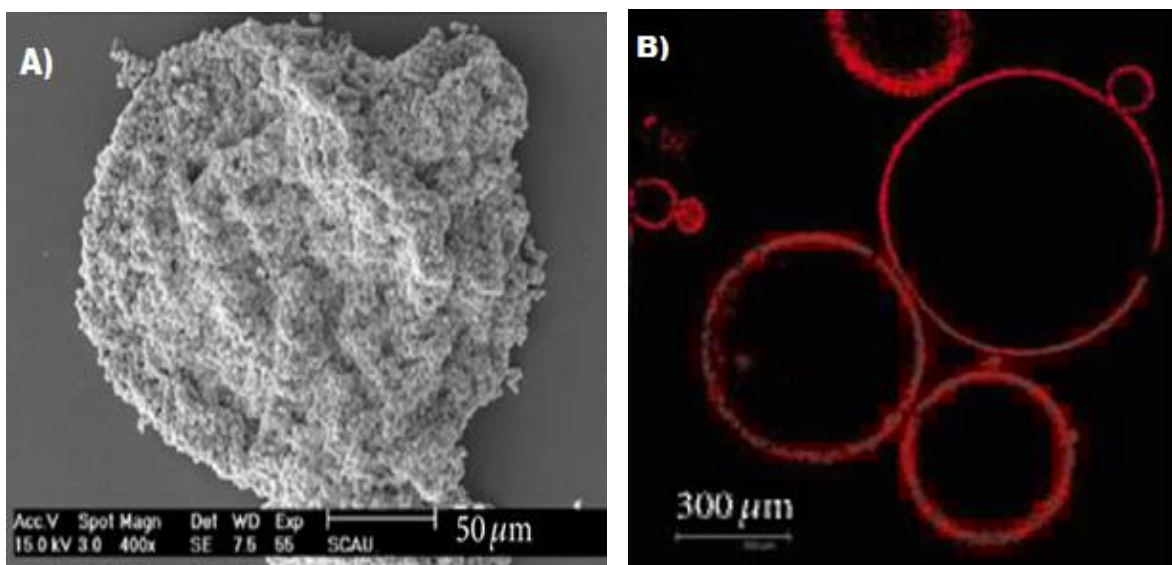
#### **7.4. Micropartículas de alginato- polímeros policatiónicos recubiertas**

Angadi et al. Produjeron micropartículas que contenían amoxicilina, combinando alginato y carboximetilcelulosa de sodio recubiertas con quitosano para la liberación controlada en el estómago para tratar la infección por *Helicobacter pylori*. El tamaño de partícula estaba entre 745 y 889  $\mu\text{m}$ , aunque este ejemplo es relevante porque aborda la liberación gástrica en comparación con la mayoría de los trabajos que se centran en la intestinal. Además, mostrando una eficiencia de encapsulación de 52-92%. El recubrimiento redujo el efecto de primer paso y mantuvo la liberación durante más de 8 h en condiciones de pH gástrico. Una limitación de este trabajo es que no informó sobre las concentraciones de fármaco alcanzadas y si estaban o no dentro de la concentración terapéutica<sup>160</sup>.

#### **7.5. Otros sistemas**

##### **7.5.1. Micropartículas de alginato recubiertas de $\text{CaCO}_3$**

Otra estrategia interesante son las micropartículas porosas de alginato recubiertas con micropartículas autoensambladas de  $\text{CaCO}_3$  (Figura 34). Este nuevo sistema de administración de fármacos se denominó colidosoma y redujo la velocidad de liberación de un fármaco modelo soluble en agua, debido a la generación de una capa superficial densa de un material cerámico azul brillante; el mismo grupo desarrolló colidosomas formados por un núcleo de alginato y una cubierta de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ <sup>172</sup>.



**Figura 34.** Morfología de los colidosomas (a) SEM y (b) microscopía de escaneo láser confocal; Las micropartículas de  $\text{CaCO}_3$  se modificaron con isotiocianato de rodamina para la visualización de fluorescencia roja.

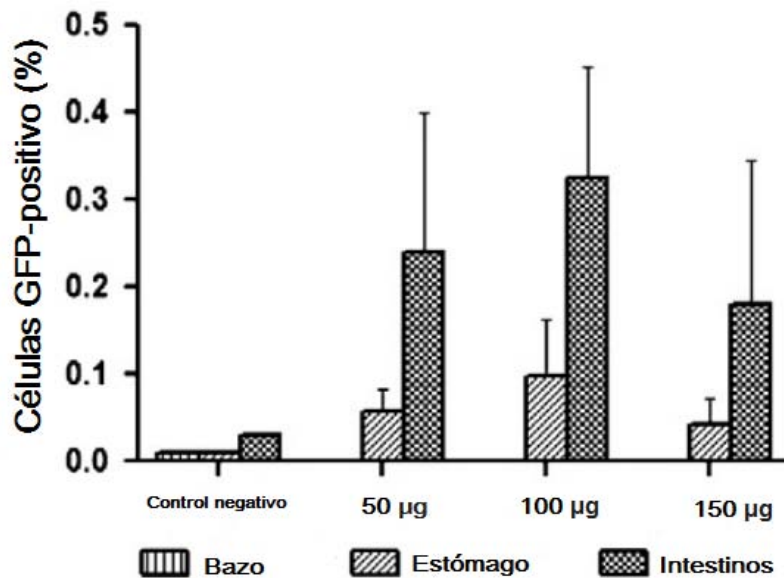
[Liu, H., et al., (2008). Fabrication of novel core-shell hybrid alginate hydrogel beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 351; 112 (Figura 7)]

### 7.5.2. Encapsulación de ADN

Trabajos más recientes también han explorado la encapsulación de otros biológicos sensibles como los adenovirus<sup>161</sup> y plásmido de ADN (pDNA)<sup>162</sup>.

Por ejemplo, Nograles et al. encapsuló un vector de expresión de mamífero que portaba un gen de proteína verde fluorescente (GFP) dentro de micropartículas alginato con un diámetro de 40-50 μm, llevando una carga de 6 μg de pDNA y se les administró por vía oral en dosis de 50 μg, 100 μg y 150 μg a ratones; mediante un análisis de citometría de flujo se detectó fluorescencia verde en las células intestinales (Figura 35) con niveles 1.3 veces mayores para la dosis de 100 μg; por lo tanto, sugiere la viabilidad del sistema para la administración oral de plásmidos<sup>162</sup>

Evaluación dosis-respuesta:  
Dosis de pDNA y expresión de GFP

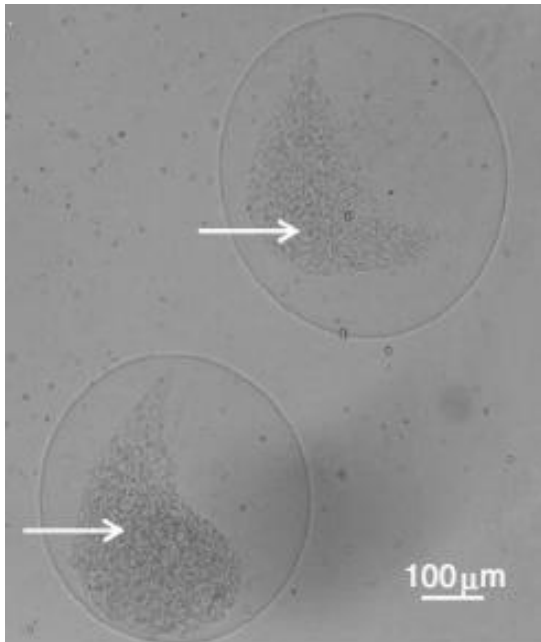


**Figura 35.** Evaluación de dosis-respuesta que muestra el porcentaje de células positivas para GFP entre diversos órganos de ratones 24 h después de la administración de dosis de 50 µg, 100 µg y 150 µg. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

[Nogales, N., et al., (2012). *Formation and characterization of pDNA-loaded alginate microspheres for oral administration in mice*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 113; 135 (Figura 5b)]

### 7.5.3. Encapsulación de bacterias

La buena citocompatibilidad de alginato también se ha evaluado para la encapsulación de bacterias probióticas (por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) que son sensibles a los fluidos gástricos. La incorporación de goma xantana como polímero hidrófilo retardante o acetato ftalato de celulosa como polímero gastrorresistentes en micropartículas de alginato aumentó la supervivencia bacteriana en fluidos gástricos. Figura 36<sup>163</sup>.



**Figura 36.** Microcápsulas de alginato que contienen bacterias *L. acidophilus* señaladas con flechas blancas examinadas por microscopía óptica.

Shinde, T., (2014). Co-extrusion encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* alone or together with apple skin polyphenols: an aqueous and value-added delivery system using alginate. *Food Bioprocess Technol.* 7,1589. (Figura 2)

Esto sugiere la oportunidad de administrar probióticos vivos en una dosis superior al requisito mínimo de  $10^6$ - $10^7$  CFU en forma de microcápsulas suplementarias para ingestión directa o como un ingrediente adicional a productos lácteos o bebidas ácidas.

#### 7.5.4. Encapsulación celular

La microencapsulación de células es un tema de interés, pues cabe la posibilidad de dar solución al problema de rechazo inmunológico que se presentan con los trasplantes y reducir la frecuencia de administración de fármacos, mejorando así, la calidad de vida del paciente.

En estos sistemas ante una proliferación celular descontrolada la microcápsula impide la salida de las células terapéuticas para evitar activar el sistema inmunológico de la persona. No obstante, se ha priorizado el uso de células con baja o nula capacidad de multiplicación y se ha establecido que el número de estas por capsula sea limitado (no puede exceder el 5-10% del volumen total del dispositivo)<sup>164</sup>.

En las micropartículas se pueden implantar numerosas líneas y tipos celulares de interés como se observa en la (Tabla 2), las cuales se pueden modificar genéticamente para controlar la secreción de la proteína requerida y la multiplicación celular<sup>127, 165</sup>

<b>Línea celular</b>	<b>Aplicación terapéutica</b>
<i>Fibroblastos</i>	Cáncer, Enf. Metabólicas, SNC, Enf. Genéticas
<i>Mioblastos</i>	Cáncer, Enf. Metabólicas, SNC, Enf. Genéticas
<i>Células renales</i>	Cáncer, hemofilia, SNC
<i>Islotes de Langerhans</i>	Diabetes
<i>Células ováricas</i>	Enfermedad de Fabry
<i>Células paratifoideas</i>	Hipoparatiroidismo
<i>Hepatocitos</i>	Transplante de hígado
<i>Condriocitos</i>	Regeneración de hueso y cartílago
<i>Células de Leydig</i>	Remplazamiento hormonal
<i>Células madre</i>	Regeneración de hueso, SNC, Enf. Endocrinas
<i>Mieloma</i>	Factor de crecimiento hepático
<i>Hibridoma</i>	Cáncer, producción de anticuerpos
<i>Células tumorales</i>	Vacuna antitumoral , interleuquinas
<i>Células de retina</i>	Enfermedad de Parkinson
<i>Células productoras de vectores virales</i>	Cáncer

Abreviaturas: Enf.; enfermedad.

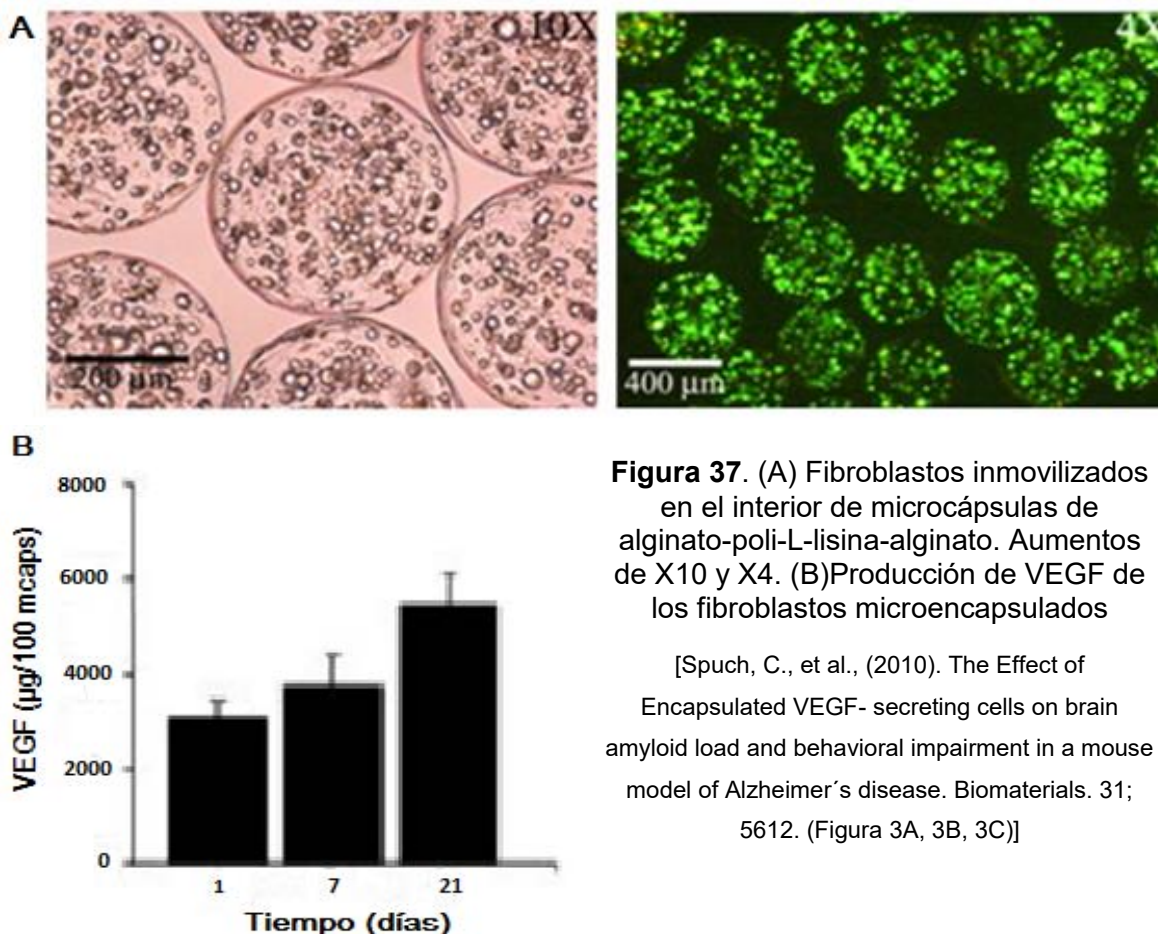
**Tabla 2.** Ejemplos de líneas celulares microencapsuladas y sus correspondientes aplicaciones terapéuticas.

[Pedraz, J. L. et. al. (2014). *La encapsulación de células ¿Una nueva alternativa terapéutica?* Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 70, 779, (Tabla 2)]

Por ejemplo Spuch *et al.* Investigaron una terapia para el Alzheimer encapsulando fibroblastos (transfectados para producir VEGF humano) en alginato de calcio, recubiertas con poli-L-lisina/alginato presentando (diámetro de  $405 \pm 11 \mu\text{m}$ ) y se insertaron vía quirúrgica en la corteza cerebral de 15 ratones.

Demostrando que el número de células viables dentro de las microcápsulas aumento progresivamente, alcanzando su máximo después de 21 días (Figura 37A); al igual la síntesis de VEGF (Figura 37B). Comprobando así el aumento de la densidad vascular en la zona y tres meses después la carga de  $A\beta$  se vio reducida. Por ello, el injerto de microcápsulas con células modificadas

genéticamente puede ser considerado como tratamiento para expresar productos terapéuticos en pacientes con enfermedades neurodegenerativas<sup>166</sup>.

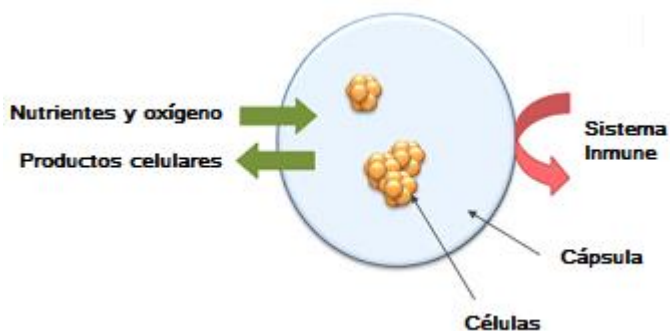


Otro estudio para el tratamiento del cancer, emplearon microcápsulas de APA (Alginato- polilisina-Alginato), con celulas de ovario de hamster (transformadas para secretar endostatina), que produjeron una inhibición del crecimiento del melanoma subcutaneo de ratones.

Tambien se obtuvo el mismo efecto con células secretoras de angiotatina para ratones con cancer de mama. Estos estudios de laboratorio se realizaron en fase preclinica "in vivo"<sup>167</sup>. La investigación en tumores cerebrales, aun se encuentra en fase preclinica "in vitro". el carcinoma pancreatico, actualmete se encuentra en fase clinica I<sup>164</sup>.



Existen reportes sobre la microencapsulación de células de islotes pancreáticos, con el fin de atenuar la pérdida prematura del injerto y evitar la terapia



**Figura 38.** Aislamiento inmunológico por encapsulación

[Strand, B. L. (2017). Current and future perspectives on alginate encapsulated pancreatic Islet. *Stem Cells Transnacional Medicine*. 6(4), 1055. (Figura 1)].

inmunosupresora, donde las cápsulas actúan como membranas semipermeables que dificultan el ataque inmune de las células trasplantadas. De manera importante, las cápsulas deben permitir la difusión de oxígeno y nutrientes a las células encapsuladas y también permitir la difusión de la insulina hacia el entorno circundante. Figura 38<sup>168</sup>.

A continuación se muestra una patente registrada en estos últimos años:

- Patente de Orive y cols., 2009. Ref WO 209000955 A1: Microcápsulas de alginato modificado con el péptido fibronectina (que posee la secuencia Arginina-Glicina-Acido Aspártico (RGD)), el cual se une a las integrinas facilitando la adhesión de las células inmovilizadas a la matriz. Estos dispositivos (diámetro inferior a 1 mm) poseen una mayor resistencia física y permiten que las células estén a una distancia máxima de 100 a 200  $\mu\text{m}$  respecto a la fuente de nutrientes (capilar), garantizado así, un aporte óptimo de estos<sup>169</sup>.

## 7.6. Nanopartículas de alginato

La nanotecnología ha abierto nuevas posibilidades para controlar y manipular diversas patologías. Desde una perspectiva biomédica, permitió la capitalización de nuevas propiedades de los biomateriales para mejorar la prevención, el diagnóstico



y el tratamiento de enfermedades y condujo a la aparición del nuevo campo de los teranósticos

Se han explotado las propiedades de sistemas encapsulados con alginato para desarrollar nuevas herramientas de biodetección<sup>170, 171, 172</sup>. Tras la revolución terapéutica liderada por la nanotecnología, la producción de nanopartículas de alginato para la administración de fármacos también se ha convertido en una atractiva plataforma tecnológica. La siguiente sección abordará esta área de investigación específica.

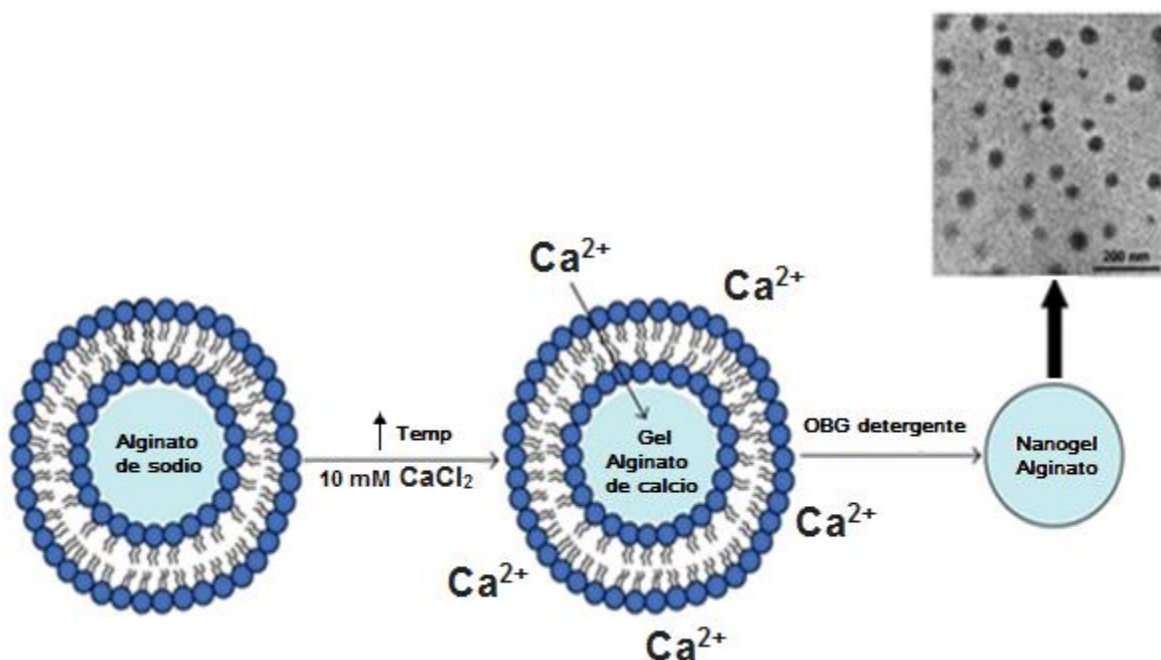
Basado en la experiencia exitosa de micropartículas de alginato, se esperaba que el estudio de las nanopartículas alginato ganara impulso debido al beneficio de la reducción del tamaño de partícula y así alcanzar estructuras celulares y subcelulares en el epitelio gastrointestinal y regiones del domo subepitelial que son relevantes para la vacunación de la mucosa y el transporte de fármacos al torrente sanguíneo<sup>173</sup>.

Uno de los desafíos fue la modificación de los métodos de producción para lograr tamaños tan pequeños. Por ejemplo, la reticulación ionotrópica convencional con iones de calcio se modificó habitualmente y se reemplazó por nanoemulsiones de agua en aceite y polielectrolitos con quitosano<sup>174, 175</sup>.

Para superar esto, los investigadores también utilizaron otros nanovehículos como plantillas (por ejemplo, nanopartículas de quitosano a base de liposomas) que se modificaron en superficie con alginato para conferir mucoadhesividad. Por ejemplo, Haldar y colaboradores produjeron nanopartículas multicapa mediante el ensamblaje capa por capa de alginato y quitosano en liposomas para la administración de un factor de crecimiento<sup>176</sup>.

Por el contrario, Hong y colaboradores utilizaron el núcleo de los liposomas con una temperatura de fusión alta de la bicapa como recipientes de reacción para moldear el ensamblaje de alginato<sup>177</sup>. En este contexto, alginato se encapsuló en el núcleo liposomal y se expuso a una solución de cloruro de calcio a una temperatura superior al punto de fusión de la bicapa. Esto permite el paso de iones de calcio en el núcleo y la gelificación gradual de alginato. Luego, el liposoma se eliminó con

surfactantes para dar lugar a nanopartículas alginato de 120-200 nm. El proceso se presenta en la Figura 39.



**Figura 39.** Producción de nanopartículas de alginato usando plantillas liposómicas.

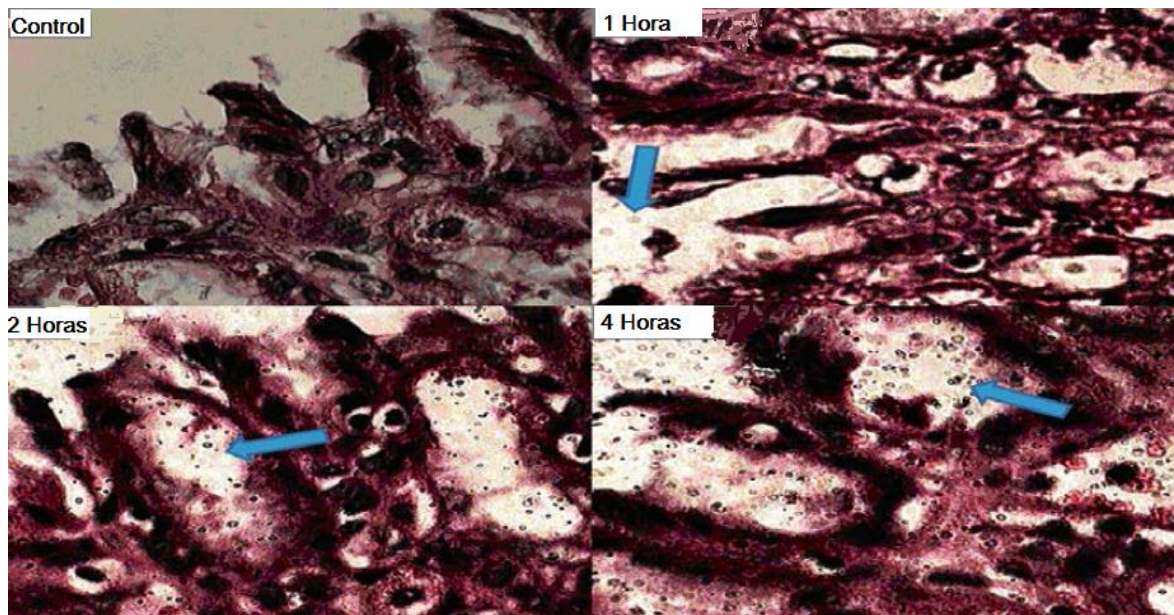
[Hong, J. et al., (2008). Liposome-templated supramolecular assembly of responsive alginate nanogels. *Langmuir*, 24; 4096 (Figura 3)]

Como se mencionó anteriormente, también se podrían usar cristales puros de fármacos para ensamblar capas de polielectrolitos<sup>177</sup>. Siguiendo este razonamiento, los nanocristales de artemisinina (766 nm) se recubrieron con quitosano, gelatina y alginato<sup>178</sup>.

Como parte de la tendencia presentada en la investigación con nanopartículas de alginato también han surgido grupos de investigación que han realizado la interfaz a utilizar nanotecnología para la encapsulación de otros fármacos, la administración de insulina y antígenos<sup>156, 157, 179, 180, 181, 182</sup>.

Ahmad et al. Encapsularon los fármacos antifúngicos clotrimazol y econazol y los fármacos antituberculosos rifampicina, etambutol, isoniazida y pirazinamida dentro de las nanopartículas de alginato. Mediante una gelificación controlada inducida por cationes modificados. Después de la administración oral, los medicamentos sin encapsular fueron detectables por solo 6-24 h, mientras que los nanoencapsulados

fueron entre 8 y 15 días. Además, ocho dosis de nanopartículas cargadas con econazol tuvieron un efecto similar al efecto antibacteriano que 112 dosis dos veces al día del fármaco libre. Los hallazgos confirmaron la capacidad de las nanopartículas de alginato para cruzar la barrera intestinal y llegar al torrente sanguíneo, en comparación a las micropartículas que se retienen principalmente en la mucosa intestinal<sup>183, 184, 185</sup>.



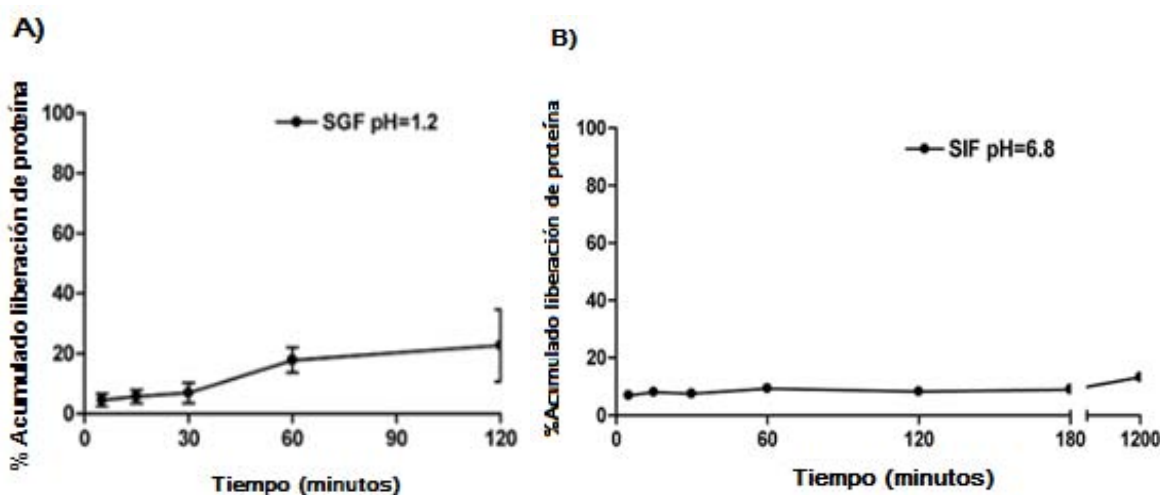
**Figura 40.** Estudios de mucopenetración in vivo de CS-ALG PEC (Complejo polielectrolito de quitosano y alginato) en mucosa gástrica (aumento de microscopio digital-100X)

[Arora, S., (2011). Amoxicillin loaded chitosan-alginate polyelectrolyte complex nanoparticles as mucopenetrating delivery system for *H. Pylori*. *Sci Pharm*, 79; 684 (Figura 7)]

Este efecto beneficioso también se utilizó para desarrollar nanopartículas de alginato / quitosano mucopenetrantes para la liberación de amoxicilina en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*, un patógeno que coloniza el revestimiento de la mucosa gástrica profunda<sup>185</sup>. Los resultados demostraron el concepto de movilidad incrementada de nanopartículas en el moco gástrico al disminuir los grupos amino superficial del quitosano sobre la interacción iónica con grupos carboxílicos de alginato. Por lo tanto, las nanopartículas CS-ALG PEC pueden utilizarse para la administración transmucosal sugerida de fármacos antibacterianos en la erradicación de *H. pylori*. (Figura 40)

Estas observaciones concordaron con un estudio de Chen et al. Donde mostró la permeación mejorada de nanopartículas de N-trimetil quitosana cargadas de albúmina de suero bovino (ASB) a través de monocapas de células  $\text{CaCO}_2$ , cuando se modificó con alginato. Esta mejora se derivaría de una vía transcelular aumentada, mientras que la paracelular permanecería inalterada. Otro mecanismo detrás de este fenómeno sería la absorción activa de estas nanopartículas por placas de Peyer<sup>186</sup>.

Con el objetivo de desarrollar una vacuna oral contra la esquistosomiasis, una enfermedad parasitaria Oliveira, 2012, encapsuló la proteína (S. mansoni rhodopsin) SmRho en nanopartículas de quitosano recubiertas con alginato<sup>187</sup>. Los estudios de liberación in vitro de proteína realizada en ratones mostraron una gran estabilidad de nanopartículas recubiertas en fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF). (Figura 41).



**Figura 41.** Perfil de liberación de la proteína SmRho a partir de nanopartículas de quitosano recubiertas de alginato en SGF (A) y (B) SIF a 37 ° C

Oliveira, C., (2012). A new strategy based on Smrho protein loaded chitosan nanoparticles as a candidate oral vaccine against schistosomiasis," PLOS Neglected Tropical Diseases, 6, no. 11, article 1894, 2012.

En los estudios in vivo con diferentes formulaciones de nanopartículas de quitosano y se reportó que la inmunización oral no podía inducir niveles elevados de anticuerpos, de lo contrario, la inmunización intramuscular inducía niveles elevados de ambos subtipos, IgG1 e IgG2a, anticuerpos específicos SmRho.

Los ratones inmunizados con nanopartículas asociadas a CpG mostraron una modulación significativa de la reacción de granuloma. Los ratones de todos los grupos inmunizados por vía oral con nanopartículas presentaron niveles significativos de protección contra la infección con gusanos de *S. mansoni*, lo que sugiere un papel importante del quitosano en la inducción de una respuesta inmune protectora.

Finalmente, los ratones inmunizados con nanopartículas asociadas con el antígeno SmRho más CpG redujeron el 38% del área del granuloma y también presentaron un 48% de protección contra la infección por *S. mansoni*. Por los resultados reportados este sistema puede ser utilizado como vacuna porque indujo tanto la protección como la reducción de la reacción granulomatosa. (Figura 50).

#### **7.6.1. Receptor folato.**

Estudios han descrito que las articulaciones inflamadas de los pacientes con artritis reumatoide presentan una subpoblación de macrófagos activados que expresan un receptor del ácido fólico.

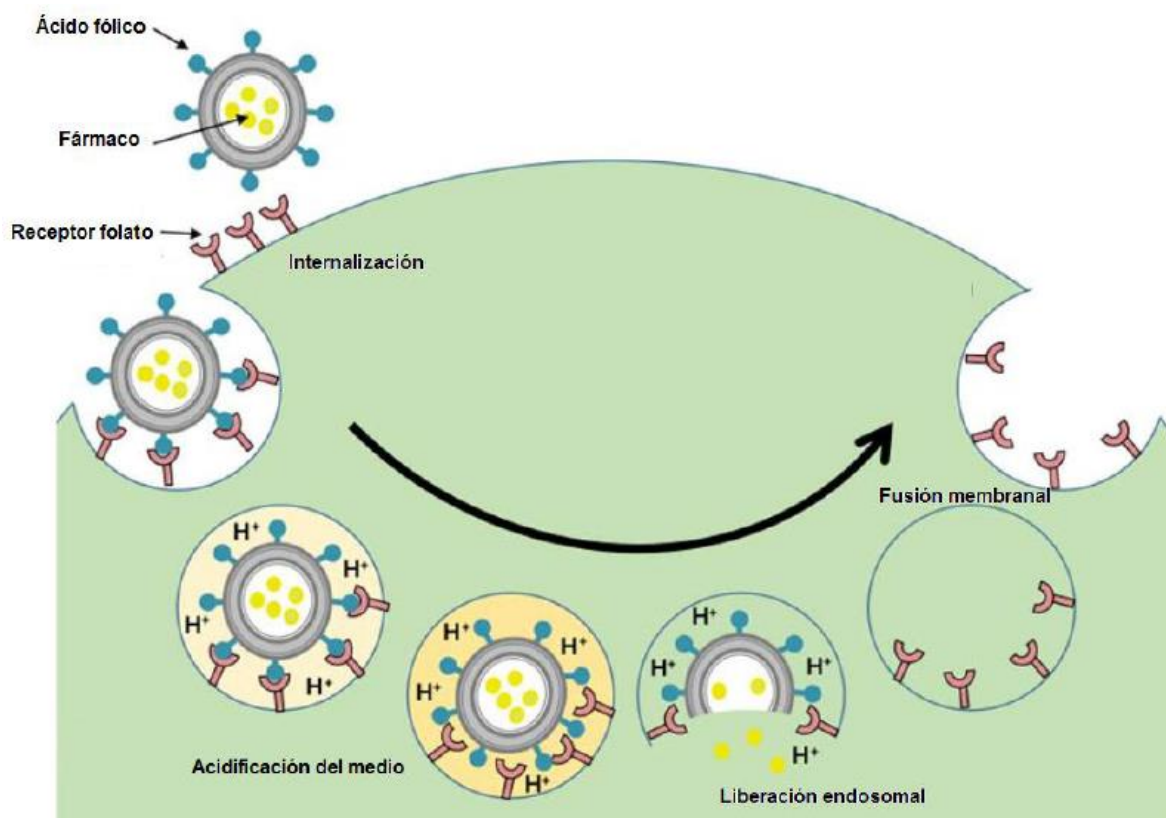
El receptor folato (FR) es un glicosilfosfatidilinositol anclado a una proteína, que tiene la capacidad de unirse al ácido fólico con una alta afinidad favoreciendo su endocitosis en un compartimento de bajo pH, en el que se disocia.

Existen tres formas del receptor FR: FR- $\alpha$ , FR- $\beta$  y FR- $\gamma$ . La isoforma FR- $\alpha$  y FR- $\gamma$  se encuentran presentes primordialmente en la placenta, riñón y algunos tumores malignos. Se expresan en la superficie apical del epitelio, pero por lo general se encuentran ubicados en sitios inaccesibles. Mientras que FR- $\beta$  se expresa en la placenta y en células hematopoyéticas de la línea mielomonocítica, sin embargo solo una pequeña cantidad de folato es detectado en la matriz ósea y células sanguíneas después de su administración intravenosa, debido a que este se encuentra normalmente inactivo.

El receptor FR exhibe una expresión limitada en células sanas, pero está presente en muchas células cancerígenas, en las que se encuentra sobre-expresado. Se ha observado una correlación entre la expresión del receptor FR y el grado histológico

del cáncer. Algunos estudios han demostrado, que este también se encuentra sobre-expresado en macrófagos activados, que están presentes en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide. De este modo, solo una mínima cantidad de células expresan activamente al receptor FR- $\beta$ .

Debido a su buena flexibilidad química, algunos trabajos abordaron la modificación química de alginato para conferir capacidad de transfección génica<sup>174, 188</sup> o propiedades de dirección activa<sup>189</sup>.



**Figura 42.** Liberación de fármaco via vectorización con ácido fólico

[Nogueira, E., et al., (2015). Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. Article in press; 6 (Figura 2)]

La vectorización activa via folato ha sido usada en técnicas de imagenología y para el desarrollo de agentes terapéuticos. En este sentido, las terapias vectorizadas a folato, atacan selectivamente a células patológicas, sin alterar a tejidos sanos. Debido a que no hay otra población de leucocitos que expresen funcionalmente a FR- $\beta$ , el nivel de toxicidad asociado a esta terapia de vectorización es muy bajo.



El ácido fólico es un ligando atractivo para el uso de vectorización de fármacos debido a su bajo peso molecular (PM=441), solubilidad en agua, estabilidad a diversos solventes, pH, facilidad de conjugación, ausencia de inmunogenicidad y una alta afinidad a su receptor. Además, el tamaño pequeño del ligando folato permite su buena penetración en el tejido y rápido aclaramiento de tejidos erróneos. (Figura 42).

En la actualidad, se han encontrado una variedad de moléculas y complejos que pueden ligarse a folato y que han sido diseñados para favorecer la entrega selectiva de fármacos

En este contexto, Yang y cols, produjeron nanopartículas de alginato cargadas con la sonda fluorescente protoporfirina IX se modificaron con ácido 5-aminolevulínico, un ligando que es reconocido selectivamente por células cancerígenas que sobreexpresan el receptor de ácido fólico, para conferir capacidad de diagnóstico mediante endoscopia.

Las nanopartículas fueron endocitadas por células de cáncer colorrectal y la sonda se liberó al espacio intracelular y se acumuló para la detección fotodinámica sensible<sup>189</sup>.

Estos resultados, junto con la evidencia previa del rendimiento de alginato para encapsulación y liberación de fármacos, lo respaldan como una herramienta valiosa para el diseño de sistemas más complejos en el campo emergente de los teranósticos. Al mismo tiempo, será necesario realizar más estudios para capitalizar este potencial y ampliar las aplicaciones de alginato.

## Discusión

El fundamento de la técnica de encapsulación es rodear un material de interés con una membrana semipermeable con el fin de permitir el intercambio de moléculas necesarias para funcionalidad, viabilidad o protegerlo del ambiente y de influencias deletéreas. En un sentido amplio, la microencapsulación provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su liberación posterior bajo condiciones controladas. El material que es cubierto se refiere como fase interna y el material que recubre es llamado pared y generalmente no reacciona con el material a encapsular.

El primer paso para encapsular un activo es la selección de una matriz de encapsulación adecuada, entre los agentes encapsulantes utilizados destacan goma arábica, gelatina, quitosano, almidón, alginato, etc. Que son biopolímeros muy complejos y de gran diversidad funcional debido a su naturaleza química

Los alginatos son polisacáridos que se encuentran en las paredes celulares de las algas pardas y también pueden ser producidos por bacterias no patógenas y fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter vinelandii*. Entre sus propiedades más importantes se encuentran la capacidad viscosante y gelificante las cuales están determinadas por su masa molecular. Además son compuestos biodegradables, biocompatibles y no tóxicos. El amplio conocimiento de las propiedades del polímero como la proporción de sus monómeros y los métodos de gelificación iónica, hacen posible el control de la cinética de gelificación y las propiedades del hidrogel. Propiedades que permiten implementarlo en el desarrollo de sistemas inteligentes con múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica dado que es de fácil obtención y bajo costo.

Los diseños de las microcápsulas de alginato actualmente van desde homogéneos completamente o microcápsulas con un alto grado de heterogeneidad donde el alginato se concentra en la capa más externa o interna de la microcápsula, también se encuentra entrecruzado con diferentes polímeros policatiónicos u otros aditivos que les confieren características más específicas para la entrega del material encapsulado.



El pH es un factor que puede afectar a los polisacáridos que se comportan como electrolitos como el alginato, alterando su conformación debido a las cargas intramoleculares, lo que da como resultado diferentes tamaños de partícula de las microcápsulas, modificaciones en la permeabilidad de las películas que forman y en la eficiencia de encapsulación y retención del material encapsulado.

En la actualidad existen una gran cantidad de técnicas de encapsulación no solo utilizadas en el área farmacéutica, sino también en otras industrias como la alimenticia, cosmética y química. Sin embargo, al elegir alguna de estas técnicas, es necesario saber sus ventajas y desventajas así como sus aplicaciones. Algunos de los aspectos importantes a considerar son: características del material a encapsular, costo, características de los agentes encapsulantes que pueden ser utilizados, la reproducibilidad a nivel industrial, entre otros. Debido al tamaño de partícula y reproducibilidad, las técnicas más utilizadas en la industria farmacéutica son atomización (Spray drying), emulsión y extrusión. Aunque las técnicas pueden ser modificadas o se puede implementar una mezcla de diferentes técnicas, dependiendo de las características que se le quiera dar al producto final.

La selección del método estará en función del presupuesto, las propiedades del material a encapsular, tamaño deseado de las microcápsulas, mecanismos de liberación y la aplicación deseada.

Las micro y nanocápsulas son sistemas coloidales que tienen un tamaño de 1 nm a 1000 nm, el cual juega un papel importante, ya que aumenta la velocidad de disolución del material encapsulado ofreciendo una mayor biodisponibilidad. Al igual que aumenta las vías de administración ya que pueden ser suministradas de manera local via parenteral, con un procedimiento invasivo mínimo o podrían conjugarse a un ligando bioespecífico que le pueda dirigir hacia un tejido u órgano seleccionado por via oral.

El uso de microorganismos probióticos encapsulados permite controlar su liberación de la matriz en el tiempo y lugar requerido del tracto gastrointestinal donde es necesaria su función. Por lo tanto, el empleo de estas técnicas encapsulantes se

convierte en una alternativa prometedora para la supervivencia bacteriana en fluidos gástricos.

Por otra parte las microesferas de alginato representan uno de los diseños más populares aplicados en el campo de encapsulación celular, proporcionan una alternativa para los medios de tratamiento convencionales, a partir de la modificación genética de numerosas líneas celulares. Además, que se puede atribuir a su bien documentado carácter inmunoprotector en varios modelos animales y también a la simplicidad de este sistema. Surgiendo como propuesta de cura de próxima generación para la diabetes tipo 1 mediante la encapsulación de células productoras de insulina en microcápsulas de alginato brindando inmunoprotección. A partir de la misma propiedad sería posible el trasplante de células no humanas, lo cual resultaría beneficioso por la limitada disponibilidad de donantes de tejidos humanos.

La tecnología farmacéutica es considerada una técnica valiosa en el proceso de desarrollo de nuevos medicamentos y dispositivos para la salud. Las nanopartículas debido a su tamaño subcelular pueden penetrar profundamente en los tejidos a través de capilares muy finos, atravesando la capa interna del epitelio, además de ser capturados eficientemente por las células. Esto permite un suministro eficiente de los agentes terapéuticos hacia los sitios específicos del cuerpo. Se cree que las nanocápsulas también podrían proveer de un medio para atravesar la barrera hematoencefálica para el tratamiento de ciertas enfermedades de los ojos, el cerebro y otras porciones del sistema nervioso central.

Conforme se entiendan mejor las condiciones fisiopatológicas de las enfermedades, el diseño de los sistemas de suministro de fármacos se puede adecuar para optimizar la eficacia terapéutica. Sin embargo, la traslación de esta tecnología del laboratorio a la cabecera del paciente requeriría estandarizar y definir los protocolos de encapsulación y establecer métodos analíticos adecuados, para conocer cómo cambia la estructura de la cápsula *in vivo*, lo que complica la evaluación de diferentes enfoques de la encapsulación.

## Conclusión

El desarrollo y la mejora de las técnicas de encapsulación, al igual que la búsqueda de nuevos materiales para encapsular seguirán siendo una prioridad biotecnológica dada la utilidad de esta tecnología en diversas industrias, siendo así para la industria farmacéutica la fabricación de medicamentos especializados.

El encapsulado de fármacos, células u otro tipo de moléculas, ya sea para su mantenimiento o liberación controlada, requiere de materiales de fácil manejo y de alta reproducibilidad. El uso de alginato como agente encapsulante ha permitido el desarrollo de diferentes sistemas, ya que es un material biodegradable, no tóxico y biocompatible, está incluido entre los compuestos considerados seguros (GRAS) por la FDA. Cada técnica de encapsulación, tiene aplicaciones relativamente específicas, por lo que su elección va a depender del uso final; al emplear el alginato como reservorio o matriz polimérico. Las técnicas de encapsulación en aplicaciones farmacéuticas se reducen a: secado por atomización (Spray drying), emulsión y extrusión.

Actualmente nuevas investigaciones apuntan al uso del alginato para el desarrollo de sistemas capsulares, debido a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas las cuales pueden ser manipuladas para obtener diferentes propiedades mecánicas de las capsulas; logrando así contener de manera eficaz material hidrófilo e hidrofóbico, tamaño controlado de micro a nano-escala, con una variedad amplia de estructuras, algunas son de geometría esférica con una fase interna continua rodeada por una pared también continua (estructura de partícula simple), mientras que otras pueden tener una geometría irregular y pueden tener la fase interna distribuida en una matriz de material de pared (estructuras agregadas).

También se han desarrollado sistemas capsulares vectorizados los cuales direccionan acarreadores farmacéuticos a los sitios específicos en donde se desarrolla la enfermedad. La sobreexpresión de receptores en células enfermas, permite la vectorización activa de los sistemas, mediante el uso de moléculas afines o anticuerpos. Hay estrategias que contemplan el direccionamiento pasivo, como el

modificar la composición cualitativa y cuantitativa de la concentración de los polímeros que son pH sensibles, los cuales se pueden adaptar dependiendo el punto de entrega de interés.

Estas técnicas han sido implementadas en varios estudios, obteniendo sistemas funcionales que favorecen la acumulación del material encapsulado en el sitio diana para lograr el nivel deseado, por la duración requerida para una óptima eficacia, así como la disminución de la toxicidad en otros órganos, convirtiéndolos en una estrategia terapéutica muy atractiva, por las perspectivas de aplicación de la micro y nanotecnología en el sector de la salud y el desarrollo de una medicina personalizada, siendo estos elementos lo que impulsa el desarrollo acelerado de este campo de investigación.

Para ampliar el número de productos biofarmacéuticos basados en cápsulas, se requiere el desarrollo de métodos estandarizados de encapsulación escalables, que permitan encapsular principios activos sensibles sin afectar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, y el diseño de procedimientos sencillos y adecuados para la caracterización del material encapsulado.

## Referencias

1. REMUÑÁN, C. & ALONSO, M.J. (1997). Microencapsulación de medicamentos. *Tecnología Farmacéutica Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*, Síntesis, 1(13), 577-609.
2. ESTEVINHO, B. N., ROCHA, F., SANTOS, L. & ALVES, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 138-155.
3. SHEN, Q., & QUEK, S. Y. (2014). Microencapsulation of astaxanthin with blends of milk protein and fiber by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 123(9), 165-171.
4. AGHBASHLO, M., MOBILI, H., MADADLOU, A. & RAFIEE, S. (2013). Influence of Wall Material and Inlet Drying Air Temperature on the Microencapsulation of Fish Oil by Spray Dry. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6), 1561-1569.
5. ABD EL-SALAM, M. H., & EL-SHIBINY, S. (2015). Preparation and properties of milk proteins based encapsulated probiotics. *Dairy Science & Technology*, 23(8), 393-412.
6. YÁÑEZ, F. J. ;( 2002) Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21(14), 313-318.
7. FAAS, M. M., SPASOJEVIC, M. & SIKKEMA, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
8. LUPO, P. B., GONZALEZ, A.C. & MAESTRO, G. A. (2014). Microencapsulation in alginate for food. *Technologies and applications*, 3 (1), 130-151.

9. VALENZUELA, C. V., HERNANDEZ, V. G., RODRIGUEZ, F. S., & CARRILLO R. G., (2013). Tecnología de encapsulación y su aplicación en ciencias veterinarias, *Avances en ciencias veterinarias*, 28(2), 59-75
10. FANG, Z. & BHANDARI, B. (2010). Encapsulation of polyphenol. *Trends Food Sci. Technol.* 21(10), 510-523.
11. CHAVARRI, M., MARAÑÓN, I., ARES, R., IBAÑEZ F., MARZO, F. & VILLARÁN, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(17), 185-189.
12. PARRA, H., & ADOLFO, R. (2010). Micro encapsulación de alimentos, *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 63(2), 5669-5684.
13. FOO, W.T., LIONG, M.T. & EASA, A. M. (2013). Textural and structural breakdown properties of selected hydrocolloids gets. *Food Research International*, 52(7) 401-408
14. NEDOVIC, V., KALUSEVIC, A., MANOJLOVIC, V., LEVIC, S. & BUGARSKI, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 23(1), 1806-1815
15. SHEKHAR, K., MADHU, N.M., PRADEEP, B., & BANJI, D.A. (2010). Microencapsulation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 58-62.
16. GARCÍA, C. A. & LÓPEZ, M. A., (2012). Biopolímeros utilizados en la encapsulación, *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(1), 84-97.
17. GOH, C. H., HENG, P. W. S., & CHAN, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 1-12
18. NESTERENKOA, A., ALRIC, I., SILVESTRE, F. & DURRIEUA, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation. *Crops Prod.* 42(3), 469-479.

19. REINECCIUS, G. A. (2001). Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technol.* 54(19) ,144-145.
20. PENICHE, C., ARGÜELLES-MONAL, W. (2003). Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation, *Macromol Biosci*, 3(10), 511- 520.
21. HERNANDEZ, C., VENTURA, J., BELMARES, R. E., CONTRERAS, J. C., ÁLVAREZ, G. & MARTINEZ J. L. (2016). La microencapsulación de bioactivos para su aplicación en la industria, ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, 50(1) 12-19.
22. FERNÁNDEZ, D., GÓMEZ, M., RAMOS, D., GONZÁLEZ, N., NÚÑEZ DE LA FUENTE, L. & FLORES, N. (2015). Obtención de microesferas biodegradables de ácido poli L-láctico cargadas con doxorubicina. *Cubana Farm*; 39(1).96-103
23. KULKARNI, N., WAKTE, P. & NAIK, J., (2015). Development of floating gelatin-xanthan beads for oral controlled release of glipizide. *International Journal of Pharmaceutical Investigation.* 58(2), 73-80.
24. DZIEZAK, J. D. (2001). A focus on gums. *Food Technology*, 45(9), 116-132.
25. VERBEKEN, D., DIERCKX, S., & DEWETTINCK, K. (2003). Exudate gums: occurrence, production and applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 63(21), 10-21.
26. LI, M., ROUAUD, O. & PONCELET, D., (2011), Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal Pharm*, 363(24) ,26-39.
27. JONES, O., ANDREW D. E. & MCCLEMENTS, J. D. (2010). Thermal analysis of  $\beta$ -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable Biopolymer particles. *Food Hydrocolloids.* 24(3), 239-248.
28. KLANDER E., K., BALDOCK C. & BELLA, J., (2007). Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*, 120, 1955-1958.

29. SHOULDERS, M. D., & RAINES, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 929.
30. BRODSKY, B. & PERSIKOV, A. V., (2005). Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 301-339.
31. GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., TURNAY, J., FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D., ULMO, N., LIZARBE, M. A., & MONTERO, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 25-34.
32. KOŁODZIEJSKA, I., SKIERKA, E., SADOWSKA, M., KOŁODZIEJSKI, W. & NIECIKOWSKA, C. (2008). Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chemistry*, 107(2), 700-706.
33. KARIM, A. A. & BHAT, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 563-576.
34. AHMAD, M., & BENJAKUL, S. (2011). Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 381-388.
35. ANNAN, N. T., BORZA, A. D., & TRUJILLO, H. L. (2011). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves Survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. (41), 184-193.
36. RAFIEE, A., ALIMOHAMMADIAN, M. H., GAZORI, T., RIAZI-RAD, F., FATEMI, S. M. R., PARIZADEH, A. & HAVASKARY, M. (2014). Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(5), 372-377.



37. BRUSCH, B. G. & ZACHIA. A. A. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103(2), 123-128.
38. AGUILAR C. (2007). Optimización del proceso de modificación del almidón de maíz ceroso por extrusión y el uso de mezclas de almidones modificados con murciélago de nopal para la encapsulación de aceite esencial de naranja empleando el secado por aspersión (Tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mexico.
39. DRAGET K. I. (2009). *Alginates: Handbook of Hydrocolloids*, 2a. Edición. Editorial Woodhead. Cambridge. 2009; 379–395.
40. RAYMOND C. R. & PAUL J. S. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6ª ed. Pharmaceutical Press, London, 20-2, 83-5, 622-4.
41. DRAGET, K. I., SMIDSRØD, O. & SKJÅK-BRÆK, G. (2005). Alginates from algae. En Steinbüchel A., & Rhee, S.K., *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry*. Edición. Properties, production and patents. Editorial Wiley-VCH. Weinheim. 2005; 1-30.
42. BIDARRA S.J., BARRIAS C.C. & GRANJA P.L. (2014). Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater.* 10, 1646– 1662.
43. SWAIN S., BEHERA A., BEG S.N., PATRA C.C., DINDA S. & SRUTI J. (2012). Modified Alginate Beads for Mucoadhesive Drug Delivery System. *Recent Pat Drug Deliv. Formul.* 6, 1-19.
44. VENKATESAN, A., VENKATESAN J., BHATNAGAR I., MANIVASAGAN P., KANG K. & KIM S. (2015). Alginate composites for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 269-28.
45. LEE, K. Y. & MOONEY, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 37, 106–126.
46. GOMBOTZ, W. R. & WEE, S. F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv. Rev.* 64,194–205.

47. CLARK, D. E. & GREEN, H. C. (1936). Alginic acid and process of making same. US Patent 2036922.
48. PAWAR, S. N. & EDGAR, K. J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* 33, 3279–3305.
49. KREFTING, A. & OHRISTIANIA, O. F. Process of treating seaweed. Patente N. US598790, Norway, 1898.
50. NELSON, W. L. & CRETCHER, L. H. (1929). The Alginic Acid from *Macrocystis Pyrifera*. *J. Am. Chem. Soc.* 51, 1914–1922.
51. OUWERX, C., VELINGS, N., MESTDAGH, M. M. & AXELOS, M. A. V. (1998). Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks* 6, 393–408.
52. GRANT, G., MORRIS, E., REES, D., SMITH, P. & THOM, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg– box model. *Febs Letters* 32, 1.
53. GEORGE, M. & ABRAHAM, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J Control Release* 114, 1–14.
54. ALBAN, S., SCHAUERTE, A. & FRANZ, G. (2002). Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydrate Polymer* 47, 267–276.
55. SENNI, K., PEREIRA, J., GUENICHE, F., DELBARRE-LADRAT, C., SINGUIN, C. & RATISKOL, J. (2011). Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Mar Drugs* 9, 1664–168.
56. COLEMAN, R. J., LAWRIE, G., LAMBERT, L. K., WHITTAKER, M., JACK, K. S. & GRNDAHL, L. (2011). Phosphorylation of alginate: Synthesis, characterization, and evaluation of in vitro mineralization capacity. *Biomacromolecules* 12, 889–897.
57. VENKATESAN, J., BHATNAGAR, I., MANIVASAGAN, P., KANG, K. & KIM,

- S. (2015). Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 269-281.
58. PAQUES, J. P., VAN DER LINDEN, E., VAN RIJN, C. J. M. & SAGIS, L. M. C. (2014). Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 209, 163–171.
59. NUSSINOVITCH, A. & GERSHON, Z. (1997). Alginate oil-sponges. *Food Hydrocolloids* 11(3), 281-286.
60. YU, L. & DING, J. (2008). Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1473–1478.
61. KURT, I. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications, *Food Hydrocolloids* 25, 251–256.
62. BARBETTA, A., BARIGELLI, E. & DENTINI, M. (2009). Porous Alginate Hydrogels: Synthetic Methods for Tailoring the Porous Texture, *Biomacromolecules* 10, 2328–2337.
63. KUO, C.K. & MA, P.X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 22, 511–521.
64. FLORES-BELMONT, I. A. & JIMÉNEZ-MUNGÍA M. T. (2013). Microencapsulación de compuestos activos con quisotano. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 7(1), 48-56.
65. GOUIN, S. (2004) Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*, 15 (7), 330- 347.
66. NAZZARO, F., ORLANDO, P., FRATIANNI, F., & COPPOLA, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 182–6.

67. AZIZ, S., GILL, J., DUTILLEUL, P., NEUFELD, R. & KERMASHA, S. (2014). Microencapsulation of Krill Oil Using Complex Coacervation, *Journal of Microencapsulation*, 31(8), 774–784
68. VILLAMIZAR, L. & MARTÍNEZ. F. (2008). Determinación de las condiciones de microencapsulación de un baculovirus entomopatógeno mediante coacervación con Eudragit S100®. *Revista Vitae* 15(1), 123-131.
69. MADENE, A., SCHER, J. & DESOBRY. S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 4(1), 1-21.
70. DEVI, N., SARMAH, M., KHATUN, B. & MAJI, T.K. (2017). Encapsulation of Active Ingredients in Polysaccharide–Protein Complex Coacervates, *Advances in Colloid Interface Science*, 239, 136–145.
71. HERRERA, T. E., VALDEZ, B. & MARTÍNEZ, C. (2010) Microencapsulación de acetato de triclosan por polimerización interfacial para aplicaciones textiles. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(7), 471-484.
72. JUNG, Y., TRUONG, N., SHIN, S., & JEONG, S. (2013). A robust experimental design method to optimize formulations of retinol solid lipid nanoparticles. *Journal of microencapsulation*, 30(1), 1-9.
73. YAÑEZ, J. J., SALAZAR, L., CHAIRES, J., JIMENEZ, M., MARQUEZ & RAMOS. E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista Avance y Perspectiva* 21: 313319.
74. LAKKIS, J. M. (2007). Encapsulation and controlled release technologies in food systems. Blackwell Publishing. Iowa, EE. UU. p. 3-9.
75. SERNA-COCK, L. & VALLEJO-CASTILLO, V. (2013). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 7 (40), 4743-4753.
76. LUPO, P. B., GONZÁLEZ, A. C. & MAESTRO G. A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3 (1), 130-151.

77. BURGAIN, J., GAIANI, C., LINDER, M. & SCHER, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467–483.
78. KENT, R. M. & DOHERTY, S. B. (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Research International* 64, 567–576.
79. CHAN, I. S., LEE, B. B., RAVINDRA, P. & PONCELET, D. (2009). Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 338(1), 63-72.
80. CHAMPAGNE, C. P. & FUSTIER, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(2), 184-190.
81. Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A. & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 27, 15–25.
82. COOK, M. T., TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS, D. & KHUTORYANSKIY, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162, 56–67.
83. ZANJANI, M. A. K., TARZI, B. G., SHARIFAN, A. & MOHAMMADI, N. (2014). Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastrointestinal Condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3), 843-852.
84. ZHANG, Y., LIN, J. & ZHONG, Q. (2015). The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*, 71, 9-15.

85. RATHORE, S., DESAI, P. M., LIEW, C. V., CHAN, L. W. & HENG, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116, 369-381.
86. CHAMPAGNE, C.P., BLAHUTA, N., BRION, F. & GAGNON, C. (2000). A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*. 68(6):681-688.
87. Dohnal, J. & Štěpánek, F. (2010). Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules. *Powder Technology*. 200(3):254-259.
88. MARK, D., HAEBERLE, S., ZENGERLE, R., DUCREE, J. & VLADISAVLJEVIĆ, G. (2009). Manufacture of chitosan microbeads using centrifugally driven flow of gel-forming solutions through a polymeric micronozzel. *Journal of Colloid and Interface Science*. 336(2):634-641.
89. ZUIDAM, N. J. & SHIMONI, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. (pp. 3-29). New York, NY, USA: Springer Science+Business Media, LLC.
90. DAS, A., RAY, S., RAYCHAUDHURI, U. & CHAKRABORTY, R. (2014). Microencapsulation of Probiotic Bacteria and its Potential Application in Food Technology. *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology*, 7(1): 47-53.
91. IZADI, M., ESKANDARI, M. H., NIAKOUSARI, M., SHEKARFOROUSH, S., HANIFPOUR, M. A. & IZADI, Z. (2014). Optimisation of a pilot-scale spray drying process for probiotic yoghurt, using response surface methodology. *International Journal of Dairy Technology*, 67(2), 211-219.
92. RODRÍGUEZ-BARONA, S., MONTES, L. M. & RAMÍREZ, D. (2012). Microencapsulation of probiotic by spray drying in the presence of prebiotic. *Vitae* 19 (1), 185-188

93. AVILA R. S., GARCIA, S. F., JIMÉNEZ, M. T., GONZALEZ, M. F. & BELLO P. L. (2014). Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate Polymers*, 102, 423-430.
94. GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A. & SAUREL, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*. 40(9):1107- 1121.
95. YONEKURA, L., SUN, H., SOUKOULIS, C. & FISK, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestión. *Journal of Functional Foods*, 6, 205–214.
96. CASSANEGO, E., DA SILVA, T., GOULART, J., DE OLIVEIRA, G. & SAN´TANNA, E. (2015). *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *European Food Research and Technology*, 240 (5), 977-984.
97. SENAKA RANADHEERA, C., EVANS, C.A., ADAMS, M.C. & BAINES, S.K. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Propionibacterium jensenii* 702 by spray drying in goat’s milk. *Small Ruminant Research*, 123,155–159.
98. VELASCO, J. W., VILLAFLORES, G. V., FLORES, J. E. & BISONARD, E. (2014). Simulation and operation of a spray dryer for the production of sodium pentabirrate. *Información Tecnológica*, 25(5), 89-94.
99. NEDOVIC, V., KALUSEVIC, A., MANOJLOVIC, V., LEVIC, S., Y BUGARSKI, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
100. TERAMURA, Y. (2013). Microencapsulation of cells, including islets, within stable ultra-thin membranes of maleimide-conjugated PEG-lipid with multifunctional crosslinkers. *Biomaterials*, 34(11), 2683-2693.

101. BARBA, A. A., D'AMORE, M., CHIRICO, S., LAMBERTI, G., & TITOMANLIO, G. (2009). *A general code to predict the drug release kinetics from different shaped matrices*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 36(3), 359-368.
102. KAUNISTO, E., MARUCCI, M., BORGQUIST, P., & AXELSSON, A. (2011). *Mechanistic modelling of drug release from polymer-coated and swelling and dissolving polymer matrix systems*. International Journal of Pharmaceutics, 418(1), 54-77.
103. SIEPMANN, J. & SIEPMANN, F. (2012). *Modeling of diffusion controlled drug delivery*. Journal Control Release, 161(2), 351-362.
104. HE, J., ZHONG, C., & MI, J. (2005). *Modeling of drug release from bioerodible polymer matrices*. Drug Delivery, 12, 251-259.
105. LAO, L. L., PEPPAS, N. A., BOEY, F. Y. C., & VENKATRAMAN, S. S. (2011). *Modeling of drug release from bulk-degrading polymers*. International Journal of Pharmaceutics, 418(1), 28-41.
106. SHAIKH, H. K., KSHIRSAGAR, R. V., & PATIL, S. G. (2015). *Mathematical models for drug release characterization*. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 4(4), 324–338.
107. BURKERSRODA, F. V., SCHEDL, L., & GÖPFERICH, A. (2002). *Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion*. Biomaterials, 23(21), 4221-4231.
108. PEPPAS, N. A. & KHARE, A. R. (1993). Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11(1-2), 1-35.
109. LIN, C. C., & METTERS, A. T. (2006). *Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling*. Advanced Drug Delivery Reviews, 58(12-13), 1379-1408.
110. DOMINGUEZ, P. J. (2006). *Nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada: revisión y relevancia*. Servicio de Salud de Castilla la Mancha. 1576-2416.



111. MURILLO, M., ESPUELAS, S., PRIOR, S., VITAS, A., RENEDO, M., GOÑI, M., IRACHE J., & GAMAZO, C. (2001). *Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas*, Rev. Med. Univ. Navarra. 45(4), 3-5.
112. CHIEN, Y. W. (1991) *Novel Drug Delivery Systems*, New York, Marcel Dekker Inc.
113. SUÑÉ N. J. (2002). Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración [Internet]. Curso de información continuada para farmacéuticos de hospital, Barcelona: Fundación Promoción Medica. 3.2, 27-65.
114. MURUZABAL, L. (2005). *Formas farmacéuticas de liberación modificada y estereoisómeros. ¿Nos aportan algo en la práctica clínica?* BIT [Internet]. 2005. 13(1), 2-5.
115. KUSHAL, M., MONALI, M., DURGAVATI, M., MITTAL, P., UMESH, S., & PRAGNA, S., (2013). Oral controlled release drug delivery system. *International Research Journal of Pharmacy*. 4(3), 70-76.
116. PUNDIR, S., BANDOLA, A. & SHARMA, D., (2013). *Sustained release matrix technology and recent advance in matrix drug delivery system*. International Journal of Drug Research and Technology. 3(1), 12-20.
117. SRIKANTH, P., RAJU, N., RAJA, S. W., & RAJ, S. B. (2013). *A review on oral controlled drug delivery*. International Journal of Advanced Pharmaceutics. 3(1), 51-58.
118. SANDOVAL, P. A., BAENA, Y., ARAGÓN, M., ROSAS, J. E. & PONCE D'LEÓN, L. F. (2008). *Mecanismos generales de cesión de principios activos a partir de matrices monolíticas hidrofílicas preparadas con éteres de celulosa*. Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm. 37(2) ,105-121.
119. LAMMERS, T., SUBR, V., ULBRICH, K., & HENNINK W. E. (2010). *Polymeric nanomedicines for image-guided drug delivery and tumor-targeted combination therapy*. Nano today. 5(3), 1997-212.

120. KUNJACHAN, S., POLA, R., & GREMSE, F., (2014) *Passive versus active tumor targeting using RGD- and NGR-modified polymeric nanomedicines*. Nano Lett 14(2), 972–981.
121. HAN, Y., BAE, Y. H., & PARK, K., (2011). *Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility*. Journal of Controlled Release. 153(3), 198-205.
122. PHAM, C., (2011). *Nanotherapeutic approaches for the treatment of rheumatoid arthritis*. Nanomedicine and Nanobiotechnology. 3(6), 607-619.
123. MAHAMAD, S., (2011). *Nanomedicine and use of nanotechnology in drug delivery Systems: A Novel Approach*. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 2(3), 925-929.
124. ROLLOT, J. M., COUVREUR, P., ROBLOT-TREUPEL, L., & PUISIEUX, F. (1986), *Physicochemical and morphological characterization of polyisobutyl cyanoacrylate nanocapsules*. J Pharm Sci. 75(4), 361-364.
125. JOYE, I. & MCCLEMENTS, D. (2014). *Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization and application*. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 19(5), 417- 427.
126. GOMEZ, C. I., (2012). *Nanoparticle fabrication and characterization for biomedical research application*. Technical Summary. 1-5.
127. HERNANDEZ, R. M., ORIVE, G. & PEDRAZ, J. L. (2011). *Utilización de la microencapsulación de célula en terapias avanzadas: ¿Una alternativa para terapia ocular?*, Visión, 39, 23-30.
128. AZANZA, P. J. (2002). *Hablemos de... La pegilación de fármacos*, Servicio de Farmacología Clínica Universitaria. Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, Pamplona.
129. MARTÍNEZ, S. G., PÉREZ A. B., SÁEZ F. E., GALLARDO, V. & ARIAS, J. L. (2010). *Drug delivery strategies based on the enhanced permeation and retention effect*. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia de Granada.
130. WILLIS, M. & FORSSEN, E. (2008). *Ligand-targeted liposomes*. Adv Drug Deliv Rev, 29(3), 249-271.

131. KALEPU, S., SUNILKUMAR K. T., SUDHEER, B., & MOHANVARMA, M. (2013). *Liposomal drug delivery system*. International Journal of Drug Development and Research. 5(4), 62-75.
132. SERCOMBE, L., VEERATI, T., MOHEIMANI, F., WU, S. Y., SOOD A. K. & HUA S. (2015). *Advances an challenges of liposome assisted drug delivery*, Frontiers in Pharmacology, 286(6), 1-13.
133. MOHAMMED M. A., SYEDA J. T., WASAN, K. M. & WASAN, E. K. (2017). *An Overview of chitosan nanoparticles and its application in nonparenteral drug delivery*. Pharmaceutics. 9(4), 53-61.
134. MEERA, G. & ABRAHAM E. (2010). *Polyionic Hydrocolloids for the Intestinal Delivery of Protein Drugs: Alginate and Chitosan*. Journal of Controlled Release. 114, 1–14.
135. FENYVESI, Z., AUNER, A. & SCHMALZ D. (2009). *Preparation of pH-sensitive beads for NSAID using three-component gel systems*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 98(11), 4285–4295.
136. SOSNIK, A., CARCABOSO, A. & CHIAPPETTA, D. A. (2014). *Polymeric nanocarriers: new endeavors for the optimization of the technological aspects of drugs*, Recent Patents on Biomedical Engineering, 1(1), 43–59.
137. PRAJAPATI, S. K., TRIPATHI, P., UBAIDULLA, U. & ANAND, V. (2008). *Design and development of gliclazide mucoadhesive microcapsules: in vitro and In vivo evaluation*, AAPS PharmSciTech, 9(1), 224–230.
138. EL-SHERBINY, I. M., ABDEL-MOGIB, DAWIDAR, A. ELSAYED, M. A. & SMYTH, H. D. C., (2011). *Biodegradable pH-responsive alginate-poly (lactic-co-glycolic acid) nano/micro hydrogel matrices for oral delivery of silymarin*. Carbohydrate Polymers, 83(3), 1345–1354.
139. WITTAYA-AREEKUL, S., KRUEENATE, J. & PRAHSARN, C. (2012). *Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone*. International Journal of Pharmaceutics, 312(2), 113–118.

140. ANAL, A., BHOPATKAR, D., TOKURA, S., TAMURA, H. & STEVENS, W. (2003). *Chitosan-Alginate Multilayer Beads for Gastric Passage and Controlled Intestinal Release of Protein*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 29(6), 713-724.
141. TAQIEDDIN, E. & AMIJI, M. (2014). *Enzyme Immobilization in Novel Alginate–Chitosan CoreShell Microcapsules*. Biomaterials. 25(10), 1937–1945.
142. URBANSKA, A. M., KARAGIANNIS, E. D., GUAJARDO, G., LANGER, R. S. & ANDERSON, D. G. (2012). *Therapeutic effect of orally administered microencapsulated oxaliplatin for colorectal cancer*, Biomaterials, 33(18), 4752–4761.
143. MLADENOVSKA, K., CRUAUD, O. & RICHOMME P. (2011). *5-ASA loaded chitosan-Ca-alginate microparticles: preparation and physicochemical characterization*, International Journal of Pharmaceutics, 345(2), 59–69.
144. ZHU, A. M., CHEN, J. H., LIU, Q. L. & JIANG, Y. L. (2011). *Controlled release of berberine hydrochloride from alginate microspheres embedded within carboxymethyl chitosan hydrogels*, Journal of Applied Polymer Science, 120(4), 2374–2380.
145. SHI, D., GREEVER, R. & CHEN, Y. (2010). *Preparation and characterization of novel sinomenine microcapsules for oral controlled drug delivery*, Drug Development and Industrial Pharmacy, 36(4), 482–489.
146. MAKAI, Z., BAJDIK, J., EROS, I. & PINTYE-HÓDI, K. (2013). *Evaluation of the effects of lactose on the surface properties of alginate coated trandolapril particles prepared by a spray-drying method*, Carbohydrate Polymers, 74(3), 712–716.
147. CHO, W. J., OH, S. H. & LEE, J. H. (2010). *Alginate film as a novel post-surgical tissue adhesion barrier*, Journal of Biomaterials Science, 21(7), 701–713.
148. KULKARNI, R. V., MUTALIK, S., MANGOND, B. S. & NAYAK, U. Y. (2012). *Novel interpenetrated polymer network microbeads of natural*

- polysaccharides for modified release of water soluble drug: in-vitro and in-vivo evaluation*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 64(4), 530–540.
149. CHEN L. & SUBIRADE, M. (2007). *Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 65(3), 354–362.
150. ČALIJA, B., CEKIĆ, N., SAVIĆ, S., KRAJIŠNIK, D., DANIELS, R. & MILIĆ, J. (2011). *An investigation of formulation factors affecting feasibility of alginate-chitosan microparticles for oral delivery of naproxen*, Archives of Pharmacal Research, 34(6), 919–929.
151. COPPI, G., IANNUCELLI, V., SALA, N. & BONDI, M. (2014). *Alginate microparticles for Polymyxin B Peyer's patches uptake: microparticles for antibiotic oral administration*, Journal of Microencapsulation, 21(8), 829–839.
152. JAYA, S., DURANCE, T. D. & WANG, R. (2015). *Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules*, Journal of Microencapsulation, 26(2), 143–153.
153. YU, C. Y., YIN, B. C, ZHANG, W., CHENG, S. X., ZHANG, X. Z. & ZHUO, R. X. (2009). *Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property*. Colloids and Surfaces: Biointerfaces, 68(2), 245–249.
154. CHEN, A. Z., CHEN, M. Y., WANG, S. B., HUANG, X. N., LIU, Y. G. & CHEN, Z. X. (2012). *Poly (L-histidine)-chitosan/alginate complex microcapsule as a novel drug delivery agent*, Journal of Applied Polymer Science, 124(5), 3728–3736.
155. SANKALIA, M. G., MASHRU, R. C., SANKALIA, J. M. & SUTARIYA, V. B. (2015). *Papain entrapment in alginate beads for stability improvement and site-specific delivery: physicochemical characterization and factorial optimization using neural network modeling*, AAPS PharmSciTech, 6(2), E209–E222.
156. WOITISKI, C. B., SARMENTO, B., CARVALHO, R. A., NEUFELD, R. J. & VEIGA, F. (2011). *Facilitated nanoscale delivery of insulin across*

- intestinal membrane models*, International Journal of Pharmaceutics, 412(2), 123–131.
157. ZHANG, Y. WEI, W., LV, P., WANG, L. & MA, G. (2013). *Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 77(1), 11–19.
158. ABDELBARY, A., EL-GENDY, N. A. & HOSNY, A. (2012). *Microencapsulation approach for orally extended delivery of glipizide: in vitro and in vivo evaluation*, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 74(4), 319–330.
159. BABU, V. R., SAIRAM, M., HOSAMANI, K. M. & AMINABHAVI, T. M. (2007). *Preparation of sodium alginate-methylcellulose blend microspheres for controlled release of nifedipine*, Carbohydrate Polymers, 69(2), 241–250.
160. ANGADI, S. C., MANJESHWAR, L. S. & AMINABHAVI, T. M. (2012). *Novel composite blend microbeads of sodium alginate coated with chitosan for controlled release of amoxicillin*, International Journal of Biological Macromolecules, 51(2), 45–55.
161. PARK, H., KIM, P. H. & HWANG, T. (2012). *Fabrication of cross-linked alginate beads using electrospraying for adenovirus delivery*, International Journal of Pharmaceutics, 427(2), 417–425.
162. NOGRALES, N., ABDULLAH, S., SHAMSUDIN, M. N., BILLA, N. & ROSLI, R. (2012). *Formation and characterization of pDNA-loaded alginate microspheres for oral administration in mice*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 113(2), 133–140.
163. SHINDE, T., SUN-WATERHOUSE, D. & BROOKS, J. (2014). *Co-extrusion encapsulation of probiotic Lactobacillus acidophilus alone or together with apple skin polyphenols: an aqueous and value-added delivery system using alginate*. Food Bioprocess Technol. 7,1581-1596
164. GURRUCHAGA, H., SÁENZ DEL BURGO, L., ORIVE, G., HERNANDEZ, R. M. & PEDRAZ, J. L. (2015). *Advances in cell encapsulation*

- technology and its application in drug delivery*. Expert Opinion on Drug Delivery, 1-17.
165. PEDRAZ, J. L. & ORIVE, G. (2014). *La encapsulación de células ¿Una nueva alternativa terapéutica?* Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 70, 777-787.
166. SPUCH, C., ANTEQUERA, D., PORTERO, A., ORIVE, G., HERNANDEZ, R. M., MOLINA, J. A., BERMEJO-PAREJA, F., PEDRAZ, J. L. & CARRO, E. (2016). *The Effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease*. Biomaterials, 31, 5608-5618.
167. DOMINGUEZ-GIL, A. (2012). *Terapias avanzadas y desarrollo farmacéutico*. Discurso inagural del año académico 2012. Real Academia de Medicina de Salamanca, 2012, Salamanca, 5-82.
168. STRAND, B. L., CORON, A. E. & SKJK-BRAEK G. (2017). *Current and future perspectives on alginate encapsulated pancreatic Islet*. Stem Cells Translational Medicine. 6(4), 1053-1058.
169. ORIVE, G., PEDRAZ, J. L. & HERNANDEZ, R. M. (2009). *Micropartículas de alginato modificado con RGD como sistema de liberación de fármacos*. Pat. Ref: WO 2009000955 A1.
170. SHEN, F., PONCET-LEGRAND, C. & SOMERS S. (2013). *Properties of a novel magnetized alginate for magnetic resonance imaging*, Biotechnology and Bioengineering, 83(3), 282–292.
171. ZEILHUIS, S. W., SEPPENWOOLDE, J. H. & BAKKER C. J. G. (2007). *Characterization of holmium loaded alginate microspheres for multimodality imaging and therapeutic applications*, Journal of Biomedical Materials Research A, 82(4), 892–898.
172. LIU, H., WANG, C., GAO, Q., LIU, X. & TONG, Z. (2010). *Fabrication of novel core-shell hybrid alginate hydrogel beads*, International Journal of Pharmaceutics, 351(2), 104–112.

173. MATHEW, S. (2014) *Characterization of protein-adjuvant coencapsulation in microparticles for vaccine delivery*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 87 (2), 403-407.
174. YOU J. Y. & PENG, C. A. (2014). *Calcium-alginate nanoparticles formed by reverse microemulsion as gene carriers*, Macromolecular Symposia, 219, 147–153.
175. MACHADO, A. H. E., LUNDBERG, D. & RIBEIRO A. J. (2012). *Preparation of calcium alginate nanoparticles using water-in-oil (W/O) nanoemulsions*, Langmuir, 28(9), 4131–4141.
176. HAIDAR, Z. S. HAMDY R. C. & TABRIZIAN M. (2008). *Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes*. Biomaterials, 29(9), 1207-1215.
177. HONG, J. S., VREELAND, W. N., LACERDA, S. H. D., LOCASCIO, L. E., GAITAN, M. & RAGHAVAN, S. R. (2013). *Liposome-templated supramolecular assembly of responsive alginate nanogels*, Langmuir, 24(8), 4092–4096.
178. CHEN, Y., LIN, X., PARK, H. & GREEVER, R. (2009). *Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 5(3), 316–322.
179. GHAFFARI, S., VARSHOSAZ, J., HARIRIAN, I., KHOSHAYAND, M. R., AZARMI, S. & GAZORI, T. (2012). *Ciprofloxacin loaded alginate/chitosan and solid lipid nanoparticles, preparation, and characterization*, Journal of Dispersion Science and Technology, 33(5), 685–689.
180. MAHIDHARA, G., KANWAR, R. K. & KANWAR, J. R. (2012). *Novel nanopatform for oral delivery of anti-cáncer biomacromolecules*, Journal of Nanotechnology, 9(12), 942–960.
181. PAUL W. & SHARMA, C. P. (2012). *Synthesis and characterization of alginate coated zinc calcium phosphate nanoparticles for intestinal delivery of insulin*, Process Biochemistry, 47(5), 882–886.



182. MALIK, B., GOYAL, A. K., MARKANDEYWAR, T. S., RATH, G., ZAKIR, F. & VYAS, S. P. (2012). *Microfold-cell targeted surface engineered polymeric nanoparticles for oral immunization*, *Journal of Drug Targeting*, 20(1), 76–84.
183. AHMAD, Z., PANDEY, R., SHARMA, S. & KHULLER, G. K. (2016). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(5), 420–427.
184. PANDEY, R., AHMAD, Z., SHARMA, S. & KHULLER, G. K. (2015). *Nano-encapsulation of azole antifungals: potential applications to improve oral drug delivery*, *International Journal of Pharmaceutics*, 301(2), 268–276.
185. ARORA, S., GUPTA, S., NARANG, R. K. & BUDHIRAJA, R. D. (2013). *Amoxicillin loaded chitosan-alginate polyelectrolyte complex nanoparticles as mucopenetrating delivery system for H. pylori*, *Scientia Pharmaceutica*, 79(3), 673–694.
186. CHEN, F., ZHANG, Z. R., YUAN, F., QIN, X., WANG, M. & HUANG, Y. (2008). *In vitro and in vivo study of N-trimethyl chitosan nanoparticles for oral protein delivery*, *International Journal of Pharmaceutics*, 349(2), 226–233.
187. OLIVEIRA, C. R., REZENDE, C. M. F., SILVA, M. R., PEGO, A. P., BORGES, O. & GOES, A.M. (2012). *A new strategy based on Smrho protein loaded chitosan nanoparticles as a candidate oral vaccine against schistosomiasis*, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), 1894-1896.
188. HE, W., GUO, Z. & WEN Y. (2012). *Alginate-graft-PEI as a gene delivery vector with high efficiency and low cytotoxicity*, *Journal of Biomaterials Science*, 23(4), 315–331.
189. YANG, S. J., LIN, F. H. & TSAI H. M. (2015). *Alginate-folic acid-modified chitosan nanoparticles for photodynamic detection of intestinal neoplasms*, *Biomaterials*, 32(8), 2174–2182.