



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
**TÍTULO: DESARROLLO DE SISTEMAS
MICRO Y NANOPARTICULARES DE
LIBERACIÓN SOSTENIDA PARA
ADMINISTRACIÓN ORAL**

Autor: Cristina Durán Bretón

Tutor: Paloma Marina de la Torre Iglesias

Convocatoria: Junio 2017

ÍNDICE:

1. Resumen.....	3
2. Introducción y Antecedentes.....	3
3. Objetivos.....	5
4. Metodología.....	5
5. Resultados y discusión.....	5
Sistemas nanoparticulares para la administración de insulina por vía oral	
5.1. Nanopartículas de quitosano.....	7
5.1.1. Nanopartículas de quitosano/tripolifosfato de sodio.....	8
5.2. Nanopartículas de alginato.....	9
5.2.1. Nanopartículas de quitosano/alginato.....	9
5.3. Nanopartículas de ácido poli (láctico-co-glicólico).....	10
5.3.1. Nanopartículas de PLGA/ Eudragit® RS.....	11
5.4. Nanopartículas de dextrano.....	12
5.4.1. Nanopartículas de alginato/sulfato de dextrano recubiertas con CS/ALB.....	12
5.5. Nanopartículas de ácido hialurónico.....	15
5.6. Nanopartículas de poli (ε-caprolactona).....	16
5.6.1. Nanopartículas de PCL/Eudragit® RS.....	16
6. Conclusiones.....	17
7. Bibliografía.....	18

1. RESUMEN

En la actualidad, el diseño de sistemas micro y nanoparticulares ha supuesto un gran avance por sus numerosas aplicaciones en medicina, siendo utilizados para el tratamiento del cáncer, la administración de fármacos o vacunas, entre otros. Este trabajo se centra en el desarrollo de nanopartículas poliméricas para la administración de insulina por vía oral, utilizadas para el tratamiento de la diabetes mellitus. Se han estudiado las estrategias empleadas en su diseño para resistir a las distintas barreras del tracto gastrointestinal y así conseguir que la insulina pueda ser absorbida a nivel intestinal. También se ha investigado su composición y estructura, los métodos de preparación y los resultados *in vitro* e *in vivo* obtenidos. Son sistemas que actualmente no están comercializados y se encuentran en investigación por las industrias farmacéuticas, pasando por las diferentes fases de los ensayos clínicos.

Palabras clave: nanopartículas, liberación oral, insulina.

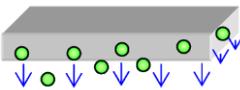
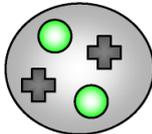
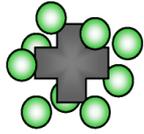
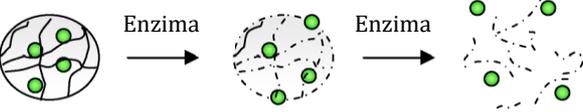
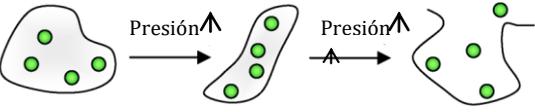
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La administración oral es la más utilizada para la liberación de medicamentos por sus numerosas ventajas: está asociada a un mayor grado de cumplimiento por el paciente al permitir la autoadministración y ofrecer gran flexibilidad en el régimen de dosificación, pero en muchos casos se ve dificultada por las barreras químicas y enzimáticas del tracto gastrointestinal. Para optimizar las fórmulas, su liberación eficiente y la biodisponibilidad, se han desarrollado sistemas nanoparticulares que aumentan el tiempo de vida media y disminuyen el aclaramiento⁽¹⁾. Las nanopartículas (NPs) son encapsuladas y protegidas por sistemas que permiten atravesar las capas de mucus que secreta el epitelio de forma natural. Estas capas mucosas se encargan de proteger las superficies epiteliales, atrapando patógenos y partículas extrañas⁽²⁾.

Las nanopartículas que penetran a través de las capas de mucus, entran en contacto con las superficies celulares del intestino y pasan a circulación sanguínea. Se han utilizado ligandos en la superficie de las nanopartículas para diversos receptores expresados en el intestino, mejorando su captación⁽³⁾.

Las propiedades reológicas y mucoadhesivas de esta capa mucosa limitan el tiempo de residencia de las NPs⁽⁴⁾. Para aumentar este tiempo, mejorar la degradación del fármaco y facilitar la interacción de las nanopartículas con tejidos y células del tracto gastrointestinal, se han desarrollado distintas estrategias recogidas en la Tabla 1⁽⁵⁾.

Tabla 1 - Ejemplos de estrategias para mejorar la liberación de las biomacromoléculas por los transportadores nano- y microparticulares.

	ESTRATEGIAS
<p>Mucoadhesivas</p> <p>Adhesión entre el transportador y la capa de mucus para prolongar el tiempo de contacto entre el transportador y la superficie epitelial.</p>	 <p>Moléculas mucoadherentes conjugadas a partículas superficiales.</p>
	 <p>Composición polimérica modificada para aumentar mucoadhesión.</p>
	 <p>Liberación de partículas desde la zona mucoadhesiva.</p>
<p>Magnéticamente controladas</p> <p>Incorporan partículas magnéticas para prolongar el tiempo de residencia en el intestino al aplicar un campo magnético externo.</p>	 <p>Nanopartículas magnéticas co-encapsuladas con el contenido biomolecular de las nanopartículas.</p>
	 <p>Formación de un complejo electrostático entre partículas magnéticas y el contenido biomolecular de las nanopartículas.</p>
<p>Sensibles a los estímulos</p> <p>Utilizando señales ambientales (pH, enzimas, presión) para desencadenar el movimiento del contenido biomolecular de las partículas a regiones localizadas del tracto gastrointestinal.</p>	<p>pH:</p>  <p>A bajo pH, la partícula está colapsada y protege la carga. A pH neutro, se hincha al entrar al intestino. Al aumentar el pH, se disuelve.</p>
	<p>Enzimas:</p>  <p>La enzima la degrada y libera el contenido.</p>
	<p>Presión:</p>  <p>Deformación con la presión y liberación.</p>

Estos sistemas se utilizan actualmente para la administración oral de numerosas vacunas y fármacos, como la insulina. Se están desarrollando nuevas insulinas orales para mejorar sus limitaciones, haciendo su administración más aceptable para algunos pacientes al evitar la inyección subcutánea y logrando un mayor control glucémico. Su principal ventaja se basa en que la ingesta de esta hormona es similar al camino de la insulina natural, que se produce en el páncreas y va directamente al hígado⁽⁶⁾.

3. OBJETIVOS

Este trabajo consiste en analizar los nuevos sistemas para la administración de insulina por vía oral. Se trata de un estudio descriptivo de las distintas estrategias de liberación sostenida de nanopartículas investigadas en la actualidad.

4. METODOLOGÍA

Se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos de libre acceso publicados en las bases de datos: PubMed, ScienceDirect y Google Scholar. Para la búsqueda sistemática se utilizaron las palabras clave: “nanoparticle”, “oral delivery”, “drug delivery”, “insulin”, “insulin administration”, “diabetes”, “pH-sensitive nanoparticles”, “chitosan”, “PLGA”. Como criterios de inclusión se estableció la selección de publicaciones tipo revisión, textos completos y con menos de 10 años de antigüedad. A través de la página de la Biblioteca de la Universidad Complutense (BUCea) se pudo acceder a los artículos de no libre acceso y se hizo una búsqueda exhaustiva revisando la bibliografía incluida en los artículos seleccionados con el fin de localizar estudios adicionales.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sistemas nanoparticulares para la administración de insulina por vía oral:

La insulina es utilizada para tratar la diabetes mellitus. La terapia más corriente es por vía subcutánea, que a menudo falla en imitar la homeostasis de la glucosa en individuos normales. Ésto ha provocado que haya numerosos intentos de desarrollar una administración de insulina eficaz y no invasiva por diferentes vías. La vía oral es la administración más conveniente, sin embargo, la insulina no puede ser bien absorbida debido a su degradación enzimática en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, se han utilizado nanopartículas para facilitar su captación por vía transcelular y/o paracelular. Estos sistemas pueden llevar inhibidores enzimáticos, como colato de sodio y aprotinina, que permiten aumentar la insulina disponible para su absorción⁽⁷⁾. También pueden contener potenciadores de la absorción como sales biliares, citrato trisódico, EDTA, labrasol y materiales poliméricos (por ejemplo, quitosano), que ayudan a abrir las estrechas uniones del epitelio intestinal⁽⁸⁾.

Se disminuye el tamaño molecular de la insulina cuando es transportada por nanopartículas para aumentar su biodisponibilidad. De esta manera, la hormona es resistente a la degradación química y enzimática gástrica, llegando al intestino delgado para ser absorbida⁽⁷⁾. A continuación, las NPs entran en contacto con el epitelio intestinal y atraviesan el mucus, al tener una superficie-volumen mayor que las micropartículas, pueden aumentar significativamente su unión con las células.

Existen dos vías de captación de NPs: a) transcelular, en el que pueden ser absorbidas por enterocitos o células M por transporte activo; y b) paracelular, utilizando potenciadores catiónicos y aniónicos para abrir el espacio entre las células (Figura 1)⁽⁹⁾. Las nanopartículas son transportadas al hígado a través de la circulación portal, promoviendo el control de glucosa en sangre⁽¹⁰⁾.

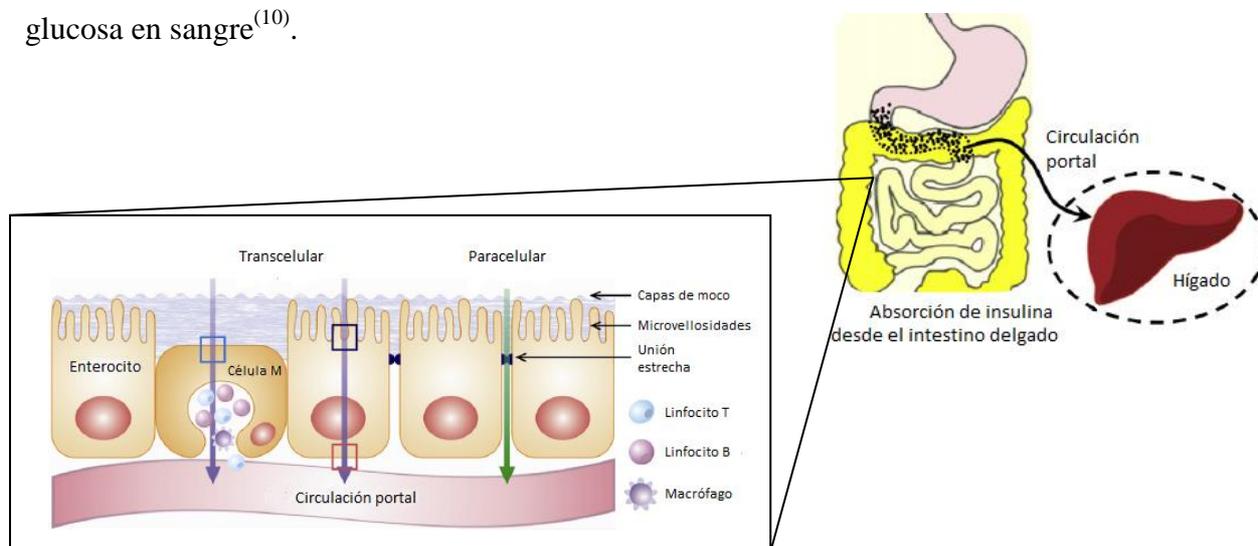


Figura 1 – Mecanismo de absorción de las nanopartículas en el intestino delgado.

Las nanopartículas tienen un tamaño de 1-100 nm. Existen varios tipos de nanotransportadores para la administración de insulina: nanopartículas poliméricas, liposomas, nanopartículas sólidas lipídicas y micelas. Las más utilizadas son las nanopartículas poliméricas y hay dos tipos: nanocápsulas y nanoesferas. Las nanoesferas están formadas por una matriz polimérica en la que las partículas de insulina están uniformemente dispersas y las nanocápsulas contienen las partículas de insulina en el interior rodeadas por una membrana polimérica⁽¹¹⁾ (Figura 2)⁽¹²⁾.

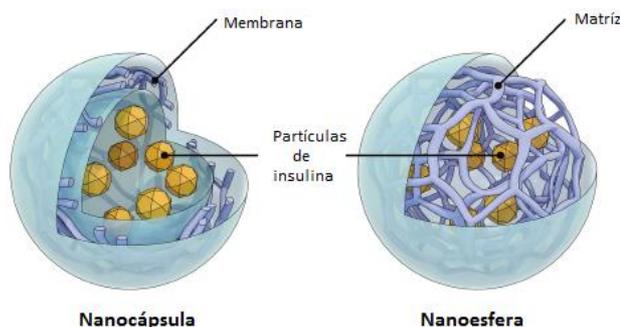


Figura 2 – Estructura de las nanopartículas poliméricas.

Los materiales poliméricos, sintéticos o naturales, de las nanopartículas modulan la liberación de la insulina y su actividad farmacológica. Tienen particular interés en la administración oral de la insulina porque son biocompatibles, biodegradables, no tóxicos e hidrófilos⁽⁷⁾. Existen distintos materiales dependiendo del método de preparación utilizado, recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2 – Polímeros y métodos aplicados para preparar las nanopartículas.

Método de preparación	Material usado
Nanocomplejación flash (FNC)	Quitosano/tripolifosfato de sodio
Gelificación iónica y coacervación compleja	Quitosano/alginato
Evaporación del disolvente por múltiples emulsiones	Ácido poli(láctico-co-glicólico)/Eudragit® RS
Emulsificación/gelificación interna	Alginato/sulfato de dextrano
Congelación y secado por emulsión inversa	Ácido hialurónico
Emulsión múltiple	Poli (ε-caprolactona)/Eudragit® RS

5.1.-Nanopartículas de quitosano

El quitosano (CS) es el material más utilizado en las nanopartículas para la liberación de insulina. Es un polímero mucoadhesivo y policationico, compuesto por N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina producido por la destilación alcalina de quitina. Se disuelve fácilmente en condiciones ácidas debido a su naturaleza básica ($pK_a \approx 6.5$), comprometiendo a la protección de la insulina en las vías gástricas y convirtiéndose en un polímero catiónico con una alta carga positiva. Para solucionarlo y lograr una mayor biodisponibilidad de la insulina en el intestino, surgió la combinación del quitosano con otros polímeros, péptidos y otros derivados de quitosano^(13,14). La propiedad mucoadhesiva y la capacidad del quitosano de producir la apertura irreversible de la unión estrecha epitelial, podrían mejorar el transporte paracelular de la insulina contenida en las nanopartículas.

El método más común para su preparación es la coacervación compleja de polielectrolitos; las nanopartículas con buena eficacia de encapsulación y retención de bioactividad se preparan en condiciones más suaves. También se compleja con otros polianiones incluyendo heparina, ácido hialurónico o tripolifosfato de sodio (TPP) para atrapar la insulina. La mezcla de los polielectrolitos se consigue normalmente mediante mezcla manual o adición gota a gota. La reproducibilidad de estos métodos es deficiente y la calidad de los nanopartículas es a menudo

subóptima con una amplia distribución de tamaños y no uniforme, por lo tanto, se plantean nuevos desafíos para la producción de nanopartículas bien controladas estableciendo una relación estructura-actividad precisa⁽¹⁵⁾.

5.1.1. Nanopartículas de quitosano/tripolifosfato de sodio:

Se consideran buenos materiales para la administración oral de insulina porque no son tóxicos ni irritantes. Debido a la carga natural de la insulina se puede introducir fácilmente en las nanopartículas sin reticulantes químicos adicionales o disolventes orgánicos. Los métodos actuales para su preparación implican gelificación iónica de quitosano y TPP, posteriormente la insulina se combina electrostáticamente con los complejos obtenidos y se sintetiza quitosano/TPP/insulina. Estos métodos son poco óptimos al generar una baja estabilidad coloidal, deficiente reproducibilidad y en términos de distribución de tamaños

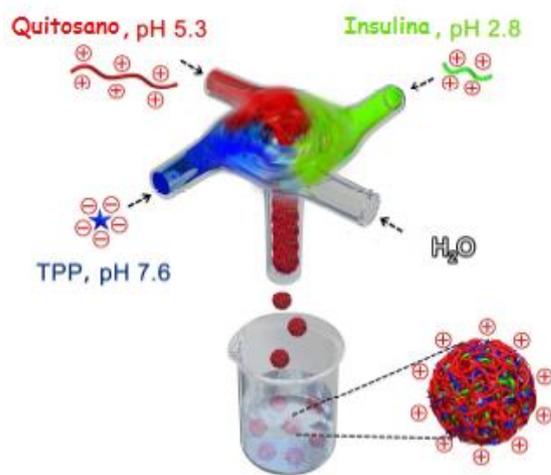


Figura 3 – Esquema del sistema FNC

heterogéneos^(14,16). Actualmente se ha desarrollado un nuevo método para solucionarlo denominado nanocomplejación flash (FNC), variando el caudal, el pH y las concentraciones del polielectrolito. Como en la nanoprecipitación flash, se utilizan un mezclador de chorro confinado (CIJ) o un mezclador de vórtice de entrada múltiple (MIVM) para facilitar la mezcla rápida y eficiente de dos o más soluciones de polielectrolito, a través de corrientes

separadas, logrando así una separación de fases uniforme y la formación de la nanopartícula (Fig. 3)^(15,17).

En el estudio realizado en ratas diabéticas tipo I por He,Z., *et al.*⁽¹⁵⁾ donde el nivel de glucosa en sangre de referencia fue aproximadamente de 16 mM, cuando recibieron la administración oral de insulina o la insulina en nanopartículas envasadas en cápsulas entéricas a una dosis equivalente a 60 UI/Kg de insulina, no hubo cambios en el nivel de glucosa en sangre durante las primeras 3 horas porque fue el tiempo que tardó en llegar al intestino delgado. Al cabo de 3 h de administración oral de insulina sola (sin NPs), después de recibir una inyección intraperitoneal de 2g/kg de glucosa, se produjo un aumento de dos veces el nivel de glucosa en sangre cuando pasó una hora. Comparando tres grupos que recibieron nanopartículas de quitosano/TPP/insulina de diferentes diámetros (45;115 y 240 nm), las nanopartículas de

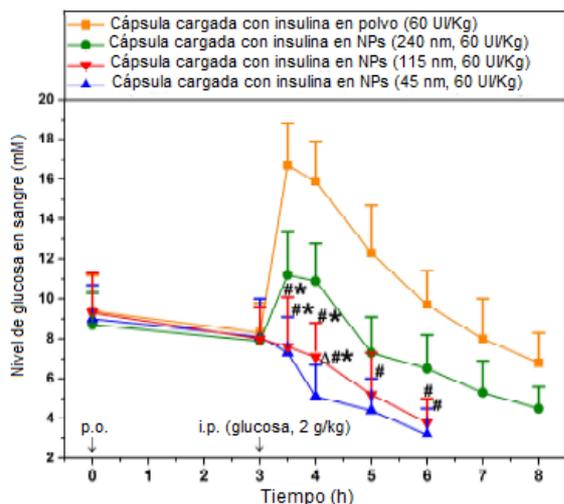


Figura 4 – Niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas (NPs CS/TPP/insulina)

45 nm y 115 nm mostraron eficacia disminuyendo el nivel de glucosa en sangre en comparación con el grupo de 240 nm. Sólo el grupo de 240 nm aumentó aproximadamente un 50% el nivel de glucosa en sangre, con mejores resultados que los obtenidos por la administración de insulina sólo. El experimento se detuvo 6 horas después de la dosificación inicial para evitar la reacción hipoglucémica de los animales. Estos resultados demostraron la eficacia de las nanopartículas cargadas de insulina al reducir los niveles de glucosa en sangre. Es un método fácil, reproducible y económicamente efectivo para ser utilizado (Fig. 4).

nanopartículas cargadas de insulina al reducir los niveles de glucosa en sangre. Es un método fácil, reproducible y económicamente efectivo para ser utilizado (Fig. 4).

5.2.-Nanopartículas de alginato

El alginato es un polisacárido lineal, natural, soluble en agua y extraído del alga marrón. Es aniónico y está formado por el ácido (1-4) β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G); estos residuos G, con iones divalentes, tienen propiedades gelificantes que permiten la formación de nanopartículas⁽¹⁸⁾. Al ser de pH bajo es muy sensible al mismo, lo que permite la retención del fármaco encapsulado en el estómago mientras que lo protege contra la desactivación enzimática. Las propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad, baja inmunogenicidad y buena mucoadhesión facilitan su aplicación en la administración oral de fármacos⁽¹⁹⁾.

5.2.1. Nanopartículas de quitosano/alginato:

Se ha observado que las nanopartículas de quitosano/alginato son eficientes para proteger la insulina del ambiente agresivo del estómago y la liberación sostenida de insulina se da en el intestino. Además han mostrado efectos hipoglucémicos significativos en los estudios desarrollados en ratas⁽²⁰⁾. Las nanopartículas se preparan utilizando un método de dos pasos: en primer lugar se añade cloruro de calcio gota a gota a una solución acuosa de alginato, después se

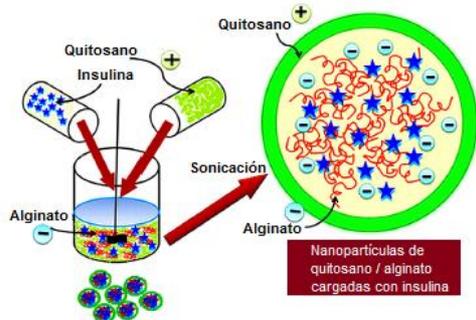


Figura 5 – Esquema preparación de nanopartículas de quitosano/alginato

insulina del ambiente agresivo del estómago y la liberación sostenida de insulina se da en el intestino. Además han mostrado efectos hipoglucémicos significativos en los estudios desarrollados en ratas⁽²⁰⁾. Las nanopartículas se preparan utilizando un método de dos pasos: en primer lugar se añade cloruro de calcio gota a gota a una solución acuosa de alginato, después se

sonica con una sonda, aplicando energía de sonido para agitar las partículas. A continuación, la solución de quitosano y la insulina, disuelta en ácido clorhídrico, se añaden gota a gota al pre-gel de alginato de calcio resultante y se sonica a temperatura ambiente. Finalmente, se forma la nanopartícula recubierta formada por quitosano/alginato/insulina (Figura 5). Su estructura química de núcleo recubierto es diseñada para reducir el tamaño de partícula, asegurando la protección eficaz del interior. *Mukhopadhyay, P., et al.*⁽²¹⁾ investigaron las respuestas hipoglucémicas de la insulina cargada en las nanopartículas administradas por vía oral comparándolas con el control (inyección subcutánea de insulina con dosis: 5 UI/Kg/peso corporal) en ratones diabéticos. El nivel de glucosa en sangre, al administrar la insulina subcutánea, comenzó disminuyendo significativamente en 30-45 minutos y alcanzó 85 mg/dl a las dos horas de la inyección. Posteriormente, se observó un aumento del nivel de glucosa en la sangre y volvió a su nivel basal a las 5-6 horas. Sólo la insulina oral (no encapsulada) no pudo producir ningún efecto hipoglucémico notable en ratones diabéticos. Las nanopartículas de quitosano/alginato cargadas de insulina a dosis de 50 y 100 UI/Kg de peso corporal, mostraron una reducción significativa de la glucemia y el nivel de glucosa en sangre se redujo a 143 y 104 mg/dl, respectivamente, después de la séptima hora de administración y el efecto se mantuvo al menos hasta 9 horas. Se produjo una acción hipoglucémica más rápida con la dosis de insulina de 100 UI/Kg comparada con 50 UI/Kg, indicando que el nivel de absorción de la insulina en el intestino no había alcanzado su punto de saturación. Por lo tanto, los resultados obtenidos indicaron una absorción intestinal significativa de la insulina, mostrando efectos hipoglucémicos y con una buena biodisponibilidad de insulina en ratones diabéticos.

5.3.-Nanopartículas de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA)

PLGA es un poliéster co-polímero alifático. Es uno de los polímeros sintéticos más utilizados para producir nanopartículas para la administración oral de la insulina, debido principalmente a su biodegradabilidad y biocompatibilidad, así como por sus perfiles de liberación sostenida. PLGA puede ser combinado con otros polímeros o revestidos con diferentes ligandos, atribuyendo a las nanopartículas características importantes⁽²²⁾. La ligera carga superficial negativa de las nanopartículas de PLGA (PLGA-NP) tienden a limitar su capacidad de interactuar con los plásmidos cargados negativamente y la captación intracelular, lo que reduce su biodisponibilidad. Se han hecho intentos para modificar la carga superficial de PLGA-NP⁽²³⁾. Existen varias combinaciones de PLGA con otros componentes como: polietilenglicol (PEG), lípidos, quitosano o Eudragit[®] RS.

5.3.1. Nanopartículas de PLGA/Eudragit® RS (cápsula con revestimiento HP55):

Dado que la primera barrera de la insulina oral en el tracto gastrointestinal es la degradación enzimática, seguida de la segunda barrera que es la mala absorción intestinal, es interesante utilizar sistemas de entrega multietapa para conseguir el objetivo terapéutico fijado. El sistema de suministro con sensibilidad al pH y la propiedad mucoadhesiva podrían tener un gran efecto sinérgico^(24,25). Las cápsulas de gelatina dura están recubiertas con un polímero entérico sensible al pH, hidroxipropilmetilcelulosa ftalato (HPMCP HP55, pKa 5,5), diseñadas para superar la primera barrera. Mientras que las nanopartículas catiónicas cargadas con insulina compuestas por PLGA y Eudragit® RS (RS) (sustancia no degradable, pero polímero mucoadhesivo biocompatible), fueron diseñadas para superar la segunda barrera. Las cápsulas recubiertas con HP55 puede disolverse rápidamente en la región superior del intestino delgado (pH > 5,5) liberando las nanopartículas catiónicas. Las nanopartículas catiónicas tienen como objetivo abrir la unión estrecha que hay entre los enterocitos y mejorar la absorción de la insulina liberada (Figura 6).

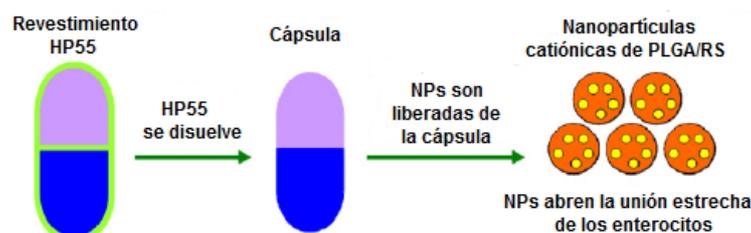


Figura 6 – Esquema del transporte de la insulina a través de NPs catiónicas en cápsulas entéricas.

Las nanopartículas de PLGA/RS cargadas con insulina se preparan por el método de evaporación de disolventes mediante múltiples emulsiones por ultrasonidos. Se investigan y examinan los parámetros de preparación en la encapsulación: la eficiencia de encapsulación (EE), el tamaño de las nanopartículas, su caracterización físico-química como la morfología, el diámetro, el potencial zeta, la eficiencia de carga de la insulina, y la estabilidad de las nanopartículas en medio gastrointestinal. Las cápsulas se evalúan para la liberación *in vitro* de la insulina y la eficacia biológica *in vivo* después de la administración oral en ratas diabéticas⁽²⁶⁾.

Se estudiaron los perfiles de nivel de glucosa por Wu, ZM., et al.⁽²⁶⁾, después de la administración oral en ratas diabéticas de la cápsula recubierta por HP55 que contiene las nanopartículas de PLGA/RS cargadas de insulina (50 UI/Kg), nanopartículas de PLGA/RS en blanco (50 UI/Kg, control negativo) y la solución de insulina libre en inyección por vía subcutánea (5 UI/Kg, control positivo). Como era de esperar, no se observó un efecto

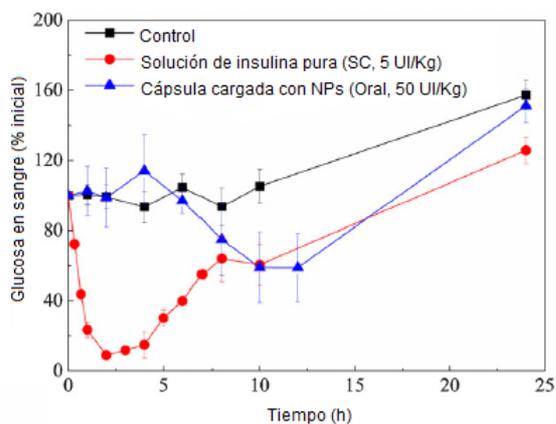


Figura 7 - Niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas (NPs PLGA/RS)

hipoglucémico en el grupo de control negativo. Sin embargo, la administración de la cápsula que contiene nanopartículas cargadas de insulina y la inyección subcutánea de solución de insulina libre mostraron un efecto hipoglucémico significativo en las ratas diabéticas. Los niveles de glucosa en sangre disminuyeron bruscamente (90% en 2 horas) después de la inyección subcutánea de la solución de insulina y volvió a los niveles basales a las 10 horas. Considerando que los niveles de glucosa en sangre se fueron reduciendo después de la administración oral de las cápsulas, el ligero aumento de la glucosa en sangre durante las primeras 4 horas fue posiblemente debido al estrés físico de las ratas diabéticas durante el manejo y muestreo de la sangre⁽²⁷⁾ (Fig.7). La disponibilidad farmacológica fue aproximadamente del 9,2%. La eficacia hipoglucémica observada puede deberse al efecto sinérgico de la entrega en dos etapas. La estabilidad coloidal de las nanopartículas PLGA/RS en medio básico puede aumentar la posibilidad de que se distribuyan y se adhieran a la región del intestino.

5.4.-Nanopartículas de dextrano

El dextrano es un polisacárido natural, altamente soluble en agua, compuesto por unidades de α -D-glucosa que se unen entre sí a través enlaces glucosídicos⁽²⁸⁾. Tiene muchos grupos hidroxilo que facilita una amplia gama de modificaciones químicas. Algunos estudios han informado de que el uso de dextrano en formulaciones de nanopartículas ha mejorado la adhesión con el tracto gastrointestinal⁽²⁹⁾. Al ser similar al quitosano, se usa en biomedicina como un constituyente de las nanopartículas para la liberación de insulina por vía oral y se puede combinar con distintos materiales para una liberación dirigida y controlada del fármaco⁽³⁰⁾.

5.4.1. Nanopartículas de alginato/sulfato de dextrano recubiertas de quitosano/albúmina:

Estas nanopartículas están formadas por distintos componentes que aportan varias funciones para superar las múltiples barreras frente a la insulina oral y mejorar su permeabilidad a través del epitelio. Son nanopartículas formuladas por alginato/sulfato de dextrano (ADS-NPs) cargadas de insulina y con doble recubrimiento con quitosano (CS) y albúmina (ALB). El nanosistema es caracterizado por su sensibilidad al pH y mucoadhesividad. Entre los

componentes, el alginato ha demostrado incorporar enzimas, fármacos y proteínas atrapándolos o fijándolos en la matriz de las partículas⁽³¹⁾. El sulfato de dextrano aumenta la carga de fármacos hidrófilos en matrices de alginato⁽³²⁾. El quitosano es un polímero catiónico mucoadhesivo que aumenta el tiempo de residencia de los sistemas de administración en el sitio de absorción y aumenta la permeabilidad de los fármacos abriendo las uniones estrechas presentes entre las células epiteliales intestinales⁽³³⁾. La utilización de albúmina como capa de recubrimiento de las NPs junto con el quitosano se debe a su capacidad para evitar la degradación de la insulina por acción de las proteasas y para promover la estabilidad de las NPs en medio ácido o en el medio ambiente intestinal. La albúmina es un transportador de proteínas versátil para la administración de fármacos, caracterizada por sus propiedades no inmunogénicas, no tóxicas, biodegradables y biocompatibles⁽³⁴⁾.

El método utilizado para preparar estas nanopartículas es el de emulsificación/gelificación interna. Se forma la estructura de “caja de huevos”, compuesta por calcio y alginato, al disminuir el pH de la nanoemulsión agua/aceite (A/O) por la adicción de ácido acético (carbonato de calcio + calcio) gota a gota, permitiendo la liberación controlada de calcio. La insulina es atrapada en la matriz de las NPs por la presencia de sulfato de dextrano. La capa de recubrimiento doble formada por quitosano/albúmina se genera por acomplejamiento de polielectrolitos por la adicción gota a gota de quitosano (quitosano/polietilenglicol/CaCl₂) y albúmina (Figura 8)⁽³⁵⁾.

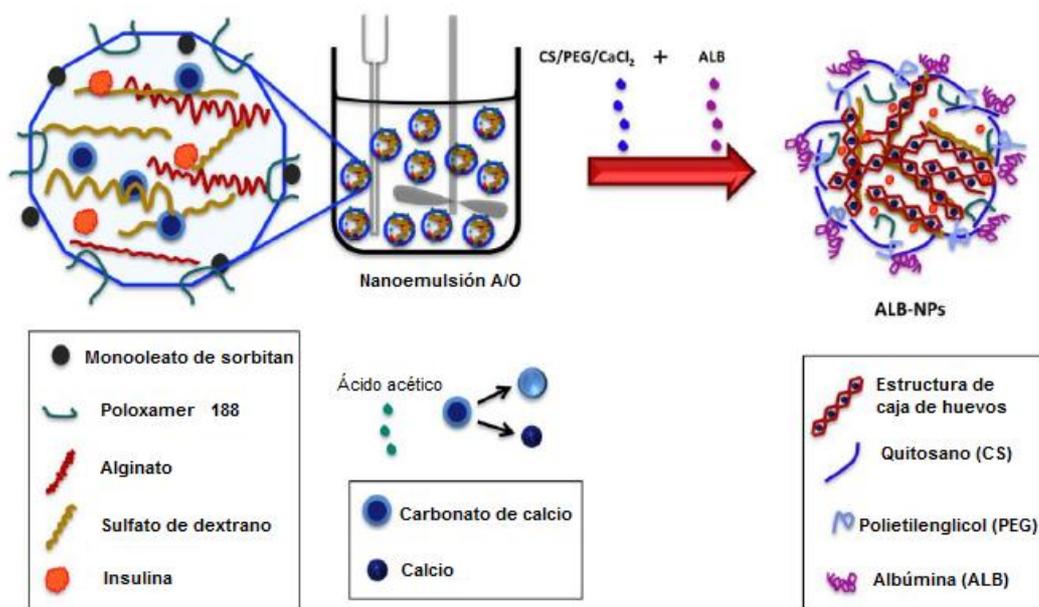


Figura 8 – Esquema de la técnica de emulsificación/gelificación interna para preparar las NPs cargadas de insulina.

Estas nanopartículas no han sido estudiadas aún en animales, sólo existen estudios *in vitro* realizados por Lopes, M., et al⁽³⁵⁾, en células AGS, Caco-2 y HT29-MTX, para saber que son seguras y citocompatibles, al realizar las pruebas de liberación de la insulina en condiciones gastrointestinales desencadenada por el pH. Las líneas celulares fueron seleccionadas por ser modelos que imitan a los diferentes tipos de células del tracto gastrointestinal (por ejemplo, estómago, enterocitos y células que secretan mucus) y que por lo tanto, son relevantes en la administración por vía oral. La viabilidad *in vitro* de las células se analizó exponiéndolas a nanopartículas de diferentes concentraciones (0,1, 0,25, 0,5 y 1 mg/ml) para diferentes tiempos de incubación (3 horas para las células AGS, 6 horas para las células Caco-2 y HT29-MTX). La utilización de diferentes concentraciones se hizo para saber si había alguna toxicidad dependiente de la concentración y para evaluar la concentración más baja de las NPs que se pueden administrar con seguridad para un futuro estudio *in vivo*.

Para las células AGS, los ADS-NP mostraron viabilidades celulares superiores al 90%. Los CS-NP mostraron la citotoxicidad con las dos concentraciones más altas, que se invirtió después del revestimiento con albúmina. Para las células Caco-2, se pudo observar que todas las NPs en todas las concentraciones, excepto las concentraciones más altas de CS-NP, mostraron valores de viabilidad celular más altos después de las 6 horas de exposición. Los resultados más satisfactorios fueron obtenidos por las células HT29-MTX, en las que no se detectaron efectos de toxicidad, independientemente del tipo y de la concentración de las NPs. Esto se debe a la presencia de capa de mucus en la parte superior de las células HT29-MTX, evitando la fuerte interacción entre las células y las NPs, y minimizando cualquier daño celular. En cambio, las células Caco-2 al no tener esta capa tienen una mayor probabilidad de citotoxicidad. En las células AGS, la ausencia de citotoxicidad se atribuye hipotéticamente a la carga negativa superficial de las NPs, dando como resultado una baja interacción celular.

Por lo tanto, son nanopartículas compuestas por polímeros biocompatibles y biodegradables utilizadas para la prevención o tratamiento de la diabetes mellitus tipo I, que mejoran la permeabilidad de la insulina a través de la pared intestinal. Esta permeabilidad se incrementa por la presencia de quitosano y albúmina, que mejoran las interacciones de las nanopartículas con las células intestinales y ocurre por transporte activo mediado por la endocitosis mediada por clatrina. Las interacciones electrostáticas entre las nanopartículas cargadas positivamente y el glucocálix cargado negativamente también es un proceso crucial para que se de la absorción de la insulina en el intestino.

5.5.- Nanopartículas de ácido hialurónico

El ácido hialurónico (AH) es un bipolímero natural polianiónico compuesto por ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina, unidos por enlaces glucosídicos alternos β -1,4 y β -1,3. Es uno de los componentes principales de la matriz extracelular de los tejidos conectivos y está presente en el líquido sinovial de las articulaciones, en el cuerpo vítreo, en el cordón umbilical y en los andamios que forman el cartílago. Juega un papel importante en muchos procesos biológicos como la hidratación de los tejidos, la organización de la matriz extracelular, en la lubricación y en la cicatrización de heridas^(36,37). Ha sido ampliamente investigado en biomedicina por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y estructura química fácilmente modificada⁽³⁸⁾.

En el estudio realizado por *Han, L., et al.*⁽³⁹⁾, se describe la preparación y caracterización de las nanopartículas de ácido hialurónico cargadas de insulina. Estas nanopartículas protegen a la insulina de las enzimas proteolíticas y del ambiente gástrico. Para la preparación se realiza un método de congelación y secado por emulsión inversa (REFD) en dos pasos. El primer paso consiste en preparar una solución de nanopartículas dispersas de AH con insulina cargada, al realizar una emulsión agua/aceite (A/O) con insulina, ácido hialurónico y NPs, formándose un enlace cruzado al mezclarlo por agitación. El segundo paso consiste en obtener nanopartículas de AH cargadas de insulina en polvo seco, al mezclar una emulsión de manitol A/O con la solución de nanopartículas dispersas de AH con insulina cargada, formándose una mezcla de NPs que es congelada y posteriormente liofilizada (Figura 9). Las nanopartículas tenían un tamaño medio de 182,2 nm y una alta eficiencia de atrapamiento (aproximadamente el 95%).

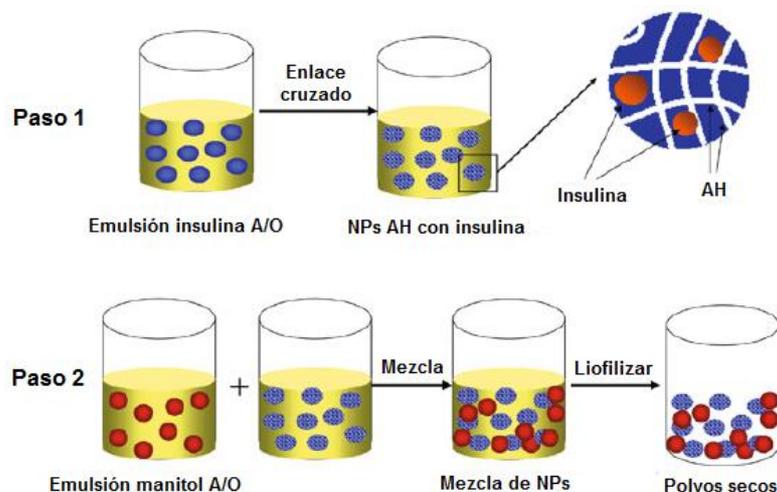


Figura 9 – Preparación de NPs de AH cargadas con insulina por el método de congelación y secado por emulsión inversa.

Al medir los niveles de glucosa en sangre en ratas a las que se les había inducido la diabetes al administrarles estreptozotocina, se evaluaron las nanopartículas de ácido hialurónico. Las ratas diabéticas que recibieron tratamiento oral con 50 UI/Kg de nanopartículas de AH cargadas de insulina mostraron perfiles hipoglucémicos, induciendo una disminución del

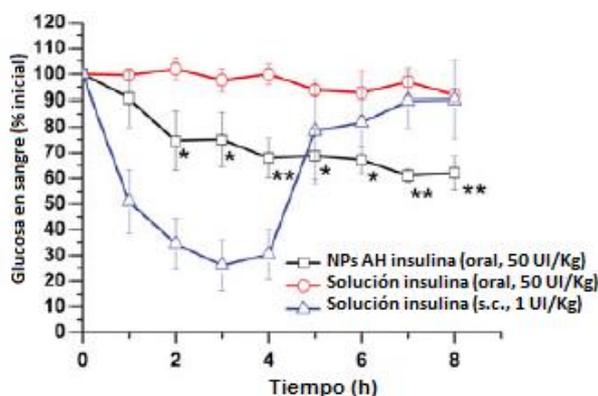


Figura 10 – Niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas (NPs AH).

nivel de glucosa en sangre de 24% en dos horas y de 32-39% durante 3-8 horas. Por el contrario, el grupo tratado con la misma dosis de solución de insulina no mostró ningún cambio en el nivel de glucosa en sangre durante el periodo experimental. En comparación con las ratas diabéticas tratadas con insulina oral, los niveles de glucosa en sangre disminuyeron estadísticamente en el grupo de diabéticos

tratados con nanopartículas de AH cargadas de insulina ($p < 0,05$).

Sin embargo, las ratas diabéticas inyectadas por vía subcutánea con solución de insulina indicaron un efecto hipoglucémico mucho más fuerte después del tratamiento en 4 horas en comparación con el grupo con el tratamiento oral de nanopartículas de AH cargadas con insulina. Estos resultados demostraron que las nanopartículas poseían efectos antidiabéticos orales más intensos que la solución de insulina, y su efecto hipoglucémico no era todavía comparable al de inyecciones de insulina (Figura 10).

5.6.- Nanopartículas de poli (ϵ -caprolactona) (PCL)

Poli (ϵ -caprolactona) es un poliéster biodegradable y biocompatible, un polímero termoplástico, reconocido por sus buenas propiedades de liberación sostenida. Su perfil de degradación, aún más lento que el de PLGA, hace que sea excelente para la liberación prolongada de fármacos⁽⁴⁰⁾.

5.6.1. Nanopartículas de poli (ϵ -caprolactona)/Eudragit® RS:

El estudio realizado por Damgé, C. et al.⁽⁴¹⁾ desarrolló nanopartículas formadas por un polímero biodegradable: PCL y un polímero mucoadhesivo no biodegradable, pero biocompatible: Eudragit® RS, con una proporción de polímeros 50/50 para la administración de insulina por vía oral. El método de preparación de las partículas fue por la técnica de emulsión múltiple, logrando una AE de aproximadamente un 96%.

Las nanopartículas se administraron a ratas diabéticas por vía oral, cargadas de insulina con dosis: 25, 50 y 100 UI / kg. Las que recibieron una dosis de 50 UI/Kg en ayunas, redujeron la glucemia a la media hora. La disminución máxima se alcanzó con 100 UI / kg.

Además, se marcaron las nanopartículas cargadas de insulina con isotiocianato de fluoresceína y se observó una película fluorescente delgada en contacto con el polo apical de los enterocitos. La causa de que se adhieran fuertemente a la mucosa es debida principalmente a las propiedades mucoadhesivas de Eudragit® RS, ya que se da la atracción de las nanopartículas positivas y la capa de mucus electronegativo. Por lo tanto, además de su absorción por vía paracelular, las nanopartículas también podrían ser absorbidas por transcitosis a través de las placas de Peyer, folículos linfoides que son más numerosos en el íleon.

6. CONCLUSIONES

La administración oral de la insulina es la nueva alternativa a la vía subcutánea, considerada la más indicada por su imitación a la vía endógena y al proporcionar mejor homeostasis de la glucosa. Las principales estrategias para su elaboración están centradas en evitar la degradación química y enzimática en el tracto gastrointestinal y la baja permeabilidad a través de la capa de las células epiteliales en el intestino. Para ello, se han desarrollado nuevos sistemas nanoparticulares de distintas composiciones que encapsulan la insulina modulando su liberación y actividad farmacológica, siendo las nanopartículas poliméricas las más usadas.

A pesar de los esfuerzos y los deseos de los pacientes diabéticos, todavía no hay ningún producto en el mercado y actualmente, la industria farmacéutica lo está investigando, encontrándose aún en fases de ensayos clínicos. Esto es debido a las desventajas encontradas, ya que puede producir toxicología a largo plazo y efectos secundarios generados en el intestino al administrar grandes cantidades de insulina necesarias para formular estos sistemas. Además, la necesidad de mayor dosis afecta al rendimiento económico, al suponer un aumento del presupuesto para la elaboración de las nanopartículas.

No obstante, el camino de investigación está bien marcado y la estrategia del uso de nanopartículas puede convertirse en el futuro una posible respuesta a la búsqueda de sistemas para la administración de insulina por vía oral.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Lin, CH. et al. Recent advances in oral delivery of drugs and bioactive natural products using solid lipid nanoparticles as the carriers. *Journal of Food and Drug Analysis* XXX. 2017; 1-16.
2. Ensign, L., Cone, R., Hanes, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64:557-570.
3. Date, AA., Hanes, J., Ensign, LM. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. *Journal of Controlled Release*. 2016; 240:504-526.
4. Lundquist, P., Artursson, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 106:256-276.
5. Yamanaka, Yvonne J., Leong Kam W. Engineering strategies to enhance nanoparticle-mediated oral delivery. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012; 19:12, 1549-1570.
6. Woo, VC. New Insulins and New Aspects in Insulin Delivery. *Canadian Journal of Diabetes*. 2015; 39:335-343.
7. Sadashiv, M., Jen Lin, W., Suresh Pingale, S. Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015; 23:351-358.
8. Kamei, N., Morishita, M., Takayama, K. Importance of intermolecular interaction on the improvement of intestinal therapeutic peptide/protein absorption using cell-penetrating peptides. *J Control Release*. 2009; 136:179–186.
9. Chen, M. et al. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials*. 2011; 32:9826-9838.
10. Herrador, Z., Llanos, A. Eficacia de la insulina de administración oral/bucal en el tratamiento de la diabetes mellitus. *Atención primaria*. 2010; 42(6):316-321.
11. Singh, R., Lillard, J. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*. 2009; 86:215–223.
12. Suffredini, G., East, JE., Levy LM. New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology Am J Neuroradiol* In press. 2013.
13. Fonte, P., Araujo, F., Silva, C., et al. Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: revisited approaches. *Biotechnol Adv*. 2015; 33 (6, pt 3):1342–1354.

14. Erel, G., et al. Nanoencapsulated chitosan nanoparticles in emulsion-based oral delivery system: In vitro and in vivo evaluation of insulin loaded formulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016; 36:161-167.
15. He, Z., Santos, JL., Tian, H., et al. Scalable fabrication of size-controlled chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin. *Biomaterials*. 2017; 130:28 – 41.
16. Fabregas, A., et al. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Int.J. Pharm.* 2013; 446:199-204.
17. Chow, SF., Sun, CC., Chow AH. Assessment of the relative performance of a confined impinging jets mixer and a multi-inlet vortex mixer for curcumin nanoparticle production. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014; 88:462-71.
18. Sarmiento, B., et al. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007; 7:2833-41.
19. Mura, C., Náchér, A., Merino, V., et al. Design, characterization and in vitro evaluation of 5-aminosalicylic acid loaded *N*-succinyl-chitosan microparticles for colon specific delivery. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2012; 94:199–205.
20. Maity, S., Mukhopadhyay, P. et al. Alginate coated chitosan core-shell nanoparticles for efficient oral delivery of naringenin in diabetic animals—An *in vitro* and *in vivo* approach. *Carbohydrate Polymers*. 2017; 170:124-132.
21. Mukhopadhyay, P., et al. pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015; 72:640-648.
22. Araújo, F., et al. The impact of nanoparticles on the mucosal translocation and transport of GLP-1 across the intestinal epithelium. *Biomaterials*. 2014; 35:9199-207.
23. Zhang, X., et al. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012; 45:632-638.
24. Serda, R.E., et al. Multi-stage delivery nano-particle systems for therapeutic applications. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010; 1810: 317–329.
25. Wong, C., et al. Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108:2426–2431.
26. Wu, ZM., Zhou, L., Guo, XD., et al. HP55-coated capsule containing PLGA/RS nanoparticles for oral delivery of insulin. *Int J Pharm.* 2012; 425:1–8.

27. Sajeesh, S., et al. Thiol functionalized polymethacrylic acid-based hydrogel microparticles for oral insulin delivery. *Acta Biomater.* 2010; 6:3072–3080.
28. Chalasani, KB., et al. A novel vitamin B 12- nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin. *J Control Release.* 2007; 117:421-9.
29. Behera, BK., Mohapatra, R., Sahoo, SK. Novel Functionalized Polymers in Drug Delivery: A Brief Review. *Journal of Current Pharma Research.* 2014; 4:1201-1210.
30. Alibolandi, M., Alabdollah, F., Sadeghi, F. Dextran-*b*-poly (lactide-co-glycolide) polymersome for oral delivery of insulin: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Journal of Controlled Release.* 2016; 227:58-70.
31. Paques JP, van der Linden E, van Rijn CJM, Sagis LMC, Preparation Methods of Alginate Nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014; 209:163-71.
32. Abbaspour, M., et al. Effect of Anionic Polymers on Drug Loading and Release from Clindamycin Phosphate Solid Lipid Nanoparticles. *Trop J Pharm Res.* 2013; 12:447-82.
33. Sonaje, K., et al. Effects of Chitosan-Nanoparticle-Mediated Tight Junction Opening on the Oral Absorption of Endotoxins. *Biomaterials.* 2011; 32:8712-21.
34. Elzoghby, AO., Samy, WM., Elgindy, NA. Albumin-Based Nanoparticles as Potential Controlled Release Drug Delivery Systems, *J Controlled Release.* 2012; 157:168-82.
35. Lopes, M., et al. Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin. *Journal of Controlled Release.* 2016; 232:29-41.
36. Bodnár, M., et al. Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles. *Colloid Polym Sci.* 2009; 287:991–1000.
37. Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet Med.* 2008; 53(8):397–411.
38. Kogan, G., Soltes, L, Stern, R., Gemeiner, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotec. Lett.* 2007; 29(1):17–25.
39. Han, L., et al. Insulin-Loaded pH-Sensitive Hyaluronic Acid Nanoparticles Enhance Transcellular Delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2012; 13 (3):836-845.
40. Damgé, C., Maincent, P., Ubrich, N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J Control Release.* 2007; 117:163–170.
41. Damgé, C., Socha, M., Ubrich, N., Maincent, P. Poly(ϵ -caprolactone)/eudragit nanoparticles for oral delivery of aspart-insulin in the treatment of diabetes. *J Pharm Sci,* 2010; 99:879–889.