

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Aportes al desarrollo de un sistema  
nanoestructurado incorporando un  
extracto de frutos de *Physalis  
peruviana* con posible actividad  
antidiabética**

**Aura María Moreno Echeverri**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia

2020



# **Aportes al desarrollo de un sistema nanoestructurado incorporando un extracto de frutos de *Physalis peruviana* con posible actividad antidiabética**

**Aura María Moreno Echeverri**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magíster en Ciencias Farmacéuticas**

**Directora: Yolima Baena Aristizábal  
Q.F. MSc. PhD. Ciencias Farmacéuticas  
Profesora Titular**

Línea de Investigación:  
Diseño y desarrollo de productos fitofarmacéuticos  
Grupo de Investigación:  
Tecnología de Productos Naturales (TECPRONA)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia

2020







## **Agradecimientos**

A Minciencias que otorgó la financiación al proyecto, del que hace parte este trabajo de investigación (Contrato 187-2019).

A toda mi familia y a Félix por todo el apoyo que me han brindado en la distancia con las múltiples alegrías y sonrisas que hemos compartido, aun en los días y jornadas más largas del trabajo, porque gracias a ellos siempre sacaba fuerzas para poder continuar con todas mis metas.

A Lorena Arévalo, estudiante de pregrado, con quien compartí muchas horas de trabajo y sonrisas. Asimismo, a Aldemar Gordillo, Daniel Parra González, Juan José Carrascal, Alexander Robayo, Angelica Velandia, Jonathan Tapias, Cate Guzman, y Marcel Berrio por todos sus consejos experimentales, explicaciones y amistad.

A todos los integrantes del grupo de investigación por el tiempo compartido, amistad, consejos y demás, durante la elaboración de esta tesis y a los grupos de investigación Macromoléculas y Tecnología de Productos Naturales (TECPRONA) por la colaboración brindada, así como a Laura Martínez, Yeimy Johana Rodríguez, Angie Angarita y Sandra Echeverry.

A mi directora, la profesora Yolima Baena y a los profesores León Darío Pérez, Pilar Luengas, Aldrik Velders, Jaiver Rosas, Fredy Ramos, Marcela Aragón, Claudia Mora, Anton Bunschoten, Maritza Rojas, Jorge Ariel Martínez, Edelberto Silva Gomez y Bibiana Vallejo, por todo su apoyo en la elaboración y desarrollo de esta tesis; a ellos, quienes me apoyaron y quienes pusieron sus recursos en este proyecto, así como el acceso a equipos e implementos, pero sobre todo por su paciencia.

Al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional, y a personas como Jorge la verde, Ivonne Machado y Rigoberto Pedreros, quienes me brindaron su colaboración, consejos y experiencia.

Para finalizar, quiero agradecer a mis amigos que me brindaron su apoyo y alegría en la elaboración de esta tesis, Camilo y Manuel; asimismo, a quienes conocí en la maestría y ahora hacen parte de mis buenos amigos, Sandra y David Borda, y a quienes me brindaron su ayuda, como Oscar Cardozo.



## Resumen

Se prepararon nanopartículas poliméricas (NPs) a partir de un copolímero de mPEG-b-PCL de ~46 kDa, vacías y cargadas con un extracto etanólico estandarizado de frutos de *Physalis peruviana*, mediante una metodología modificada de doble emulsificación evaporación del solvente, utilizando como estabilizantes de la segunda emulsión PVA 2 %, mPEG-b-PCL de 8 kDa a diferentes concentraciones: 0.01, 0.03, 0.05, 0.1 %. Para la elaboración de las nanopartículas tanto vacías como con el extracto, se realizaron las siguientes etapas de investigación: la primera consistió en la obtención de materiales, así se llevó a cabo la síntesis del copolímero de mPEG-b-PCL~46 kDa por apertura de anillo, el cual fue caracterizado por espectroscopia Infrarroja (FT-IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Asimismo, se obtuvo el extracto etanólico estandarizado de frutos de *Physalis peruviana*, el cual fue caracterizado con su índice de refracción y sólidos totales; además se identificó una molécula trazadora de este por RMN, y se evaluó su actividad biológica *in vitro* mediante la evaluación del efecto sobre la actividad de la enzima alfa amilasa. Seguido de esto, ya con las materias primas obtenidas, se continuó con dos etapas más: en primer lugar, la elaboración de las NPs copoliméricas vacías variando el tipo de estabilizante de la segunda emulsión, realizando su caracterización de forma (TEM), tamaño, índice de polidispersidad y potencial  $\zeta$  (DLS); el segundo paso correspondió a la realización de las NPs cargadas con el extracto etanólico, estas fueron caracterizadas de la misma forma que las NPs vacías. Para conocer la influencia del agente estabilizante en la encapsulación del extracto de frutos de *Physalis peruviana*, se emplearon las pruebas de DSC e IR y se confirmó la carga del extracto dentro de las nanopartículas por RMN. Como resultado, se obtuvieron nanopartículas esféricas de tamaños comprendidos entre aproximadamente 150 nm a 250 nm. Un potencial  $\zeta$  entre aproximadamente -10 y -23 mV. El Pdl estuvo en un rango de 0.146 a 0.280, sugiriendo una distribución ligeramente polidispersa. Además, se compararon los resultados del extracto libre (no encapsulado) con el extracto etanólico una vez liberado de las NPs mediante un estudio de liberación por membrana de diálisis

de 3500 Da, al cual se le hizo seguimiento durante 72 h, evaluando su efecto en el porcentaje de inhibición de la alfa amilasa. Adicionalmente, el estudio de la liberación se complementó al evaluar el contenido de azúcares reductores en función del tiempo. De esa manera se demostró su posible actividad antidiabética.

**Palabras clave:** Nanopartículas poliméricas, *Physalis peruviana*, doble emulsificación modificada, evaporación de solvente

## Abstract

It was done polymeric nanoparticles (NPs) based on copolymer of mPEG-b-PCL of ~46 kDa, empty and loaded with and standard ethanolic extract made of the fruit *Physalis peruviana*, with a modified methodology by double solvent evaporation emulsification, using 2% PVA and 8 KDa mPEG-b-PCL as stabilizers of the second emulsion, at different concentrations: 0.01, 0.03, 0.05, 0.1%. For the elaboration of the nanoparticles both empty and with the extract, the following investigation stages were carried out: the first one It consisted of obtaining materials, thus the synthesis of the mPEG-b-PCL copolymer ~46 KDa was carried out by opening of ring, which it was characterized by Infrared spectroscopy (FT-IR), nuclear magnetic resonance imaging (NMR) and differential scanning calorimetry (DSC). Likewise, the standardized ethanolic extract of *Physalis peruviana* fruits was obtained, which it was characterized with its refractive index and total solids; In addition, a tracer molecule was identified by NMR and its biological activity was evaluated *in vitro* by evaluating the effect on the activity of the enzyme alpha amylase. Following this, with the raw materials obtained, two more stages were continued: first, the elaboration of the empty copolymeric NPs it was varying the type of stabilizer of the second emulsion, making its characterization of form (TEM), size, polydispersity index and potential  $\zeta$  (DLS); the second step corresponded to the realization of the NPs loaded with the ethanolic extract, these were characterized in the same way as the empty NPs. In order to know the influence of the stabilizing agent on the encapsulation of the *Physalis peruviana* fruit extract, the DSC and IR tests were used and the loading of the extract into the nanoparticles was confirmed by NMR. As a result, spherical nanoparticles of sizes between about 150 nm to 250 nm were obtained. A potential  $\zeta$  between approximately -10 and -23 mV. The Pdl was in the range of 0.146 to 0.280, suggesting a slightly polydisperse distribution. In addition, the results of the free extract (not encapsulated) were compared

with the ethanolic extract once released from the NPs by a release study with a 3500 Da dialysis membrane, which it was monitored for 72 hours, evaluating its effect on percent inhibition of alpha amylase. Additionally, the study of the release was complemented by evaluating the content of reducing sugars as a function of time. In that way its possible antidiabetic activity was demonstrated.

**Keywords:** Polymeric nanoparticles, *Physalis peruviana*, modified double emulsification, solvent evaporation

# Contenido

	Pág.
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>4</b>
Objetivo general .....	4
Objetivos específicos .....	4
<b>1. Aspectos teóricos</b> .....	<b>5</b>
1.1 Diabetes .....	5
1.2. <i>Physalis peruviana</i> .....	9
1.3. Sistemas nanoestructurados de interés farmacéutico .....	14
1.4. Nanopartículas poliméricas .....	14
1.4.1 <i>Metodología de elaboración de nanopartículas poliméricas</i> .....	16
1.5. Estado del arte .....	22
<b>2. Obtención de sistemas nanoestructurados a partir de mPEG-b-PCL ~46 KDa</b> .....	<b>31</b>
2.1. Introducción .....	31
2.2. Materiales y Métodos .....	35
2.2.1. <i>Reactivos y equipos</i> .....	35
2.2.1.1. Síntesis del copolímero mPEG-b-PCL ~46 KDa .....	35
2.2.1.2. Elaboración de nanopartículas (NPs) de mPEG-b-PCL ~46 KDa .....	35
2.2.2 <i>Metodología</i> .....	36
2.2.2.1. Síntesis del copolímero mPEG-b-PCL ~46 KDa .....	36
2.2.2.2. Preparación de un sistema nanoestructurado de mPEG-b-PCL ~46 KDa por doble emulsificación evaporación del solvente modificada (DESEm) .....	38
2.3. Resultados y discusión .....	41
2.3.1 <i>Síntesis del copolímero m-PEGL-b-PCL~46 KDa</i> .....	41

---

2.3.2. Sistemas nanoestructurados de mPEG-b-PCL ~46 KDa .....	47
2.4. Conclusiones .....	54
<b>3. Nanopartículas cargadas con extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> .....</b>	<b>55</b>
3.1. Introducción .....	55
3.2. Materiales y Métodos .....	57
3.2.1 Reactivos y equipos .....	57
3.2.1.1 Obtención del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> .....	57
3.2.1.2. Elaboración de las nanopartículas cargadas con extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> ...	57
3.2.1.3. Caracterización .....	58
3.2.1.4. Liberación de las NPs y ensayo de inhibición de la alfa amilasa .....	58
3.2.2. Metodología .....	59
3.2.2.1. Elaboración del extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> .....	59
3.2.2.2. Elaboración de sistemas nanoestructurados con el extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> .....	61
3.2.2.3. Caracterización de las NPs-Pp .....	64
3.2.2.4. Seguimiento del ácido cítrico del extracto etanólico de <i>Physalis peruviana</i> libre y cargado en las NP-Pp por resonancia magnética nuclear (RMN) .....	66
3.2.2.5. Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de inhibición de la alfa amilasa del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis Peruviana</i> y una vez liberado de las NPs-Pp, complementado con el seguimiento de los azúcares reductores. ....	66
3.3. Resultados y discusión .....	70
3.3.1. Extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> como sustancia activa de partida .....	70
3.3.2. Nanopartículas cargadas con extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> .....	71
3.3.3.1. Caracterización de las NPs-Pp .....	73
3.3.3.2 Seguimiento del ácido cítrico como molécula trazadora del extracto etanólico libre y cargado en las NPs-Pp .....	84
3.3.3.3. Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de inhibición de la alfa amilasa del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis Peruviana</i> y una vez liberado de las NPs-Pp, complementado con el seguimiento de los azúcares reductores. ....	92
3.4. Conclusiones .....	98
<b>Conclusiones generales .....</b>	<b>100</b>
<b>Recomendaciones .....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>102</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>123</b>

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Representación esquemática de sistemas nanoestructurados. ....	15
Figura 2-1. Estructura de los estabilizantes a evaluar mPEG-b-PCL 8 KDa y PVA 31 KDa. ....	38
Figura 2-2. Esquema del procesamiento de las muestras para caracterización y purificación .....	39
Figura 2-3. Síntesis del copolímero .....	41
Figura 2-4. Espectro FT-IR para el copolímero mPEG-b-PCL ~46 KDa. ....	42
Figura 2-5. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del copolímero sintetizado mPEG-b-PCL ~46 KDa .....	43
Figura 2-6. Termograma de mPEG-b-PCL~46 KDa .....	46
Figura 2-7. Esquema de la posible estructura de las NPs variando el tipo de estabilizante. ....	48
Figura 2-8. Esquema de la posible estructura ampliada de las NPs variando el tipo de estabilizante .....	49
Figura 2-9. Esquema de la posible estructura ampliada de las NPs variando el tipo de estabilizante .....	49
Figura 2-10. Resultados del tamaño de las nanopartículas vacías al variar el tipo y concentración del agente estabilizante. ....	50
Figura 2-11. Potencial Z de las nanopartículas vacías variando el tipo y concentración del estabilizante. ....	52
Figura 2-12. Imagen TEM de NPs seleccionadas. ....	53
Figura 3-1. Pasos generales para la elaboración del extracto etanólico a partir de los frutos de <i>Physalis peruviana</i> . ....	59
Figura 3-2. Representación esquemática de la metodología de obtención de los sistemas nanoestructurados que contienen el extracto etanólico de los frutos de <i>Physalis peruviana</i> . ....	62
Figura 3-3. Fotos del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> y de la nanoemulsión final. ....	63
Figura 3-4. Representación esquemática la metodología de purificación de las nanopartículas. ....	64

---

Figura 3-5. Esquema del montaje de liberación .....	68
Figura 3-6. Esquema de la posible estructura ampliada de las NPs variando el tipo de estabilizante cargadas con extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> . .....	72
Figura 3-7. Esquema de la posible estructura ampliada de las NPs variando el tipo de estabilizante cargadas con extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> .....	72
Figura 3-8. Foto de los sistemas de nanoestructurados en dispersión.....	73
Figura 3-9. Resultados del tamaño de las nanopartículas que contienen el extracto .....	74
Figura 3-10. Potencial Z de las nanopartículas cargadas con el extracto .....	76
Figura 3-11. Imagen TEM de nanopartículas seleccionadas que contienen el extracto.....	77
Figura 3-12. Espectro infrarrojo de las diferentes NPs-Pp,.....	79
Figura 3-13. Termogramas de las diferentes NPs-Pp.....	82
Figura 3-14. Espectro de resonancia magnética nuclear del extracto de frutos de <i>Physalis peruviana</i> . .....	84
Figura 3-15. Asignación de las señales de hidrogeno y carbono para el ácido cítrico. ....	85
.....	85
Figura 3-16. Espectro de resonancia magnética nuclear del ácido cítrico presente en el extracto etanólico de los frutos de <i>Physalis peruviana</i> . .....	86
Figura 3-17. Espectro de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup> C para el ácido cítrico presente en el extracto etanólico de los frutos de <i>Physalis peruviana</i> . .....	87
Figura 3-18. Espectro de <sup>1</sup> H - RMN, ampliación del espectro en el segmento característico del ácido cítrico	88
Figura 3-19. Espectro de resonancia magnética nuclear, correlación heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC-ETGP del ácido cítrico presente en el extracto etanólico de los frutos de <i>Physalis peruviana</i> . ....	90
Figura 3-20. Espectro de resonancia magnética nuclear-correlación heteronuclear .....	91
Figura 3-21. Concentración inhibitoria 50 del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> sobre la actividad enzimática de la alfa amilasa. ....	93
Figura 3-22. Evaluación de la liberación del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> de las diferentes NPs-Pp .....	95
Figura 3-23. Cantidad acumulada de azúcares reductores de las de NPs-Pp .....	96

---

Figura Anexo C-1. Figura Cambios de color del fruto de <i>Physalis peruviana</i> L. según el estado de Madurez. .....	108
Figura Anexo C-2. Etapas involucradas en el proceso de obtención del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> .....	109
Figura Anexo F-3. Prueba de Tukey para las NPs cargadas con <i>Physalis peruviana</i> para los resultados de potencial $\zeta$ .....	116
Figura Anexo H-1. Termograma por DSC del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i> .....	118
.....	118



## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Polímeros más utilizados en la elaboración de nanopartículas diseñadas como portadores de fármacos. ....	16
Tabla 1-2. Resumen de técnicas utilizadas en la caracterización de sistemas nanoestructurados .....	21
Tabla 1-3. Encapsulación de principalmente sustancias hidrosolubles, algunas sustancias de interés, naturales o con actividad antidiabética, ligeramente solubles (*) o insolubles en agua (**). ....	25
Tabla 2-1. Condiciones escogidas para la obtención de NPs preparadas por el método DESEm. ....	33
Tabla 3-1. Comparación de los datos (de la literatura y experimentales) de resonancia magnética nuclear de carbono <sup>13</sup> e hidrogeno <sup>1</sup> del ácido cítrico. ....	85
Tabla 3-2. Porcentajes de inhibición de la alfa amilasa en función de la concentración del extracto etanólico de frutos de <i>P. peruviana</i> . ....	92
Tabla 3-3. Valores de concentración de acarbosa y su correspondiente inhibición de alfa amilasa. ....	94
Tabla Anexo A-1. Resumen general de varias metodologías recopilando ventajas, desventajas, y principios activos a encapsular.....	103
Tabla Anexo D-1. Procedimiento para la determinación de inhibición de alfa amilasa .....	111

## Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
A	Absorbancia
ADA	Asociación Americana de la Diabetes ( <i>American Diabetes Association</i> )
CI50	Concentración inhibitoria 50
CMC	Concentración micelar crítica
DEE	Diseño estadístico experimental
DESE	Emulsión doble-evaporación del solvente ( <i>Double Emulsion-Solvent Evaporation Method modify</i> )
DESEm	Emulsión doble-evaporación del solvente modificado ( <i>Double Emulsion-Solvent Evaporation Method modify</i> )
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfoxido deuterado
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DSL	Dispersión dinámica de luz
FTIR-ATR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier en reflectancia total atenuada
GADA	Anticuerpos anti-descarboxilasa del ácido glutámico ( <i>Glutamic acid decarboxylase antibodies</i> )
GndCl	Cloruro de guanidinio
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia magnética nuclear protónica
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HSP	Parámetro de solubilidad de Hansen
ICH	<i>International conference on harmonization</i>
IMC	Índice de masa corporal
IR	Índice de refracción
ITG	Intolerancia a la glucosa
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PdI	Dispersión
pKa	Potencial de la constante de acidez
pNPG	p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido
<i>Pp</i>	<i>Physalis Peruviana</i>
RMN	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear
SD	<i>Standard Deviation</i> (Desviación Estándar)
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SLM	Sistemas de liberación modificada
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
Tg	Transición vítrea
TGA	Análisis termogravimétrico
Tm	Temperatura de fusión
Vmax	Velocidad Máxima
$\zeta$ -p	Potencial $\zeta$

# Introducción

La diabetes o *diabetes mellitus* (DM) representa un problema de salud pública a nivel mundial, con un incremento de incidencia y prevalencia constante. En el 2019, 463 millones de personas a nivel global padecieron de esta enfermedad, la cual está asociada a un conjunto de comorbilidades incapacitantes (Federation, 2019). Debido a que en los países en vía de desarrollo la mayor parte de la población no siempre tiene acceso a los medicamentos convencionales, el uso de plantas medicinales, como parte de la medicina tradicional, constituye la principal fuente de atención sanitaria, y a veces la única. De esa manera la importancia de las plantas medicinales y su uso se hace cada vez mayor (Organización Mundial de la Salud, 2013). En la actualidad, el empleo de extractos a partir de material vegetal con diferentes fines terapéuticos es de relevancia para la industria farmacéutica, la cual ha sufrido una disminución en el desarrollo de nuevos fármacos en los últimos años; esto sumado a la importancia que la Organización Mundial de la Salud (OMS) le ha dado al resurgimiento de los productos naturales, la convierte en un campo de investigación muy promisorio. De acuerdo con la OMS, más del 80 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria en salud, lo que en la mayoría de los casos implica el uso de extractos de plantas (estandarizados) o de principios activos obtenidos a partir de ellos (Baena Aristizábal, 2015; Calixto, 2000).

En el campo del tratamiento de la DM, las plantas medicinales pueden optimizar el metabolismo de la glucosa y mejorar la condición integral de los pacientes diabéticos, no solo por sus efectos hipoglucemiantes, sino también al mejorar el perfil lipídico y el estado antioxidante (Gamboa Ortiz, 2010). El extracto estandarizado de los frutos de *Physalis peruviana*, que ha sido estudiado desde hace varias décadas por diferentes investigadores del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y a nivel

internacional también, ha demostrado un efecto hipoglucemiante por un modo de acción correspondiente a la inhibición del alfa amilasa (Rey, 2013).

El empleo de un extracto etanólico estandarizado de los frutos de *Physalis peruviana* presenta ventajas al ser un sistema multicomponente, el cual tiene un efecto terapéutico posiblemente a causa de sinergismos que pueden presentar los diversos componentes, así como su interacción frente otras dianas moleculares (Baena Aristizábal, 2015; Rather, Bhat, & Qurishi, 2013). Adicionalmente, al estar estandarizado se garantiza una mejor caracterización analítica, permitiendo así que los requisitos de calidad, efectividad y seguridad, exigidos a cualquier medicamento, sean cumplidos de una manera eficaz (Bernal Rodríguez, 2016; Organización Mundial de la Salud, 2013).

La formulación de un extracto de esta naturaleza como producto fitoterapéutico, conlleva a diferentes dificultades de tipo tecnológico, relacionadas con las características físicas implícitas en la naturaleza de este material, como son problemas de inestabilidad en el producto (Bernal, 2016), baja solubilidad en agua, baja capacidad de permear las membranas, y, por ende, baja biodisponibilidad, inestabilidad en el tracto gastrointestinal y elevada velocidad de metabolización hacen difícil su óptimo aprovechamiento en el diseño de medicamentos (Baena Aristizábal, 2015). Por esto, es de gran importancia contribuir con estudios que incluyan extractos como este en sistemas de liberación modificada para mejorar muchas de las propiedades anteriormente mencionadas.

Dentro de los sistemas de liberación modificada, los sistemas nanoestructurados, como las nanopartículas, ocupan un lugar importante, ya que pueden mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, asimismo, tienen el potencial para proporcionar la entrega de fármacos dirigida y localizada (Date, Hanes & Ensign, 2016), protegen al fármaco de la rápida degradación o depuración (Wilczewska, Niemirowicz, Markiewicz & Car, 2012) y ayudan a aumentar su estabilidad (Soppimath, Aminabhavi, Kulkarni & Rudzinski, 2001). Debido a sus pequeños tamaños, las nanopartículas exhiben propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas (por ejemplo, un área reactiva mejorada, así como la capacidad de cruzar barreras celulares y tisulares) que las hacen un material favorable para aplicaciones biomédicas (Wilczewska et al., 2012). Estos sistemas son una posible solución a la inestabilidad del extracto a nivel fisiológico, ya que protegen a las sustancias activas de la posible degradación enzimática y del pH fisiológico.

---

La presente investigación se enfoca en la contribución al desarrollo de un sistema de liberación coloidal, tipo nanopartículas, con un copolímero de naturaleza anfífilica que encapsule el extracto etanólico de *Physalis peruviana*, como una posible forma de proteger y mejorar su biodisponibilidad, manteniendo su actividad hipoglucemiante. En la cual se plantea la siguiente posible hipótesis: ¿Es posible realizar sistemas nanoestructurados vacíos y cargado con el extracto haciendo uso de un copolímero en bloque de PEG-PCL sin necesidad de utilizar agentes estabilizantes convencionales al variar el peso molecular de este copolímero? Así bajo esta hipótesis se desarrolló la correspondiente investigación.

Este documento presenta la investigación realizada en tres capítulos principales. El primer capítulo da un fundamento teórico y estado del arte de la presente investigación, donde se explica la metodología para la elaboración de las nanopartículas y materiales escogidos. El segundo capítulo explica la síntesis y caracterización del copolímero empleado como material base para la elaboración de las NPs; asimismo, la elaboración de sistemas nanoparticulados vacíos, utilizando las técnicas de doble emulsificación evaporación del solvente modificado (DESEm) y su correspondiente caracterización. En el tercer capítulo se muestra la obtención y caracterización del extracto etanólico estandarizado de frutos de *Physalis peruviana*, y la obtención y caracterización de los sistemas nanoparticulados cargados con este, empleando el método mencionado.

De esta forma, la presente tesis aporta información útil para contribuir al desarrollo futuro de una posible formulación de un sistema de liberación como nanopartículas poliméricas, empleando un extracto etanólico estandarizado de frutos de *Physalis peruviana* con actividad hipoglucemiante, confiriéndole un posible uso en el tratamiento de la diabetes.

## Objetivos

### Objetivo general

Contribuir al desarrollo de una formulación de administración oral como sistema nanoestructurado empleando un extracto estandarizado de frutos de *Physalis peruviana* con posible actividad antidiabética, previamente establecida para el extracto.

### Objetivos específicos

Evaluar fisicoquímicamente el comportamiento de un sistema nanoestructurado, basado en copolímeros anfifílicos en bloque, en términos de potencial electrocinético, tamaño y forma de partícula.

Estudiar el sistema nanoestructurado cargado con un extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*, en cuanto a su comportamiento fisicoquímico, de liberación y de actividad de inhibición de alfa amilasa *in vitro*, con miras a establecer las bases para una futura formulación de este extracto.

# 1.Aspectos teóricos

## 1.1 Diabetes

La diabetes, es una enfermedad no transmisible (ENT) de carácter crónico, que corresponde a un desorden endocrino asociado a anormalidades involucradas en la acción y secreción de la insulina (IDF, 2019). Esta hormona producida en el páncreas, desempeña un rol fundamental en el metabolismo (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2017). Los problemas con la insulina pueden ser debidos a inconvenientes o ausencia en su producción (por problemas en el páncreas) o cuando el organismo no puede utilizarla eficazmente. La diabetes representa un problema de salud pública debido a su prevalencia, con 463 millones de personas a nivel global en el 2019, y lleva asociada un conjunto de comorbilidades incapacitantes (IDF, 2019).

La DM comprende una familia de alteraciones del metabolismo de carbohidratos que se caracterizan por hiperglucemia y el desarrollo a largo plazo de complicaciones microvasculares, macrovasculares y neuropáticas (Stewart, 2009). Los valores de glucosa plasmática en ayunas para esta patología normalmente son  $\geq 126$  mg/dL. Según la Asociación Americana de Diabetes (ADA) se clasifica fundamentalmente como DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), diabetes gestacional y tipos específicos de diabetes debido a otras causas. Entre los síntomas que presenta se destacan principalmente polidipsia, poliuria y polifagia, debidos a la alteración en la captación de glucosa por parte del organismo (American Diabetes Association, 2019).

La DM1, también conocida como diabetes juvenil (debido a su inicio temprano), es mediada por inmunidad. Es una enfermedad de origen multifactorial, donde el sistema inmune cumple un papel importante en su patogénesis. Debido a la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas (existen los islotes de Langerhans  $\alpha$  y  $\beta$ , que producen el glucagón y la insulina respectivamente (Pancreatic Cancer Action

Network, 2018)) la producción de insulina disminuye, y al perderse entre el 80-90% de estas células, conlleva a la presentación clínica de la enfermedad perceptible (Méndez-Sánchez & Chávez Tapia, 2010). Por este motivo, los individuos con DM1 son personas que necesitan administración de insulina exógena debido a su incapacidad para producirla (insulinodependientes). La DM1 tiene un amplio componente genético debido a la alta tasa de transmisión familiar: el pariente de un diabético tiene aproximadamente un 7 % de riesgo de desarrollar la enfermedad y, a su vez, el hijo de un diabético tiene un 6 % (Bach, 1994).

La DM2 generalmente es de ocurrencia y sintomatología clínica evidente más tardía, ya que, aparte de tener un componente genético importante que alteraría la secreción de insulina, se le suman factores medioambientales, como son la obesidad, el sedentarismo, el tabaquismo, el estrés, entre otros, que generan situaciones de resistencia a la insulina (Stewart, 2009; Zamora, Chávez, & Méndez, 2004). La resistencia a la insulina es atribuida a varios mecanismos, entre lo que se encuentran la desensibilización o pérdida en los receptores de insulina de las células, afectación de los transportadores de glucosa y la proliferación de tejido adiposo en el cuerpo; este último fenómeno hace que los adipocitos alteren su producción de sustancias entre las cuales se encuentran la resistina (Steppan et al., 2001) y adiponectina (Yamauchi et al., 2003), las cuales regulan directamente dicha resistencia.

La diabetes puede ser tratada con dieta (combinada con ejercicio si es posible) y tratamientos farmacológicos. Un control glucémico temprano tiene un claro efecto en la salud. Según la evidencia, disminuye las complicaciones microvasculares y macrovasculares de la diabetes a largo plazo (Ministerio de Salud y de Protección Social, 2015). Los principales tratamientos farmacológicos de la diabetes son: insulinas (de acción rápida, acción breve, acción intermedia y prolongada y mezclas de insulinas); fármacos secretagogos de insulina (sulfonilureas, meglitidina y derivados, análogos de incretinas, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (dpp-4)); fármacos que disminuyen la resistencia a la insulina (biguanidinas, tiazolidendionas o glitazonas); fármacos que disminuyen liberación de glucagón (análogos de amilina), y fármacos que inhiben la absorción de la glucosa (inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa). Estos últimos generan una disminución de la absorción de carbohidratos en el tubo digestivo, evitando así el incremento súbito de las



concentraciones plasmáticas postprandiales de glucosa, adicionalmente estos también pueden incrementar la liberación de la hormona glucorreguladora GLP-1.

Aun habiendo múltiples tratamientos farmacológicos, la falta de adherencia a los diferentes tratamientos dificulta la efectividad de estos. Esta falta de adherencia puede ser debida a concepciones culturales de la enfermedad, al desgaste o cansancio emocional que genera a los pacientes tratamientos con múltiples aplicaciones (ejemplo: el miedo a las múltiples punciones subcutáneas para la aplicación de la insulina), la insatisfacción de la calidad brindada de los servicios de salud, el costo económico de la enfermedad a largo plazo, el desencuentro entre los discursos del equipo profesional de salud y el saber popular (Hoyos, Arteaga & Muñoz, 2011). En los países en desarrollo, la mayor parte de la población no tiene acceso a los medicamentos industrializados, por lo que el uso de las plantas medicinales, como parte de la medicina tradicional, constituyen la principal fuente de atención sanitaria, y a veces la única. De esa manera la importancia de las plantas medicinales y su uso se hace cada vez mayor (Organización Mundial de la Salud, 2013). Por esto, el uso de productos herbales o extractos de plantas como parte de la terapia médica frente a la diabetes, desde la perspectiva de los pacientes, confiere mayor seguridad, eficacia y menos efectos negativos sobre la salud que los medicamentos de la medicina convencional.

A nivel internacional se han reportado algunas plantas o extractos para el tratamiento de la DM que se describen a continuación (Benzie & Wachtel-Galor, 2011):

- *Hoodia gordonii*, a la que se le atribuye su acción como hipoglucemiante por la presencia de compuestos glicósidos esteroidales tipo pregnano (MacLean & Luo, 2004); dicha actividad es secundaria a su efecto sobre la disminución del apetito y la pérdida de peso, lo cual disminuye la resistencia a la insulina y mejora el perfil glicémico.
- *Opuntia spp*, promueven la disminución del colesterol LDL y los triglicéridos, con el consecuente aumento de la sensibilidad a la insulina y disminución de los niveles de glucosa postprandial.

- *Cinnamomum cassia* y *Cinnamomum verum*, han evidenciado disminución del colesterol LDL y los triglicéridos con el consecuente aumento de la sensibilidad a la insulina y disminución de los niveles de glucosa postprandial.
- *Artemisia dracuncululus* L. disminuye la resistencia a la insulina y los niveles séricos postprandiales de glucosa.
- *Allium sativum*, disminuye la presión sanguínea y el colesterol LDL.
- Otras plantas, como la *Momordica charantia*, *Trigonella foenum-graecum*, *Aloe vera*, *Ginkgo biloba*, tienen una acción similar.

En Colombia, el *Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales* solo presenta tres especies que han sido aprobadas como hipoglucemiantes o antidiabéticas (Ministerio de la protección social, 2008), las cuales también fueron estudiadas a nivel internacional. Entre las que se encuentran están el marañón (*Anacardium occidentale* L.), la balsamina (*Momordica charantia* L.) (Leung, Birtwhistle, Kotecha, Hannah, & Cuthbertson, 2009) y el casco de vaca (*Bauhinia variegata* L.) (Benzie & Wachtel-Galor, 2011). Sin embargo, existen extractos a partir de otras especies que han demostrado esta actividad; tal es el caso del extracto de frutos de *Physalis peruviana*, que ha presentado actividad hipoglucemiante de acuerdo con trabajos previos realizados en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, al igual que por parte de otros investigadores en el ámbito internacional (Alberto & Rodríguez, 2012; Amuri et al., 2017; Baena Aristizábal, 2015; Bernal et al., 2018; Bernal, Aragón & Baena, 2016; Bernal, Ramos & Baena, 2019; Bernal, 2016; Bula & Cruz, 1993; Kasali, Kadima, Mpiana, Ngbolua & Tshibangu, 2013; Kwon, Vattem & Shetty, 2006; Maldonado, Torres, Martinez & Perz-Castorena, 2006; Mohammed & Ibraheem, 2015; Puente, Pinto-Muñoz, Castro & Cortés, 2011; Ramadan, 2011; Rey, 2013; Sharma, Bano, Dhaliwal & Sharma, 2015; Zhang et al., 2013), y es en el extracto estandarizado de este fruto en el que nos enfocaremos en la presente investigación.

## 1.2. *Physalis peruviana*

La *Physalis peruviana* es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas, conocidas popularmente como uchuva o uvilla, entre otros. Es una hierba de un metro de alto, que prefiere los rastrojos y lugares más o menos sombreados (Flórez, Fisher & Sora, 2000). Originaria de los Andes, en Suramérica es cultivada en Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. También se encuentran cultivos comerciales en Sudáfrica, Kenia y el suroeste de Asia. En Colombia la uchuva comenzó a ser un cultivo comercial desde la década de los ochenta, especialmente desde 1985, cuando tuvo acogida en los mercados internacionales (Alfonso, 2017b). Es uno de los principales productos de exportación del país, debido a que es un alimento exótico (Agronegocios, 2016), al cual se le han atribuido propiedades beneficiosas para la salud. Durante los últimos tres años se pasó de exportar 80 a 700 toneladas (A Estados Unidos), lo que les representó cerca de 3.5 millones de dólares a productores y exportadores. Actualmente el ICA tiene habilitados 23 predios productores de uchuva con un área de 57.1 hectáreas y cinco plantas empacadoras en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca (Bell, 2019). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Colombia es el tercer país latinoamericano con mayor número de hectáreas cultivadas en frutales (Alfonso, 2017a). Los principales cultivos de uchuva se encuentran en Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Nariño, zonas de altitud media (Alfonso, 2017b). Usualmente se utilizan los frutos como alimento y varias partes de la planta con fines medicinales.

A pesar de que la uchuva es una planta conocida desde hace siglos, hasta hace poco comenzó a ser explorado el potencial de esta como fuente de compuestos farmacológicamente activos (Ascher et al., 1980; Bula & Cruz, 1993; García & Súa, 1997; Ramadan, 2011). Los resultados de esas investigaciones despertaron gran interés, debido a sus propiedades nutricionales e industriales, siendo una candidata prometedora para el desarrollo de productos fitoterapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades. Es por esta razón que han aumentado los estudios e investigaciones en el desarrollo de formas farmacéuticas o sistemas de liberación, usando esta planta o parte de esta como base de compuestos farmacológicamente activos (Baena Aristizábal, Fessi, Elaissari, & Mora, 2016; Bazana et al., 2019; Bernal et al., 2019; Bernal, 2016; Echeverry, Valderrama, Costa, Ospina-Giraldo, & Aragón, 2018; Ramírez, 2013). La fruta se ha usado como una

buena fuente de provitamina A, minerales, vitamina C, complejo vitamínico B, alto contenido de fósforo y fibra y contiene 15 % de sólidos solubles (principalmente azúcares). Los frutos de *Physalis peruviana* han sido empleados bajo el criterio de la medicina tradicional en la prevención y tratamiento de pterigión, como expectorante, diurético y vermífugo; para el tratamiento de la albuminuria, tosferina, así como para fortalecer los dientes y evitar su caída; como un regulador intestinal por su alto contenido de fibra y concentración de pectina; se ha reportado, además, actividad antiinflamatoria, antihepatoma, antihepatotóxica, antidiabética y larvicida, (Ascher et al., 1980; Bula & Cruz, 1993; Gamboa Ortiz, 2010; García & Súa, 1997; Hassan, Serag, Qadir & Ramadan, 2017; Ramadan, 2011; Ramadan, Hassan, Elsanhoty & Sitohy, 2012; Ramírez, 2013; Zhang et al., 2013).

Los beneficios atribuidos a este fruto no solo se pueden adquirir por medio del consumo diario de los mismos, sino también a través de la elaboración de extractos. Para su obtención puede hacerse uso del etanol como solvente, debido a su baja toxicidad y eficiencia en la extracción, con la cual se pueden obtener la mayor parte de los constituyentes químicos de los frutos (Baena Aristizábal, 2015). En términos generales, se reporta en la literatura que el extracto de los frutos de *Physalis peruviana* es de color marrón, olor aromático, sabor amargo ácido y presenta partículas de aspecto semisólido graso en suspensión (Baena Aristizábal, 2015). A partir de investigaciones científicas se ha reportado para este extracto actividad hipoglucemiante (Baena Aristizábal, 2015; Bernal et al., 2019; Bula & Cruz, 1993; García & Súa, 1997; Ramírez, 2013; Rey, 2013). Enfocados en esta última actividad, por medio del fraccionamiento bioguiado de un extracto de diclorometano de los frutos de *Physalis peruviana* (Bernal et al., 2018), demostraron un efecto inhibitorio considerable sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa; adicionalmente, evidenciaron que la actividad *in vitro* de inhibición de  $\alpha$ -amilasa del extracto se debe a los compuestos que recubren el fruto, obtenidos principalmente a partir de los extractos en diclorometano del fruto intacto; asimismo, identificaron los marcadores terapéuticos responsables de esa actividad, logrando el aislamiento de seis ésteres de sacarosa, identificados como las Peruviosas A-F. Los resultados de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa demostraron que las Peruviosas D y B son las más activas (Bernal et al., 2018). Sin embargo, estos marcadores terapéuticos se encuentran en concentraciones muy bajas para poder ser cuantificados en el extracto (Bernal, 2016). Aun así, el trabajo realizado por Bernal et al.

constituye el primer estudio en el que se ha descrito el potencial de los ésteres de sacarosa como inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa (Bernal et al., 2018). Adicionalmente, (Baena Aristizábal, 2015) confirmó la actividad hipoglucemiante de los frutos de *Physalis peruviana* por medio de un ensayo *in vivo*, realizando la administración por vía oral del extracto a ratones. Este estudio no mostró efectos de toxicidad aparente por administración repetida a los mismos. De esa manera, el extracto de frutos de *Physalis peruviana* es de gran interés como posible coadyuvante en el tratamiento de la diabetes.

En cuanto a pruebas fitoquímicas que se le han realizado a esta especie, en las diferentes partes de la planta, además de los compuestos mencionados, hay presencia de alcaloides, flavonoides, ésteres, algunos glicósidos aislados como precursores del aroma (Bernal, 2016) y también están los carotenoides que pueden estar relacionados con la prevención de varias enfermedades degenerativas (Ramadan, 2011). Dentro de los compuestos más investigados de *Physalis peruviana* están los witanólidos, que exhibieron un amplio espectro de propiedades biológicas y actividades farmacológicas significativas, incluyendo repelentes de insectos, hepatoprotectores, inmunomoduladores, antibacterianos, antiinflamatorios, antitumorales, actividad citotóxica y protección contra la hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub> (Ramadan, 2011), los cuales son probablemente producidos por el fruto para defenderse de los parásitos que lo atacan.

Basados en investigaciones anteriores, uno de los modos de acción de los frutos de *Physalis peruviana* al que se le atribuye su actividad hipoglucemiante y antidiabética es la inhibición de las carbohidrasas intestinales (Bula & Cruz, 1993; Rey, 2013). Las carbohidrasas son enzimas digestivas que presentan especificidad de sustrato, son sensibles a la temperatura, pH y ciertos iones; se pueden clasificar en: poliasas (alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) amilasas,  $\alpha$ -amiloglucosidasa, enzima Q, celulasas, pectinasas, entre otras) y glucosidasas ( $\alpha$  y  $\beta$  glucosidas, maltasa, invertasa, lactasa,  $\alpha$ -galacturonasa, entre otras), las cuales catalizan las reacciones de polisacáridos, además, disocian disacáridos y glicosidados (Rey, 2013). Soportados en las investigaciones ya realizadas del modo de acción de la *Physalis peruviana*, se hará un enfoque específicamente en las  $\alpha$ -glucosidasas y  $\alpha$ -amilasas, las cuales son enzimas que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos complejos, tales como almidón y glucógeno. Por su parte, la  $\alpha$ -amilasa (1.4- $\alpha$ -D-glucano-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) es una enzima que cataliza la hidrólisis de

los enlaces  $\alpha$ -1.4-glucano en almidón, maltodextrinas y maltooligosacáridos. El término alfa se refiere a la configuración anomérica inicial del grupo de azúcar libre liberado (Tundis, Loizzo, & Menichini, 2010). Por otro lado, la  $\alpha$ -glucosidasa (EC 3.2.1.20) es una enzima que cataliza la reacción hidrolítica para liberar  $\alpha$ -glucosa del extremo no reductor del sustrato (Tundis et al., 2010). En conclusión, ambas enzimas catalizan la escisión de residuos glucósidos individuales de diferentes glicoconjugados, incluyendo polímeros alfa o beta (enlaces de glucosa). Están presentes en animales, plantas, bacterias y hongos (Tundis et al., 2010).

En los humanos son las enzimas claves de la digestión de carbohidratos, que involucra varias etapas. Inicialmente, la digestión parcial de la amilasa salival da como resultado la degradación del sustrato polimérico en oligómeros más cortos. Una vez que este material parcialmente digerido llega al intestino, se hidroliza extensamente en oligosacáridos más pequeños por la isoenzima de  $\alpha$ -amilasa, sintetizada en el páncreas, y se excreta en el lumen. La mezcla resultante de oligosacáridos pasa a través de la capa mucosa de la membrana del borde en cepillo, donde  $\alpha$ -glucosidasas adicionales la degradan a glucosa, que luego ingresa a la corriente sanguínea por medio de un sistema de transporte específico (Tundis et al., 2010).

La  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa participan en la digestión de la glucosa, por lo que son consideradas enzimas clave en el control de la hiperglicemia postprandial. Por eso se cree que la inhibición de estas enzimas puede controlar eficazmente la elevación del nivel de glucosa postprandial en sangre (Ramírez, Rodríguez, Hernández, Chel & Aguilar, 2016). Por lo tanto, una estrategia atractiva para el manejo de la hiperglucemia postprandial es inhibir la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa (Krentz & Bailey, 2005). Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa reducen la hiperglicemia postprandial retrasando la absorción de carbohidratos en el intestino delgado (Bischoff, 1994; Holt et al., 1996). De ahí que las sustancias activas que inhiben estas enzimas pueden ser usadas en tratamientos para la diabetes. Debido a su mecanismo de acción competitivo, los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa deben ser ingeridos antes de las comidas (Bischoff, 1994; Holt et al., 1996). Sin embargo, uno de los inconvenientes de los fármacos inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa son los efectos adversos normalmente producidos (flatulencias, malestar estomacal y diarrea). Algunos autores reportan que estos efectos adversos pueden disminuir cuando hay una

menor inhibición de alguna de las carbohidrasas intestinales en comparación con fármacos modelos (Silva Pinto et al., 2009), se considera que podría minimizar o no presentar estos efectos adversos, como lo reportado por (Kwon et al., 2006), quienes afirman que es posible que los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa procedentes de plantas puedan tener un menor efecto inhibitor contra la actividad de  $\alpha$ -amilasa y una actividad de inhibición más fuerte contra la  $\alpha$ -glucosidasa, por lo cual son menos nocivos y perjudiciales para el organismo, disminuyendo los efectos adversos. Por esta razón, los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa procedentes de fuentes naturales son clave en el tratamiento de la hiperglucemia.

Considerando la importancia de disponer de medicamentos para el tratamiento de la diabetes que puedan ser derivados de extractos de plantas, es importante que estos productos fitoterapéuticos puedan ejercer su acción y los pacientes puedan adherirse a la terapia. Por esta razón, una de las vías de administración deseables es la vía oral. Sin embargo, pueden presentarse inconvenientes relacionados con mayor posibilidad de interacciones químicas y problemas de estabilidad de la sustancia activa. Es por eso que se deben tener en cuenta las consideraciones de la administración de sustancias por esta vía dependiendo de donde se desea liberar la sustancia activa, el sitio de acción y las características fisicoquímicas del extracto y sus excipientes, así como el efecto del pH, la acción enzimática en los fluidos intestinales y de la microflora bacteriana, además del metabolismo intestinal, el metabolismo hepático, porque podrían desencadenar la degradación de las sustancias activas y, por lo tanto, causar la pérdida de su actividad (González, Cabrera, & Bermejo, 2015). Pese a las dificultades asociadas a la vía oral, se escogió esta como ruta de administración para el extracto estandarizado de los frutos de *Physalis peruviana*, considerando que su acción se va a dar a nivel intestinal, siendo necesario protegerlo de posibles inestabilizaciones químicas que conlleven a la pérdida de su actividad. Por lo anterior se hace necesario desarrollar un sistema de liberación modificada que permita la protección del extracto para mejorar la biodisponibilidad, generando una actividad farmacológica más efectiva y duradera, y así evitando la degradación química por el ambiente ácido a nivel gástrico. De esa manera, los sistemas nanoestructurados son elegidos para dar cumplimiento a la protección del extracto. A continuación, describe el sistema nanoestructurado elegido.

### 1.3. Sistemas nanoestructurados de interés farmacéutico

Consisten en sistemas nanométricos que contienen una sustancia activa (fármacos, moléculas, fragmentos de moléculas, extractos, compuestos, entre otros) incluida en un vehículo que la transporta. Los sistemas nanoestructurados poseen ventajas, ya que son similares en tamaño a muchas proteínas, lo que constituye una de las razones por las que pueden interaccionar en el interior de las células (Vila Jato, 2006), lo que les facilita atravesar las diferentes barreras biológicas del organismo. Adicionalmente, se ha observado que los nanovehículos con un tamaño inferior a 300 nm administrados por vía oral exhiben la capacidad de superar rápidamente el aclaramiento mucinoso gastrointestinal (Cagel et al., 2017).

Generalmente se pueden encontrar dentro de estos sistemas del orden coloidal a los liposomas, los dendrímeros, las micelas poliméricas y nanopartículas (Vila Jato, 2006). De estos sistemas las nanopartículas son la elección puesto que permiten la incorporación de sustancias activas hidrofílicas y lipofílicas (en este caso el extracto etanólico de *Physalis peruviana*) y también son de interés por el polímero anfifílico en bloque elegido para el desarrollo de esta investigación (aspecto que se profundizará más adelante).

### 1.4. Nanopartículas poliméricas

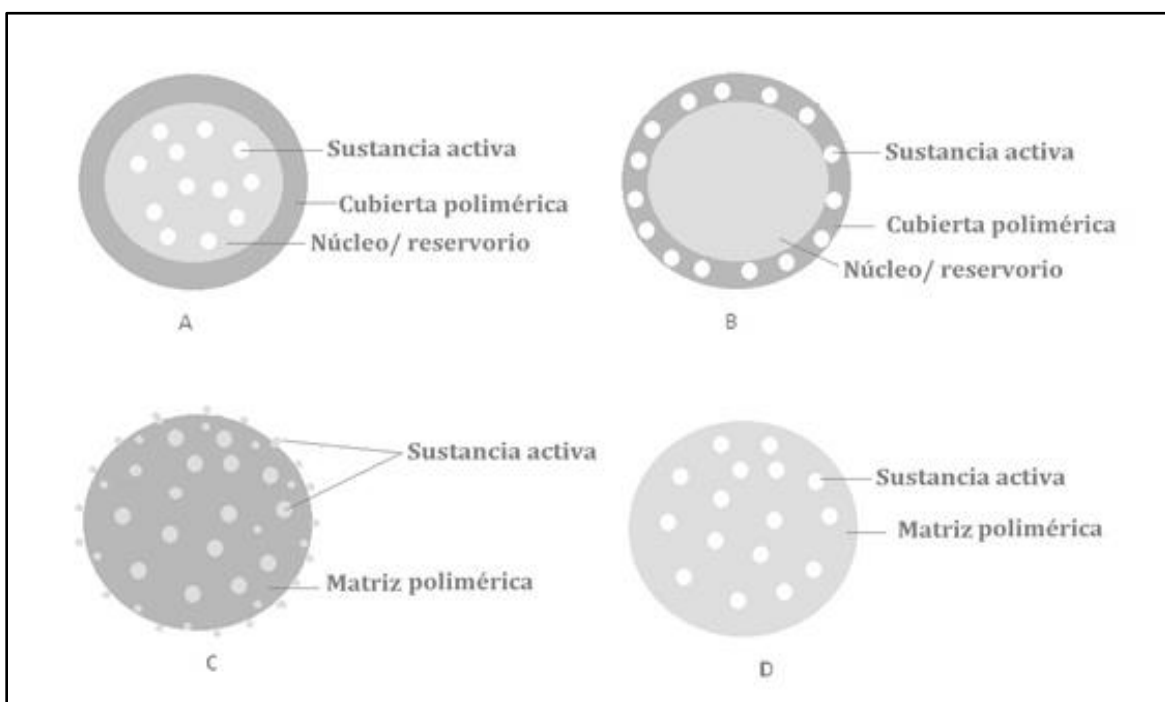
Son definidas de forma general como sistemas coloidales, teniendo su tamaño como una de sus características fundamentales. En el campo farmacéutico se considera que son partículas de tamaño menor a 500 nm; sin embargo, se puede decir que tienen un límite de tamaño superior de ~ 1000 nm, aunque el rango generalmente obtenido es de 100 a 500 nm (Baena Aristizábal, 2015; Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010).

Se pueden clasificar (como se muestra en la Figura 1-1) en nanoesferas, donde el principio activo está disperso dentro de la matriz polimérica, y en nanocápsulas, donde el principio activo es confinado en un reservorio protegido por una pared polimérica (Baena Aristizábal, 2015). Dependiendo del método de preparación y la composición de la fase orgánica, pueden obtenerse nanocápsulas o nanoesferas (Crucho & Barros, 2017). La naturaleza de las sustancias (compuestos, fármacos, extractos, aceites, entre otros) que pueden ser encapsulados dependerá del tipo de emulsión inicial. Por lo general, las moléculas



lipofílicas son encapsuladas en nanopartículas preparadas por medio de una emulsión simple, de tipo aceite en agua (O/W). De esta manera la sustancia activa, fármaco, estará ubicada en la fase orgánica (O); por otro lado, si se quieren encapsular moléculas hidrofílicas, como péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, estos estarán ubicados en la fase acuosa (W1) (Vauthier & Bouchemal, 2009). Algunos métodos de preparación de las nanopartículas incluyen dos pasos principales: la preparación de un sistema emulsificado, y la formación de las nanopartículas (Vauthier & Bouchemal, 2009).

**Figura 1-1.** Representación esquemática de sistemas nanoestructurados.



**A)** sustancia activa dispersa en el núcleo de las nanocápsulas; **B)** sustancia activa adsorbida en la pared o cubierta polimérica de las nanocápsulas; **C)** sustancia activa retenida en la superficie de la matriz polimérica; **D)** sustancia activa dispersa en la matriz polimérica. Fuente: Elaboración propia.

Entre las ventajas de las nanopartículas se destaca que pueden mejorar la biodisponibilidad oral de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos; tienen el potencial para proporcionar la entrega de fármacos dirigida o localizada (Date. et al., 2016); protegen al fármaco de la rápida degradación o depuración (Wilczewska et al., 2012); además, ayudan a aumentar su estabilidad (Soppimath et al., 2001) debido a sus pequeños tamaños. Las nanopartículas exhiben propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas (por ejemplo, un área reactiva mejorada, así como la capacidad de cruzar barreras celulares y tisulares que

las hacen un material favorable para aplicaciones biomédicas (Wilczewska et al., 2012)). Estos sistemas son una posible solución a la inestabilidad de los extractos a nivel fisiológico.

### 1.4.1 Metodología de elaboración de nanopartículas poliméricas

La elaboración de las nanopartículas poliméricas puede hacerse por medio de polímeros (sintéticos, semisintéticos, naturales, copolímeros) usualmente acompañada del uso de estabilizantes. Algunos de los polímeros más usados para la elaboración de nanopartículas se presentan en la Tabla 1-1. Entre ellos se destacan los copolímeros PEG-PCL, que son polimerizados con polietilenglicol (PEG) para disminuir el reconocimiento de nanopartículas por el sistema de fagocitos mononucleares (Nogueira de Assis, Mosqueira, Vilela, Andrade, & Cardoso, 2008), son biodegradables y de naturaleza anfifílica, compuestos de segmentos hidrófilos (PEG) y segmentos hidrofóbicos (policaprolactona (PCL), el ácido poliláctico (PLA), y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), etc.) (Vila Jato, 2006).

**Tabla 1-1.** Polímeros más utilizados en la elaboración de nanopartículas diseñadas como portadores de fármacos.

Material	Nombre completo	Abreviación
<b>Homopolímeros sintéticos</b>	Poli (lactida) Poli (lactida-co-glicolido) Poli (épsilon-caprolactona) Poli (isobutilcianoacrilato) Poli (isohexilcianoacrilato) Poli (n-butilcianoacrilato) Poli (acrilato) y poli (metacrilato)	PLA PLGA PCL PICBA PIHCA PBCA Eudragit
<b>Polímeros naturales</b>	Quitosano Alginato Gelatina Albúmina	
<b>Copolímeros</b>	Poli (lactida) -poli (etilenglicol) Ácido poli (láctido-co-glicólico) -poli (etilenglicol) Poli (ε-caprolactona) -poli (etilenglicol) Poli (hexadecilcianoacrilato-co-poli cianoacrilato) (etilenglicol)	PLA-PEG PLGA-PEG PCL-PEG Poli (HDCA-PEGCA)
<b>Estabilizadores coloidales</b>	Dextranos Poloxamer F68 Alcohol de polivinilo Polisorbato 20 o polisorbato 80	Pluronic PVA Tween

**Nota:** Fuente (Vauthier & Bouchemal, 2009).

El metoxi-polietilenglicol-b-poli-( $\epsilon$ -caprolactona) (mPEG-b-PCL) es un copolímero usado en la elaboración de sistemas nanoestructurados puesto que posee una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad (Grossen, Witzigmann, Sieber & Huwyler, 2017). Está compuesto por dos segmentos, uno hidrofílico (PEG) y uno hidrofóbico (PCL). Por un lado, el bloque de PEG se conoce por reducir inmunogenicidad y toxicidad, prolongar la concentración en sangre y alterar la biodistribución de moléculas. Por otro lado, el segmento de PCL es biodegradable, semicristalino y posee un tiempo de vida media largo (Grossen et al., 2017; Tomar, Jain, & Dixit, 2013). El PEG-PCL permite la encapsulación de sustancias hidrofílicas (proteínas como ovoalbúmina y BSA, fragmentos como NAPVSIPQ, o análogos como acetato de goserelina (Fievez et al., 2009; Gao et al., 2013; Grossen et al., 2017; Liu et al., 2013; Lu, Bei, & Wang, 1999; Tomar et al., 2013)) y lipofílicas (paclitaxel, doxorubicina (Grossen et al., 2017)). Además, el PEG-PCL puede ser utilizado en diferentes aplicaciones y formas farmacéuticas, como ligando, o en estrategias de conjugación de ligandos para la preparación de portadores de fármacos dirigidos; también se puede utilizar en la elaboración de micropartículas, vesículas poliméricas y nanopartículas; estas últimas, por una metodología de doble emulsificación- evaporación del solvente que se describe más adelante.

Aunque en nanotoxicología, cada nueva formulación de NP debe analizarse individualmente considerando factores como el tamaño de partícula, la geometría, la morfología, la relación superficie / volumen, para detectar efectos tóxicos (Grossen et al., 2017). Es importante destacar y usar la información ya existente como base de partida sobre estos copolímeros, en primer lugar, la síntesis de estos ha sido aprobada por autoridades sanitarias como la Food and Drug Administration (FDA). Además, existen reportes de NPs de PEG-PCL de 20 nm a 200 nm con potencial zeta negativo, donde no se detectaron efectos tóxicos menores en la viabilidad celular hasta concentraciones de 1.5 mg / mL (Grossen et al., 2017). Por otro lado, hay estudios sobre la toxicidad *in vivo* de micelas de PEG-PCL donde no se encuentra ningún signo de toxicidad aguda suministrando por vía intravenosa a ratones y ratas dosis únicas altas de hasta 2.4 g/kg (Grossen et al., 2017). Asimismo, hay reportes de la toxicidad subcrónica para las micelas de PEG-b-PCL donde no se observa inflamación aguda ni efectos tóxicos en el hígado, los riñones o el parénquima cerebral de ratas y ratones a los que se les administro 100 mg /

kg durante una semana por vía intravenosa (Grossen et al., 2017). Además se han realizado estudios de citotoxicidad de micelas poliméricas vacías en fibroblastos de ratón (L929) utilizando el ensayo colorimétrico MTT para determinar la viabilidad celular, en el cual estas micelas no presentaron una toxicidad apreciable contra los fibroblastos (Villamil, Parra & Pérez, 2019). Es por eso que las NPs de PEG-PCL son candidatos prometedores como herramientas para el suministro de fármacos caracterizadas por una alta biocompatibilidad, biodegradabilidad (Grossen et al., 2017 ;Villamil, Parra & Pérez, 2019).

Las nanopartículas se pueden preparar mediante dos métodos generales: polimerización y polímeros preformados (Crucho & Barros, 2017). La elección de un método específico generalmente está determinada por el tipo de polímero, las propiedades fisicoquímicas del fármaco y las características finales deseadas de las nanopartículas poliméricas (Crucho & Barros, 2017). Dependiendo del método escogido, el tamaño de las partículas podrá ser influenciado por factores relacionados con la formulación (naturaleza y concentración de los materiales de partida) y por las condiciones de operación (tiempos, velocidades y tipo de agitación, entre otros). La eficiencia de encapsulación por su parte puede ser afectada por los materiales de partida y por la técnica de fabricación empleada (Baena Aristizábal, 2015).

En esta tesis se trabajará una metodología escogida a partir de polímeros preformados; aunque existen varias metodologías para la obtención de nanopartículas, dependiendo de la sustancia que se desee encapsular (ver Anexo A), se eligió la doble emulsificación (de tipo emulsión agua-aceite-agua (W/O/W)) evaporación del solvente modificado (DESEm). Este término será utilizado por facilidad, ya que dentro del método escogido hay procesos a nivel nanoscópico que podrían estar ocurriendo, por lo cual, se podrían generar sistemas múltiples con más de tres fases o sistemas sencillos como emulsiones simples a causa de los componentes del extracto y a los materiales escogidos. Solo a manera de ejemplo se podrían tener los siguientes sistemas:

- **Sistema 1:** suspensión del extracto (Sólido-Líquido) en fase acuosa (Wo) (S-L/Wo) (A).
- **Sistemas 2:** emulsión de A en una fase orgánica con el copolímero (O1), la cual correspondería en detalle a (S-L/Wo/ O1) (B).
- **Sistema 3.1 para PVA al 2% (P2):** emulsión de B en la fase acuosa con PVA 2 % en detalle (S-L/Wo/ O1/P2).
- **Sistema 3.2 para mPEG-b-PCL de 8 KDa (M2):** ya que este copolímero podría estar libre en solución o en forma de micelas poliméricas (M), las cuales, a su vez, están dispersas en una fase acuosa (M/L2) (M2), por lo cual, en ese caso al realizar la emulsión de B en (M2), (B/M2) en detalle sería (S-L/Wo/ O1/M/L2).

Con base en lo anterior y teniendo en cuenta que la tesis se basa en la obtención de sistemas nanoestructurados mediante la metodología propuesta, no se llevó a cabo el estudio de dobles emulsiones, emulsiones simples, suspensiones obtenidas o no. Durante el proceso de elaboración de las nanopartículas, se decidió manejar la siguiente terminología:

- Fase acuosa 1 (**W1**): hace referencia al sistema 1.
- Fase orgánica (**O**): hace referencia al sistema 2.
- Fase acuosa 2 (**W2**): hace referencia a alguno de los dos sistemas, al sistema 3.1 al utilizar como estabilizante PVA y al sistema 3.2 al usar como estabilizante el mPEG-b-PCL de 8 KDa.

Además de lo anterior, estos sistemas son dinámicos, por lo cual se podrían ver como sistemas simples (emulsión de fase orgánica/ en una fase acuosa, que finalmente sería una dispersión de nanopartículas en fase acuosa). De esta manera DESEm será escogida como metodología para la obtención de las nanopartículas.

La doble emulsificación-evaporación del solvente se fundamenta en la elaboración de emulsiones dobles; estas son sistemas heterodispersos complejos llamados "emulsiones de emulsiones", que se pueden clasificar en dos tipos principales: emulsión agua-aceite-agua (W/O/W) y emulsión aceite-agua-aceite (O/W/O). En este caso se explicará de manera general solamente el tipo W/O/W, en el cual se utilizan tres fases que

corresponden a una fase acuosa 1 (W1), que contiene el compuesto hidrofílico a encapsular; una fase orgánica (O), correspondiente a solución polimérica en un en dicho solvente, y una fase acuosa 2 (W2), que consiste en una solución acuosa del agente estabilizante.

El paso inicial de esta metodología consiste en la formación de una emulsión de tipo W1/O. De esta manera, W1 es mezclada con O por medio de un equipo de dispersión tipo Ultra-Turrax®. El segundo paso de esta metodología es la formación de la segunda emulsión de tipo W1/O/W2, que se forma por la adición de la emulsión 1 (W1/O) a la fase acuosa 2 (W2) y mezclada por medio del mismo equipo mencionado. Una vez se logra la doble emulsión, esta se diluye en un gran volumen de agua, en donde ocurre la formación instantánea de las partículas. Posteriormente se remueve el solvente orgánico y parte del agua (por evaporación con agitación moderada, rotaevaporación o por ultrafiltración) (Garti, 1997; Khoee & Yaghoobian, 2008; Pisani et al., 2008). En este método los surfactantes desempeñan un doble papel en las emulsiones formadas; por un lado, actúan como formadores de películas y barrera para la liberación de fármacos en la interfaz interna, por otro lado, actúan como estabilizadores estéricos en la interfaz externa. La eficacia de encapsulación del fármaco y el tamaño medio de partícula se ven afectados al cambiar el tipo y la concentración tanto de la emulsión W/O como del agente estabilizante (Garti & Bisperink, 1998; Khoee & Yaghoobian, 2008; Pisani et al., 2008).

Después de la obtención de las nanopartículas sigue la purificación (puede ser realizada por lavado con agua, filtración a través de poros de 0.4 micrómetros, filtración en gel o diafiltración) (Al haushey, Bolzinger, Bordes, Gauvrit, & Briançon, 2007; Shuai, Ai, Nasongkla, Kim, & Gao, 2004; Vauthier & Bouchemal, 2009), la recuperación (ultra centrifugación o centrifugación) (Bagheri, Madadlou, Yarmand & Mousavi, 2014; Martínez, Andrade, Durán & Cavalitto, 2017) y su estabilización (spray-dry o liofilización) (Mora et al., 2010; Shuai et al., 2004). Sin embargo, estos últimos procesos pueden causar daño a las nanopartículas, por lo cual algunos autores usan crioprotectores durante la congelación y los lioprotectores durante el secado para minimizar los daños (Abu Hassan, Sahudin, Hussain & Hussain, 2018; Crucho & Barros, 2017; Mardiyanto, 2013; Noor, Shah, Gani, Gani & Masoodi, 2018).

Una vez se tiene el sistema nanoestructurado, que incluye la sustancia activa bajo las condiciones deseadas, se podrán evaluar sus propiedades, lo que incluye el establecimiento del mecanismo de liberación *in vitro* de la sustancia activa desde estos sistemas.

Es fundamental para cualquier avance significativo en aplicaciones basadas en nanomateriales su extensa caracterización; siendo esta un prerrequisito importante para el desarrollo preclínico. Actualmente no existen metodologías estandarizadas ni protocolos establecidos por entes reguladores para su caracterización (Crucho & Barros, 2017; Lin, Lin, Wang & Sridhar, 2014). Estos sistemas se caracterizan habitualmente por la distribución de tamaños, la morfología, las propiedades de superficie, la estabilidad, las interacciones fármaco-polímero, la eficiencia de encapsulación y la liberación. Las diversas técnicas involucradas en la caracterización fisicoquímica de los sistemas nanoestructurados se resumen en la Tabla 1-2 (Crucho & Barros, 2017; Lin et al., 2014).

**Tabla 1-2.** Resumen de técnicas utilizadas en la caracterización de sistemas nanoestructurados

Técnicas	Características fisicoquímicas que analiza
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Estado fisicoquímico y posibles interacciones del fármaco y el polímero
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Contenido de fármaco, liberación de fármaco <i>in vitro</i>
Dispersión de luz dinámica (DLS)	Distribución de tamaño hidrodinámico
Espectrometría de masas (MS)	Estructura de la composición del peso molecular Propiedades de la superficie (ión secundario MS)
Espectroscopía de fluorescencia	Determinación de concentración crítica de asociación (CAC) Contenido de fármaco, liberación de fármaco <i>in vitro</i> .
Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)	Composición elemental y química en la superficie del sistema.
Espectroscopía infrarroja (IR)	Estructura y conformación de bioconjugados. Análisis de grupos funcionales.
Microscopía de efecto túnel (STM)	Formas, tamaño y distribución de tamaños. Agregación de formas.
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	Tamaño y distribución de tamaños. Propiedades de superficie de agregado y de estructura de forma (AFM modificado).

Tabla 1-2. (Continuación)

Técnicas	Características fisicoquímicas que analiza
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Tamaño y distribución de tamaños Agregación de formas.
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	Tamaño y distribución de tamaños. Forma y heterogeneidad Agregación
Microscopía óptica de barrido de campo cercano (NSOM)	Tamaño y forma de los nanomateriales.
Potencial $\zeta$	Estabilidad en referencia a la carga superficial.
Resonancia magnética nuclear (RMN)	Estructura. Composición. Pureza. Cambio conformacional.

**Nota:** Adaptada de (Crucho & Barros, 2017; Lin et al., 2014).

El mecanismo de liberación, que se establece a partir de algunas de las caracterizaciones previas, depende de una gran variedad de factores, como: la concentración y las características fisicoquímicas de la sustancia activa; la naturaleza, degradabilidad, peso molecular y concentración del polímero; la microestructura sólida del polímero cuando se vuelve a precipitar, la velocidad de biodegradación de este, el tamaño de las partículas coloidales. Las condiciones de la prueba de liberación *in vitro*, las condiciones del método de preparación determinarán el mecanismo de liberación que se pueda presentar y, asimismo, los fenómenos presentes en estos (Mora-Huertas et al., 2010; Vauthier & Bouchemal, 2009). Muchos factores como la composición, los parámetros utilizados en el método de preparación y las condiciones de almacenamiento pueden afectar la estabilidad de los sistemas nanoestructurados (Mora-Huertas et al., 2010; Vauthier & Bouchemal, 2009).

## 1.5. Estado del arte

Los estudios alrededor de *Physalis peruviana* en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia se han realizado desde hace casi 30 años, desde la evaluación de la actividad hipoglucemiante de extractos etanólicos y acuosos de la planta (Bula & Cruz, 1993); de la fracción clorofórmica de los frutos frescos, encontrándose un efecto sinérgico con el de la insulina exógena (García & Súa, 1997); el desarrollo de una



metodología para la obtención del extracto estandarizado, su caracterización y adecuación tecnológica (Alberto & Rodríguez, 2012; Forero, 2008); la influencia del estado de maduración del fruto sobre la composición y las características de calidad del extracto etanólico, lo que ha servido de base para establecer las pruebas de calidad para el fruto fresco y para el material vegetal seco (Alvarez & Gómez, 2009); el aislamiento y la purificación de glicoalcaloides a partir de los frutos (Oviedo, 2009); el estudio de la influencia de las variables del proceso de extracción etanólica sobre el contenido de witanólidos y glicoalcaloides (Melo & Urrea, 2009); el desarrollo de metodologías analíticas para la identificación y cuantificación de glicoalcaloides presentes en frutos (Ortiz, 2010); las investigaciones que aportaron evidencia para validar el uso popular de la uchuva como antidiabético y antioxidante (Medina, 2012; Mora-Huertas et al., 2010); la actividad hipoglucemiante del extracto de frutos de *Physalis peruviana* sobre algunas carbohidrasas intestinales (Rey, 2013); la vectorización del extracto en nuevos sistemas de liberación de uso farmacéutico (Baena Aristizábal, 2015); hasta el desarrollo de un sistema de liberación modificada de un extracto estandarizado de *Physalis peruviana*, aplicando el método de secado por aspersion (Bernal, 2016). Estos dos últimos trabajos han aportado la estandarización del extracto de *Physalis peruviana* y reafirmando la actividad hipoglucemiante reportada, adicionalmente estudiando algunos sistemas de liberación modificada con el extracto. A nivel internacional, igualmente, se han reportado investigaciones en las que se sustentan las propiedades medicinales de *Physalis peruviana* como antihepatoma, antioxidante, antiinflamatorio, antihepatotóxico, citotóxico contra células cancerígenas, hipolipidémico e hipoglucemiante, que han sido tomadas en cuenta también en los trabajos anteriores (Amuri et al., 2017; Hassan et al., 2017; Kasali et al., 2013; Kwon et al., 2006; Maldonado et al., 2006; Mohammed & Ibraheem, 2015; Puente et al., 2011; Ramadan, 2011; Sharma et al., 2015; Zhang et al., 2013).

El desarrollo de productos a partir de fuentes naturales, como los fitoterapéuticos, tienen a favor la aceptación actual de los consumidores, ya que los consideran más seguros y eficaces frente a los medicamentos tradicionales. En respuesta a esto, se puede generar una mayor aceptación y adherencia a los tratamientos frente a las terapias convencionales. Con base en la información anterior nacional e internacional, el uso del extracto estandarizado de la *Physalis peruviana* es un posible coadyuvante en el tratamiento de la diabetes, debido a su actividad hipoglucemiante. Por esto, se plantea el desarrollo de

formas farmacéuticas que faciliten la administración del extracto por vía oral. Sin embargo, esta ruta de administración hace susceptible el extracto a una posible pérdida de su actividad. Teniendo esto en consideración, se propone la elaboración de un sistema de liberación modificada que permita la protección del extracto para brindar una posible solución a la falta de adherencia de los pacientes diabéticos.

La presente investigación se enfoca en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación nanoestructurados, como una estrategia para mejorar su estabilidad, modular su liberación, alcanzar una mejor biodisponibilidad y mejorar su comportamiento como hipoglucemiante. Tras la revisión bibliográfica realizada para el planteamiento del presente proyecto, no se encontró información disponible acerca de estudios fundamentados en componentes nanoestructurado con copolímeros en bloque con extracto estandarizado de frutos de *Physalis peruviana*. Los únicos trabajos en los que se modifica la liberación por medio de materiales de uso popular, como lo son la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), PCL y alginato como vehículos de transporte del extracto, son los realizados por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional (Baena Aristizábal, 2015; Bernal, 2016; Ramírez, 2013). Por lo anterior, se decidió tomar como punto de partida la búsqueda de sustancias (extractos, fármacos, entre otros) que tuvieran naturaleza hidrofílica, como la que posee el extracto de *Physalis peruviana*. Fundamentados en el anexo A (Tabla Anexo A1) se escogió el método más adecuado para la elaboración de un sistema nanoestructurado que incorpore el extracto de *Physalis peruviana*. Por esta razón, en la Tabla 1-3 se muestran los porcentajes de encapsulación obtenidos, en su mayoría para sustancias hidrofílicas e hidrosolubles, más que todo por el método de doble emulsificación. Sin embargo, se incluyen también algunas sustancias de interés, naturales o con actividad antidiabética, ligeramente solubles o insolubles en agua.

**Tabla 1-3.** Encapsulación de principalmente sustancias hidrosolubles, algunas sustancias de interés, naturales o con actividad antidiabética, ligeramente solubles (\*) o insolubles en agua (\*\*).

Principio activo	Actividad farmacológica / uso en artículo	Moléculas trazadoras	Forma farmacéutica	Tamaño	Metodología	Polímero/vehículo	Estabilizante/tensioactivo/emulsificante	Solvente orgánico/fase oleosa/fase acuosa	Eficiencia de encapsulación (EE%)	Vía	Ref.
<i>Mukia scabrella</i>	Antimicrobiano (nanomedicina especialmente para infecciones bacterianas nosocomiales).	-	Nanopartículas no reportan forma exacta.	18–21 nm	Biosíntesis	Solución acuosa nitrato de plata	Oxido de plata sustrato glucosa – reductor.	Agua desionizada estéril	-	-	(Prabakar et al., 2013)
Lisozima de clara de huevo	Preservación de lisozima mediante encapsulación.	Lisozima	Microesferas	-	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w.	PLGA	PVA	DCM	47%-65 %	-	(Pérez, De Jesús, & Griebenow, 2002)
BSA (albúmina de suero bovino)	Un componente básico de los diversos reactivos biológicos para su uso diagnóstico, sobre todo para las pruebas de inmunohistoquímica.	BSA	Nanopartículas no reportan forma exacta.	200– 900 nm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w.	PLGA-PCL	PVA	DCM	50-85 %	-	(Lamprecht et al., 2000)
BSA (albúmina de suero bovino)	Un componente básico de los diversos reactivos biológicos para su uso diagnóstico, sobre todo para las pruebas de inmunohistoquímica.	-	Nanopartículas no reportan forma exacta.	380– 520 nm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w.	PLGA	PVA	Cloroformo	Carga de proteína 19-24	de EV	(Sahoo, Panyam, Prabha, & Labhasetwar, 2002)
Clonidina (molécula hidrofílica)	Liberación sostenida para administración intraarticular.	Clonidina	Microesferas	10– 20 µm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w.	PLGA	PVA	DCM	1.13% ± 0.09% - 13 % ± 1%	IA	(Gaignaux et al., 2012)
ADN	Modelo de fármaco hidrofílico.	-	Nanopartículas no reportan forma exacta.	100– 300 nm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w.	PLGA	PVA	DCM	La técnica de preparación fue eficiente para encapsular el modelo de ADN y se utilizará para la encapsulación de plásmidos en un trabajo futuro.	-	(Rizkalla, Range, Lacasse, & Hildgen, 2006)

Tabla 1-3. (Continuación)

Principio activo	Actividad farmacológica/uso en artículo	Moléculas trazadoras	Forma farmacéutica	Tamaño	Metodología	Polímero/vehículo	Estabilizantes/tensioactivos/emulsificantes	Solvente orgánico /fase oleosa/ fase acuosa	Eficiencia de encapsulación (EE%)	Vía	Ref.
HSA (albúmina sérica humana)	El modulador principal de la distribución de fluidos, Presión coloidosmótica.		Nanocápsulas	200 nm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w.	PLA	PVA	DCM	22 % - 33 %	EV	(Zambaux et al., 1998)
Vancomicina	Mejora de la permeabilidad intestinal de la vancomicina administrada por vía oral.	Liberación VCM y comparación con la mezcla física.	Nanopartículas no reportan forma exacta.	450– 466 nm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w.	PLGA	PVA	DCM	38.38% - 78.6%	VO	(Zakeri-Milani, Loveymi, Jelvehgari, & Valizadeh, 2013)
Vancomicina	Tratamiento de endoftalmítis, antibiótico.	Liberación de la vancomicina.	Microcápsulas	-	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w.	PCL	-	DCM	-	OC	(Petitti, Barresi, & Vanni, 2009)
Doxorrubicina	Co entrega de fármacos contra el cáncer.	Marcaje de la nanopartícula dirigida	Nanocápsulas	174 nm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w.	Ácido polimetacrílico	PVA	Cloroformo	-	IV	(Chiang, Hu, Liao, Chang, & Chen, 2013)
Ciprofloxacina HCl	Antibacteriano	Ciprofloxacina	Nanopartículas no reportan forma exacta.	130– 353 nm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w modificada.	PLGA	PVA	DCM	42,4%-47,4 %	VO	(Jeong et al., 2008)
BSA (albúmina de suero bovino)	Un componente básico de los diversos reactivos biológicos para su uso diagnóstico, sobre todo para las pruebas de inmunohistoquímica.	BSA	Nanocápsulas	200–500 nm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w modificada con una mezcla de glicerina-agua como estabilizador.	PLA	Tween 80	DCM	29%-51 %	-	(Lu et al., 1999)
Alendronato	Evaluación de la eficiencia de carga.	Alendronato	Nanopartículas no reportan forma exacta.	145– 223 nm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w y doble emulsificación por difusión del solvente.	PLGA	PVA	EtAc	DESE 55 % /- DESD 87 %	-	(Cohen-Sela, Chorny, Koroukhov, Danenberg, & Golomb, 2009)

Tabla 1-3. (Continuación)

Principio activo	Actividad farmacológica/uso en artículo	Moléculas trazadoras	Forma farmacéutica	Tamaño	Metodología	Polímero/vehículo	Estabilizantes/tensioactivos/emulsificantes	Solvente orgánico /fase oleosa/ fase acuosa	Eficiencia de encapsulación (EE%)	Vía	Ref.
Plásmido ADN	Modelo de fármaco hidrofílico.	Plásmido ADN	Nanopartículas no reportan forma exacta.	272-296 nm	Doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w y emulsificación por difusión del solvente.	PLA-PEG	PVA	EtAc: DCM (1:1)	DESE 60%-80% ED 80%-90 %		(Perez et al., 2001)
<i>Physalis peruviana</i>	Antidiabético	Flavonoides	Microcápsulas	0.7 µm - 1.2 µm	Doble emulsificación extracción del solvente w/o/w.	PCL	PLX 188 Tween 80 PVA	EtAc	64.1 (cv 0.7) % 87.3 (cv 1.5) %	VO	(Baena Aristizábal, 2015)
<i>Physalis peruviana</i>	Antidiabético	Flavonoides	Nanocápsulas	320 nm - 450 nm	Doble emulsificación extracción del solvente w/o/w.	PCL	PLX 188 Tween 80 PVA	EtAc	24.1 (cv 26.9) % - 70.3 (cv 18.1) %	VO	(Baena Aristizábal, 2015)
<i>Crocus sativus</i>	Antioxidante	Crocina, picrocrocina y azafran.	Nanocápsulas	<100 nm	Emulsiones múltiples w/o/w / spray dry (Secado por aspersión).	Maltodextrina pectina cítrica 80% proteína	Span 80	Aceite de girasol	WPC-10 84.53% ± 0.3% MD/WPC matriz 51.57% ± 0.29% WPC-pectin-Seq-10 95.94% ± 0.2% WPC-pectin-Sim 93.02 % ± 0.16% EE% general 51%-96%		(Esfanjani, Jafari, Assadpoor, & Mohammadi, 2015)
<i>Physalis peruviana</i>	Antidiabético	Flavonoides	Microcápsulas	850 µm - 1200 µm	Gelificación iónica	Alginato de sodio		Solución de cloruro de calcio	50 % ± 2 %	VO	(Baena Aristizábal, 2015)
<i>Ginkgo biloba</i>	Activación de la función cerebral	Gincósidos	Nanopartículas no reportan forma exacta.	<100 nm	Homogenización por alta presión	Patente	Patente	Patente	Patente	DC	20080254126 (2008)
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Homeostático, tratamiento de enfermedades coronarias, como angina de pecho e infarto agudo del miocardio.	Ácido salvianólico	Nanopartículas no reportan forma exacta.	2-5 µm	Secado por aspersión	Gelatina	Sal sódica de carboximetilcelulosa	Solución acuosa	43.15%-95.74%	AP	(Su et al., 2008)

Tabla 1-3. (Continuación)

Principio activo	Actividad farmacológica/uso en artículo	Moléculas trazadoras	Forma farmacéutica	Tamaño	Metodología	Polímero/vehículo	Estabilizantes/tensioactivos/emulsificantes	Solvente orgánico /fase oleosa/ fase acuosa	Eficiencia de encapsulación (EE%)	Vía	Ref.
Penicilina-G*	Antibacteriano	Penicilina	Nanocápsulas	131– 247 nm	Doble emulsificación por evaporación del solvente w/o/w modificada.	Adipato de polibutilo.	Tween Span	DCM	21,85-76,9 %	-	(Khoee & Yaghoobian, 2008)
Cuscuta chinensis*	Hepatoprotector	Flavonoides y lignanos	Nanoesferas	<500 nm	Formación de nano suspensión y evaporación del solvente.	Pluronic (PF68)	PVA Tween	Etanol	No se determina por la complejidad del principio activo.	-	(Yen, Wu, Lin, Cham, & Lin, 2008)
Curcuma longa*	Antiinflamatorio	Curcuminoides y curcumina	Nanocápsulas solidas lipídicas.	210.4 nm	Método de emulsificación por fusión en caliente.	Cera de abejas fase oleosa.	Tween 80 Lecitina	Agua	Curcumina 52.92% ± 5.41% curcuminoides 48.39% ± 6.62%,	-	(Zamarioli, Martins, Carvalho, & Freitas, 2015)
Callendula officinalis*	Antiinflamatorio	Esteres de faradiol y carotenos	Nanopartículas lipídicas	80 nm	Dilución de una microemulsión.	Ácido graso (PA, SA o AA)	Sal biliar (C, TC o TDC) como cotensioactivo.	Agua ultra pura	70%	-	(Arana et al., 2015)
Insulina**	Antidiabético	-	Nanocápsulas	169–253 nm	Doble emulsificación por evaporación del solvente w/o/w modificada sin estabilizador a través de la sonicación en ambos pasos.	PLA	Tween 80	DCM	-	-	(Zhu, Zhang, Yang, & Hong, 2005)
Carum copticum**	Antioxidante antibacterial	Timol, γ-terpineno y p-cimeno	Nanopartículas no reportan forma exacta.	30–80 nm	Gelificación iónica	Quitosano	Tween 80	DCM	4.7 ± 0.8 - 36.2 ± 3.1%	-	(Esmaeili & Asgari, 2015)
Physalis peruviana	Antioxidante	Rutósido	Nanoemulsiones.	182 ± 1 nm	Emulsificación espontánea	Monoleato de sorbitán, triglicéridos de cadena media.	Polisorbato 80	Acetona	85%.	-	(Bazana et al., 2019)
Insulina**	Antidiabético	Insulina	Nanocápsulas	250 nm	Técnica de coacervación interfacial mejorada.	PLA-PEG-PLA	Tween 80, dextran-70	Acetona	28,82%-70,58 %	-	(Ma, Feng, Ye, Wang, & Fan, 2001)

Tabla 1-3. (Continuación)

Principio activo	Actividad farmacológica/uso en artículo	Moléculas entrazadoras	Forma farmacéutica	Tamaño	Metodología	Polímero/vehículo	Estabilizantes/tensioactivos/emulsificantes	Solvente orgánico /fase oleosa/ acuosa	Eficiencia de encapsulación (EE%)	Vía	Ref.
<i>Physalis peruviana</i>	Hipoglucemiante	Rutósido	Microcápsulas	1 µm - 7 µm	Método de emulsificación - evaporación de solvente	Ftalato de hipromelosa (HPMCP)	PVA	DCM: Etanol	71%	-	(Echeverry et al., 2018)
<i>Physalis alkekengi-L</i>	Antioxidante	Flavonoides totales	Nanopartículas	~167±25 nm	Gelificación iónica	Quitosano	Trifosfato de sodio (STP)	Ácido acético	95 ± 3.2	-	(Mahmoudi et al., 2019)

**Nota:** Adaptado de (Baena Aristizabal, 2015; Ballesteros, Ramirez, Orrego, Teixeira & Mussatto, 2017; Bernal, 2016; Iqbal, Zafar, Fessi, & Elaissari, 2015; Mora-Huertas et al., 2010). Las siguientes siglas son utilizadas para la Tabla 1-3: EV (endovenosa), OC (ocular), T (vía tópica), IA (intraarticular), DC (dependiendo de la concentración escogen la vía de administración), AP (administración por vía pulmonar); DCM (diclorometano), EtAc (acetato de etilo), PVA (polivinil alcohol), PLA (ácido poliláctico), PEG (poli etilenglicol), PCL (poli caprolactona), PLGA (ácido poli(Láctico-co-glicólico)), PLX 80 (poloxamer 80); \* (baja solubilidad en agua), \*\* (insoluble en agua), MD (maltodextrina), WPC (concentrado de proteína de suero), WPC-pectin-Seq (proteína de suero-pectina por método secuencial), WPC-pectina-Sim (suero de proteína-pectina por el método simultáneo), 10 es la cantidad de fase dispersa (extracto de azafrán) en la microemulsión primaria w/o; EE (Eficiencia de encapsulación); PA (ácidos grasos saturados: palmíticos C16: 0), SA (esteárico C18: 0), AA (araquídico C20: 0), sales biliares: C (colato), TC (taurocolato), TDC (taurodesoxicolato); DESE (doble emulsificación evaporación del solvente w/o/w), DESD (doble emulsificación por difusión del solvente), ED (emulsificación por difusión del solvente); ADN (ácido desoxirribonucleico).

En cuanto a los materiales poliméricos a utilizar, la búsqueda bibliográfica permitió identificar que durante las últimas décadas se han desarrollado un gran número de copolímeros, algunos de ellos incluyeron una parte de polietilenglicol o polisacáridos. Estos desarrollos son debidos a que se buscaban sistemas nanoestructurados con propiedades superficiales sintonizables o programables para modular sus interacciones con las proteínas sanguíneas y con la mucosa, de esa manera controlar su destino o sitio *in vivo*. Los copolímeros también han demostrado eficiencia como estabilizantes para asegurar la estabilidad de los sistemas nanoestructurados dándoles una ventaja puesto que tienen estabilidad sin necesidad de surfactantes adicionales (Vauthier & Bouchemal, 2009).





## **2. Obtención de sistemas nanoestructurados a partir de mPEG-b-PCL ~46 KDa**

### **2.1. Introducción**

En la actualidad el uso de nanomateriales como plataformas de administración de fármacos y sustancias activas ha aumentado. Para la obtención de estos sistemas se pueden utilizar diferentes materiales, como lípidos, materiales inorgánicos y polímeros. Entre estos últimos se destacan los copolímeros sintéticos que han ganado mucha atención, debido a su versatilidad química. Los copolímeros sintéticos se pueden usar para obtener diferentes nanoestructuras, como nanoesferas, nanocápsulas, micelas, polimerosomas vesiculares, polipéptidos, conjugados polímero-fármaco y dendrímeros (Grossen et al., 2017).

Esta investigación se centra específicamente en el metoxi-polietilenglicol-b-poli-( $\epsilon$ -caprolactona) (mPEG-b-PCL), copolímero en bloque, biocompatible y biodegradable, ampliamente utilizado en la elaboración de sistemas nanoestructurados (Grossen et al., 2017). El segmento hidrofílico PEG se caracteriza por reducir inmunogenicidad y toxicidad, prolongar la concentración en sangre y alterar la biodistribución de moléculas. En cuanto, al segmento PCL, además de ser biodegradable es semicristalino (Grossen et al., 2017; Tomar et al., 2013), características que lo hacen un material versátil en la elaboración de sistemas nanoestructurados como transportadores de sustancias activas. Se eligió un peso molecular del mPEG-b-PCL mayor o igual a 40kDa de la policaprolactona con el fin de asegurar su solubilidad en la fase orgánica. La síntesis y la elección del polímero se basó en la experticia del grupo de investigación de Macromoléculas para obtener copolímeros de policaprolactona de diferentes pesos moleculares y, por lo tanto, con diferentes aplicaciones.

La elaboración de nanopartículas poliméricas puede hacerse por medio de polímeros sintéticos, semisintéticos, naturales, copolímeros y hacer uso de estabilizantes (Nogueira de Assis et al., 2008). Estas se pueden preparar mediante dos métodos generales: polimerización y polímeros preformados (Crucho & Barros, 2017). En esta tesis se trabajará una metodología escogida a partir de polímeros preformados. Se eligió la doble emulsificación (de tipo emulsión agua-aceite-agua (W/O/W)) evaporación del solvente modificada (DESEm) como metodología para la obtención de las nanopartículas. La doble emulsificación evaporación del solvente (DESE) es un método por el cual se pueden obtener NPs poliméricas que encapsulen componentes hidrofílicos y lipofílicos (Crucho & Barros, 2017; Mora-Huertas et al., 2010; Vauthier & Bouchemal, 2009). Para el entendimiento del procedimiento bajo el principio químico y un fundamento científico de la elección de los materiales de recubrimiento (mPEG-b-PCL de ~46 KDa), estabilizantes (mPEG-b-PCL de 8 KDa y PVA) y solventes (DCM y H<sub>2</sub>O), se describen brevemente características importantes de estos.

Desde la óptica del análisis de los parámetros de solubilidad de los materiales de partida escogidos para la formación de los sistemas nanoestructurados y con el fin de justificar su selección, se tiene que: los parámetros de solubilidad para el segmento de polietilenglicol (PEG) del copolímero, corresponden a  $\delta D$  33.6,  $\delta P$  12.2,  $\delta H$  25.7 y para la Poli( $\epsilon$ -caprolactona) a  $\delta T$  20.33,  $\delta P$  8.40,  $\delta H$  5.00, confirmando la naturaleza anfifílica del copolímero, compuesto por un segmento hidrofílico correspondiente al PEG y un segmento hidrofóbico característico del PCL. Por esto, cuando el segmento mayoritario y más largo del copolímero es la PCL en comparación con PEG, como ocurre en el caso del mPEG-b-PCL de ~46 KDa, se utilizan solventes orgánicos para su disolución, como el DCM, cuyos parámetros de solubilidad son  $\delta D$  18.2,  $\delta P$  6.3,  $\delta H$  6.1, cercanos a los  $\delta H$  de la PCL (Jenkins, 2011), favoreciendo la interacción entre el polímero y el solvente, lo que conlleva a una adecuada solubilidad, permitiendo la disolución del polímero en el medio. Por otro lado, si el copolímero posee un bajo peso molecular, este podrá ser soluble en un medio acuoso, o formar una adecuada dispersión por su segmento hidrofílico correspondiente al PEG.

El PVA, se escogió como estabilizante convencional empleado en la obtención de NPs y que se convierte en punto de comparación. Tiene una buena solubilidad en agua, debida a su alto grado de polaridad, reflejado en sus parámetros de solubilidad de Hansen:  $\delta D$  18.2,  $\delta P$  17.2,  $\delta H$  17.8 (Tacx, Schoffeleers, Brands, & Teuwen, 2000). Ha sido utilizado como estabilizante a una concentración del 2 % para la obtención de NPs de policaprolactona (PCL) (Baena Aristizábal et al., 2016) y de mPEG-b-PCL (Rodríguez Arévalo, 2019) con distribuciones de tamaño de partícula reducidas. A esta concentración se disuelve bien en el agua (Baena Aristizábal, 2015).

Como es de suponerse, para el empleo de la metodología DESEm los solventes utilizados deben ser inmiscibles, por esto se escogió el H<sub>2</sub>O desionizada y el DCM, cuyos parámetros de solubilidad de Hansen corresponden a  $\delta D$  15.5,  $\delta P$  16.0,  $\delta H$  42.3 y a  $\delta D$  18.2,  $\delta P$  6.3,  $\delta H$  6.1, respectivamente, con una diferencia notoria en sus parámetros de formación de puentes de hidrogeno y de polaridad. En las Tablas 2-1.1 y 2-1.2 se resumen las condiciones experimentales escogidas bajo el fundamento teórico expuesto, la revisión bibliográfica realizada y algunos ensayos preliminares (Anexo E) que llevaron a definir las.

**Tabla 2-1.** Condiciones escogidas para la obtención de NPs preparadas por el método DESEm.

Condiciones escogidas		Condiciones recomendadas	
		Recomendado	Referencia
Fase acuosa 1 (W1)	Volumen	2 mL	0,15-0,5 mL (Mora-Huertas et al., 2010) 2.5 mL (Baena Aristizábal, 2015) 2 (Rodríguez Arévalo, 2019)
	Concentración de fase acuosa 1		0,5-25 mg (Mora-Huertas et al., 2010)
	Concentración del extracto etanólico de frutos de <i>Physalis peruviana</i>	15 mg/mL	15 mg/mL (Baena Aristizábal, 2015)
	Concentración de mPEG-b-PCL ~46 KDa	0.1 % P/V	No hay información reportada
Fase orgánica (o)	Concentración fase orgánica	0.1 % P/V	5-10% FO (Mora-Huertas et al., 2010) 0,1% P/V (Rodríguez Arévalo & Baena Aristizábal, 2019; Baena Aristizábal, 2015)
	Solvente	DCM	
	Volumen	10 mL	1,5-5 mL (Mora-Huertas et al., 2010) relación fase acuosa (w1) / fase orgánica (o): 1:5 (Rodríguez Arévalo & Baena Aristizábal, 2019; Baena Aristizábal, 2015) 10 mL (Rodríguez Arévalo, 2019)

Tabla 2-1. (Continuación)

Condiciones de operación escogidas			Recomendado	Referencia
Fase orgánica (o)	Velocidad de homogeneización E1	11600 rpm	11600 rpm	(Rodríguez Arévalo, 2019)
			9500	(Baena Aristizábal, 2015)
	Tiempo	4 min	1 min	(Baena Aristizábal, 2015)
			4 min	(Rodríguez Arévalo & Baena Aristizábal, 2019; Baena Aristizábal, 2015)
Fase acuosa 2 (W2)	PVA	2%	1-5%	(Mora-Huertas et al., 2010)
			2%	(Rodríguez Arévalo, 2019)
			3%	(Baena Aristizábal, 2015)
	mPEG-b-PCL 8 KDa	0.01%, 0.03%, 0.05%, 0.1 %	No hay información reportada	
	Solvente	Agua desionizada		
	Volumen	100 mL	100 mL	(Rodríguez Arévalo, 2019)
			10-50 mL	(Mora-Huertas et al., 2010)
	Velocidad de homogeneización E2	13000 rpm	13000	(Rodríguez Arévalo, 2019)
13500				
17500			(Baena Aristizábal, 2015)	
Tiempo	4 min	4 min	(Baena Aristizábal, 2015)	

En este capítulo nos centraremos en la obtención de sistemas nanoestructurados y su respectiva caracterización a partir del mPEG-b-PCL sintetizado por un mecanismo de apertura de anillo. Adicionalmente, se discutirán las posibles estructuras formadas como sistemas nanoestructurados a partir de la metodología propuesta, evaluando dos niveles de concentraciones para el estabilizante de mPEG-b-PCL de 8KDa, uno alto de 0.1 % y uno bajo de 0.01 %, escogidos bajo la experticia del grupo de investigación de Macromoléculas, además del uso de un estabilizante convencional como PVA al 2 %. Los resultados obtenidos en este capítulo serán fundamento para la elaboración de los sistemas nanoestructurados cargados con extracto de *Physalis peruviana*, lo que se explicará en el Capítulo 3.

## 2.2. Materiales y Métodos

### 2.2.1. Reactivos y equipos

#### 2.2.1.1. Síntesis del copolímero mPEG-b-PCL ~46 KDa

Para la síntesis del polímero mPEG-b-PCL se empleó metoxi-polietilenglicol (mPEG) ~2 KDa Sigma Aldrich (México, lote: MKBT7172V), tolueno (anhidro), Panreac (España, lote: 0000055318),  $\epsilon$ -caprolactona (CL) Sigma Aldrich (EU, lote: MKBX5176V), octanoato de estaño II (Sn (Oct)<sub>2</sub>).

La caracterización del polímero se realizó mediante las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) (Bruker Avance 400, Suiza), operado a 300 MHz con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno (0.03 vol. %); espectroscopia infrarroja (IR) (espectrómetro FTIR, Shimadzu® IRAffinity-1, Japón); calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) (DSC, Mettler Toledo DSC 1, Suiza). Su secado fue llevado a cabo en el liofilizador Christ Beta 1-8 LDplus.

#### 2.2.1.2. Elaboración de nanopartículas (NPs) de mPEG-b-PCL ~46 KDa

Para la realización de las nanopartículas (NPs) se utilizó mPEG-b-PCL~46 KDa; diclorometano Merck (Alemania, lote: K47623150610); agua grado HPLC (sistema de purificación de agua Direct-Q® (EU)); polivinilalcohol (PVA) Mowiol® 4-88 Sigma Aldrich (Alemania, lote: STBH0667); mPEG-b-PCL 8 KDa (aproximadamente), el cual fue generosamente donado por el Grupo de Macromoléculas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia; papel filtro 5-10  $\mu$ m Boeco (Alemania, lote: 09-040); micropipetas, Thermo Scientific Finnpiptette® F2, 20-200  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L; filtros Millex (Millipore Corporation, EU) de 0,45  $\mu$ m.

Para la obtención del sistema se utilizó un homogeneizador de alta velocidad IKA® Ultra-Turrax® T18 DS1, vástago grueso S18N-19G, vástago delgado S18N-10G, Alemania; plancha de agitación multipunto, IKA® RO 10 PS1, Alemania; balanza analítica, Ohaus® Pioneer PA214, E.U; refrigerador, Challenger CR420, Colombia; centrífuga, Thermo

Scientific Heraeus® Megafuge® 16, rotor Highconic®II, Alemania; liofilizador, CHRIST Beta 1-8 LDplus, Alemania.

Para la caracterización se utilizaron las siguientes metodologías: dispersión dinámica de luz (Malvern Zetasizer Nano – ZS, Reino Unido) y por sus siglas en inglés *dynamic light scattering* (DLS), microscopía de transmisión electrónica y por sus siglas en inglés *Transmission electron microscopy* (TEM) (microscopio electrónico de transmisión, MARCA JEOL JEM-100S, Japón).

## 2.2.2 Metodología

### 2.2.2.1. Síntesis del copolímero mPEG-b-PCL ~46 KDa

La polimerización se llevó a cabo por medio de un mecanismo de ruptura del anillo de caprolactona (CL), usando como (macro)iniciador el homopolímero metoxi-polietilenglicol (mPEG) y como catalizador el octanoato de estaño. Se siguió la metodología del Grupo de Investigación de Macromoléculas (Villamil, Parra & Pérez, 2019) y, como referente, lo reportado anteriormente por otros autores (Shen, Guo & Lu, 2008; Liang et al., 2015; Mu et al., 2017; Grossen et al., 2017).

Para obtener un bloque de la PCL de un peso molecular aproximado de 40 KDa se estableció la cantidad estequiométrica de la  $\epsilon$ -CL. La relación molar entre iniciador: monómero: catalizador utilizada fue 1: 351: 0.5. Inicialmente, se secó el mPEG con tolueno anhidro. Para ello, se tomaron 0.51 mmoles de mPEG 2 KDa, los cuales fueron secados con tolueno por medio de la rotaevaporación del solvente (rotaevaporador Buchi R II, Suiza), removiendo el agua residual por medio de una destilación azeotrópica (Shen, Guo & Lu, 2008). Se adicionaron 18 mL de  $\epsilon$ -CL y 150  $\mu$ L de catalizador Sn (Oct)<sub>2</sub> y la reacción se dejó en agitación bajo atmósfera de argón a 110 °C durante 24 h. Una vez completada la reacción, la separación se realizó por medio de una precipitación con exceso de dietiléter. El producto se recuperó por filtración al vacío y se sometió a dos ciclos más de precipitación. Finalmente, se secó a presión reducida hasta peso constante (horno de vacío, Aceq HRV-1016, Colombia) y el copolímero obtenido se almacenó en un desecador.

### **Caracterización del copolímero**

La caracterización se realizó mediante las técnicas de espectroscopia infrarroja (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

### **Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)**

Los espectros de FT-IR con reflectancia total atenuada (ATR) fueron tomados empleando aproximadamente 5 mg de muestra, los cuales, se ubicaron directamente sobre el prisma de ZnSe en el espectrófotometro FT-IR (Shimadzu® IRAffinity-1, con accesorio HATR 10, Japón), en un rango de 4000 a 750  $\text{cm}^{-1}$  con resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$  y acumulación de 32 scans, realizando antes de cada lectura un background. (Shuai et al., 2004).

### **Resonancia magnética nuclear**

Para obtener el espectro  $^1\text{H}$ -RMN, se pesó aproximadamente 20 mg del copolímero purificado y se disolvió en  $\text{CDCl}_3$ . El espectro se tomó a 303 K, en un espectrómetro RMN (Bruker Avance 400, Suiza) operado a 300 MHz, con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno (0.03 vol. %) (Shen, Guo & Lu, 2008).

### **Calorimetría diferencial de barrido**

Se pesó aproximadamente 5 mg de muestra para el análisis térmico de calorimetría diferencial de barrido (DSC, Mettler Toledo DSC 1, Suiza), bajo atmósfera de nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) con un flujo de 50 mL/min. Las muestras se sometieron al siguiente programa: se calentó desde 25 °C hasta 120 °C a 20 °C/min. Posteriormente, se hizo una isoterma de 120 °C por 5 min. La muestra se enfrió de 120 °C hasta -60 °C a 10 °C/min y luego se hizo una isoterma por 10 min a -60 °C. Finalmente, se calentó de -60 °C hasta 120 °C a 10 °C/min.

### **Grado de polimerización y peso molecular aproximado por $^1\text{H}$ -RMN**

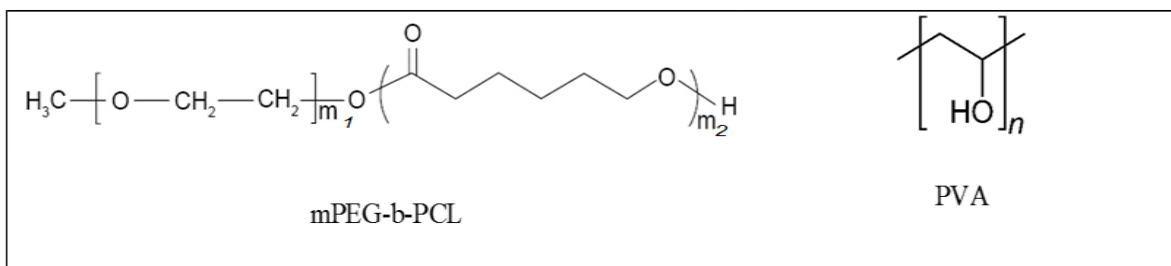
El grado de polimerización del bloque PCL se calculó comparando en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN las integrales de algunos picos característicos: el del bloque PCL y el del bloque PEG. El peso molecular aparente del copolímero se determinó usando el espectro  $^1\text{H}$ -RMN. Para ello se tomaron las zonas de 4.20-3.35 ppm, realizando una ampliación de esa parte del espectro. En esa zona se encuentran las señales características para realizar el análisis

correspondiente: 3.40; 3.65 y 4.05 ppm. La integración de las señales permitió obtener el peso molecular aparente (software, MestReNova versión 12.0.3-21384).

### 2.2.2.2. Preparación de un sistema nanoestructurado de mPEG-b-PCL ~46 KDa por doble emulsificación evaporación del solvente modificada (DESEm)

Se partió del copolímero previamente sintetizado mPEG-b-PCL, de aproximadamente 46 KDa, empleando la metodología de DESEm y haciendo uso de los estabilizantes PVA y mPEG-b-PCL de 8 KDa (Figura 2-1). Se prepararon 100 mL de una dispersión de 10 mg/mL del copolímero en diclorometano, para obtener la fase orgánica (O).

**Figura 2-1.** Estructura de los estabilizantes a evaluar mPEG-b-PCL 8 KDa y PVA 31 KDa.



$m_1$  y  $m_2$  son las unidades repetitivas de los bloques del copolímero correspondiendo aproximadamente a 47 y 387, respectivamente;  $n$  es a la unidad repetitiva del PVA que corresponde aproximadamente a un grado de polimerización de 630. Fuente: Elaboración propia.

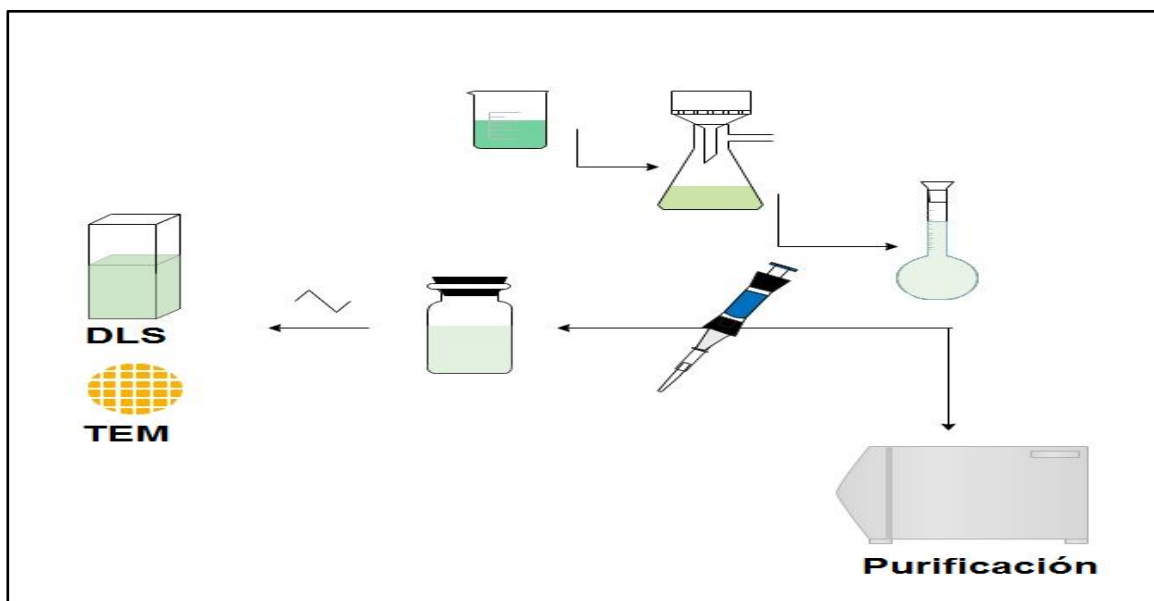
Para llevar a cabo la primera emulsión se adicionaron 2 mL de agua desionizada\* (W1) (fase acuosa sola o destinada a tener el principio activo o sustancia activa, según fuera el caso) gota a gota a la fase orgánica (O), homogeneizando simultáneamente a una velocidad de emulsificación de 11600 rpm durante 4 minutos. Posteriormente, se añadió esta emulsión (W1/O) a 100 mL de una fase acuosa externa (W2) que incluía uno de los dos estabilizantes a evaluar (PVA 2 %, mPEG-b-PCL 8 KDa 0.01 % y 0.1 %, Anexo B); se emulsificó con el mismo equipo a una velocidad de 13 000 rpm durante 4 minutos. Posterior a la obtención de la nanoemulsión (W1/O/W2), se evaporó el solvente orgánico. Para el presente estudio, con el fin de evaporar el DCM, la nanoemulsión permaneció en la plancha multipunto, con agitación constante (300 rpm), a temperatura ambiente, durante 24 horas,



considerando que esta metodología de evaporación del solvente permite obtener tamaños de partícula pequeños y con distribución homogénea (Martinez et al., 2017).

Una vez evaporado el solvente es necesario remover posibles impurezas de la dispersión de las NPs y con esto evitar cualquier tipo de agregado que no sea de interés. En primer lugar, se filtró al vacío con embudo Büchner y papel filtro; se llevó la dispersión a un balón de 100 mL y se aforó para mantener el volumen constante. Partiendo de esta dispersión, se realizaron las caracterizaciones correspondientes (Figura 2-2). Se tomaron 300  $\mu\text{L}$  de la dispersión de NPs y se diluyeron con agua destilada a un volumen de 3 mL. A las partículas contenidas en esta dispersión diluida se les determinó el tamaño de partícula, potencial  $\zeta$  y su morfología, cuyo procedimiento se explica más adelante. Al resto de la dispersión que no se diluyó, se centrifugó y fueron lavados con agua desionizada por 3 ciclos, cada ciclo a una velocidad de 8500 rpm, a una temperatura de 22  $^{\circ}\text{C}$ , durante 1 hora, con el fin de separar los pellets. Después de este procedimiento, las partículas (en dispersión o en el pellet), se congelaron a -18  $^{\circ}\text{C}$  y liofilizaron con un secado principal de 48 h y vacío a -20  $^{\circ}\text{C}$  a 1.0 mbar.

**Figura 2-2.** Esquema del procesamiento de las muestras para caracterización y purificación



La caracterización de las partículas se llevó a cabo por dos metodologías principales: dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Fuente: Elaboración propia.

A continuación, se describen las metodologías utilizadas para caracterizar el sistema nanoestructurado basado en el copolímero anfifílico en bloque en términos del potencial electrocinético, el tamaño y la morfología de las partículas.

### **Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (Pdl)**

La medición se llevó a cabo usando la técnica de dispersión dinámica de luz. Para ello, se tomó 100  $\mu\text{L}$  de la dispersión sin liofilizar y se diluyó en 900  $\mu\text{L}$  de agua destilada, en una celda de plástico (DTS0012) para manejar una concentración adecuada de aproximadamente 200 ppm. Las medidas se llevaron a cabo con un índice de refracción (IR) de 1.520, absorción de 0.100 y agua como medio dispersante (IR=1.330). La medición se llevó a cabo con un ángulo dispersión de  $173^\circ$ , a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , haciendo 10 corridas, con una duración de 10 s cada una. El tamaño y la dispersión de las partículas (Pdl) se calculó realizando el promedio de 5 mediciones, y se determinó la desviación estándar. Los datos fueron tratados con el software Zetasizer versión 7.11.

### **Potencial Z**

El potencial  $\zeta$  se determinó en el Zetasizer nano, empleando la celda DTS1070; se realizó una dilución en agua destilada (índice de refracción 1.33, constante dieléctrica 78.5, viscosidad 0.8872), de manera similar a lo explicado para el tamaño. La medición se llevó a cabo a  $25^\circ\text{C}$ , haciendo 10 corridas, con un retraso entre mediciones de 30 s. El potencial  $\zeta$  se calculó usando un  $f(Ka)$  de 1.50 (modelo Smoluchowski), realizando el promedio de 5 mediciones, y se determinó la desviación estándar. Los datos fueron tratados con el software Zetasizer v7.11.

Los datos obtenidos en la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas fueron analizados estadísticamente a través de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey usando el software GraphPad Prism. Las diferencias significativas fueron determinadas considerando un  $P < 0.05$  como significativo. En todos los experimentos los resultados se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar.

### **Morfología**

Para estudiar la morfología de las partículas se usó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para esto se diluyó la muestra, de acuerdo con lo previamente

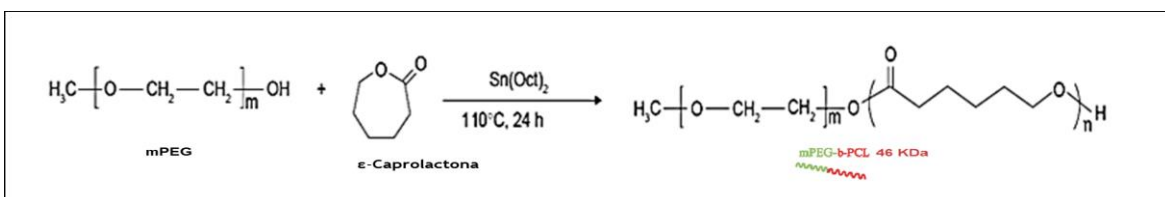
explicado, y se filtró a través de filtros Millex (Millipore Corporation, EU) de 0,45  $\mu\text{m}$  (una vez se tenía claro, en el tamaño de las partículas se encontraban por debajo de este valor); una gota de cada muestra se ubicó en una rejilla de cobre malla 300, recubierta con formvar®, generando una fina película que se secó al aire. Se tomaron fotografías de aumento  $\times 1\mu\text{m}$ ,  $\times 0.5\ \mu\text{m}$ ,  $\times 200\ \text{nm}$  y  $\times 100\ \text{nm}$ . Las imágenes fueron procesadas por el software Gatan Microscopy Suite® versión 2.11.1404.0.

## 2.3. Resultados y discusión

### 2.3.1 Síntesis del copolímero m-PEGL-b-PCL~46 KDa

Se sintetizó m-PEGL-b-PCL mediante la polimerización de apertura de anillo (ROP) de  $\epsilon$ -CL usando mPEG como macro iniciador (Figura 2-3). La copolimerización fue confirmada corroborando las bandas y señales debidas a ambos segmentos correspondientes a los grupos funcionales característicos por FTIR-ATR y su respectivo ambiente químico por  $^1\text{H}$ -RMN como se describe a continuación:

**Figura 2-3.** Síntesis del copolímero



Copolimerización de caprolactona (CL) empleando metoxi-polietilenglicol (mPEG) como iniciador, por un mecanismo de ruptura de anillo.  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  octanoato de estaño. Fuente: Elaboración propia.

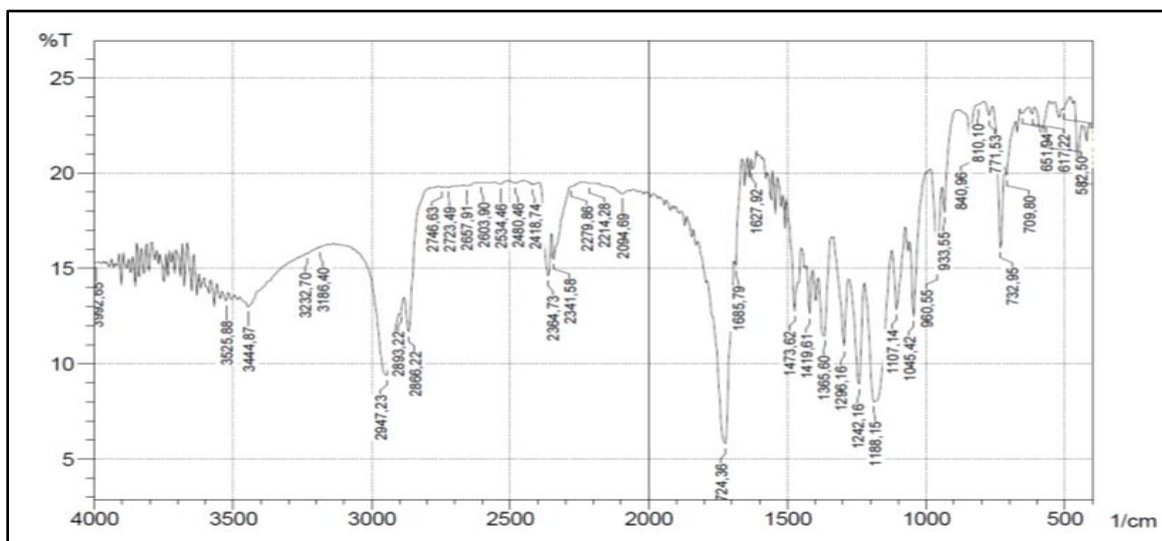
De acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, se obtuvieron aproximadamente 17.2 g de mPEG-b-PCL, correspondientes a un rendimiento del 84.01 %. Este se considera que está dentro de un rango adecuado (Furniss, Hannaford, Smith & Tatchell 1990). Aunque otros autores han reportado rendimientos mayores del 85 % (Shen, Guo & Lu, 2008) y del 95 % (Shuai et al., 2004). El menor porcentaje se puede atribuir a pérdidas de masa por el proceso de precipitación y pérdidas durante la filtración al vacío.

### Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro FT-IR del copolímero sintetizado (Figura 2-4), presenta bandas características de los grupos funcionales de cada uno de los segmentos que coinciden con lo reportado por otros autores y con lo establecido en el anexo J (Gao et al., 2013; Mu et al., 2017; Shuai et al., 2004; Tomar et al., 2013; Yang et al., 2014).

En  $3444.87\text{ cm}^{-1}$ , estiramiento característico para un O–H asociado, correspondiente posiblemente a la captación de agua por el segmento PEG; los estiramientos de los enlaces C–H, alrededor de  $2947.23\text{ cm}^{-1}$  y  $2866.22\text{ cm}^{-1}$  (Tomar et al., 2013; Yadav et al., 2008). La banda de absorción más característica del espectro está en  $1724.36\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración del grupo carbonilo C=O de la PCL. En cuanto a la banda en  $1242.16\text{ cm}^{-1}$ , se atribuye a las vibraciones por el estiramiento de tipo simétrico y asimétrico del enlace C–O–R del copolímero (Tomar et al., 2013; Shuai et al., 2003; Yadav et al., 2008).

**Figura 2-4.** Espectro FT-IR para el copolímero mPEG-b-PCL ~46 KDa.



Fuente: Elaboración propia.

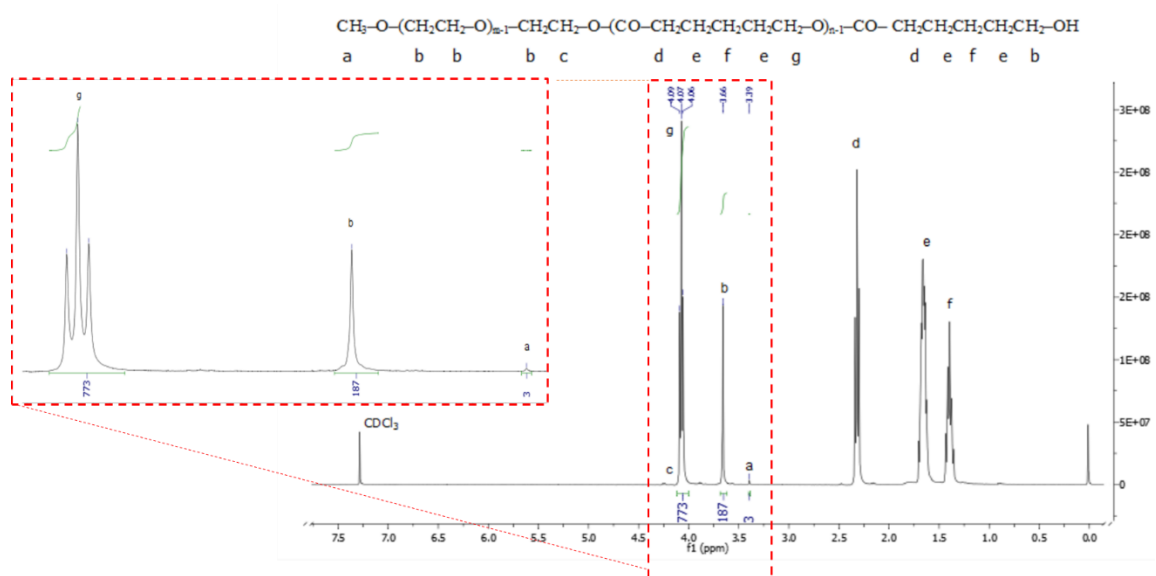
Por otro lado, en el segmento PEG se observan las bandas características en  $1107.14\text{ cm}^{-1}$  del enlace C–O y en  $1188.15\text{ cm}^{-1}$ , atribuida a las vibraciones de estiramiento del enlace C–O–C de la unidad repetitiva –O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub> (Tomar et al., 2013; Shuai et al., 2003; Yadav et al., 2008).

La caracterización estructural del copolímero se completó llevando a cabo un espectro de resonancia magnética nuclear de protón. Al comparar estas señales con las bandas observadas en el espectro infrarrojo, se observa una correlación de los grupos funcionales con los desplazamientos de los protones del espectro de  $^1\text{H-RMN}$ ; entre ellas se destacan las señales correspondientes a los protones de los metilos, las cercanas a los grupos ésteres característicos de la PCL, cercanos a los grupos OH, entre otras, las cuales se explicarán con detalle a continuación.

### Resonancia magnética nuclear de protón $^1\text{H-RMN}$

El espectro  $^1\text{H-RMN}$  del copolímero sintetizado (Figura 2-5) muestra la presencia de señales características del bloque PEG, entre las que se encuentran el pico en 3.39 ppm, referente a los protones del metilo  $-\text{CH}_3$  unido al oxígeno de la unidad repetitiva del PEG (a) y el pico en 3.66 ppm, correspondiente a los protones del metileno  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$  (b), al que también se asocian los protones vecinos al hidroxilo final  $-\text{CH}_2\text{OH}$  (b). La señal alrededor de 4.2 ppm se asocia a los protones del PEG cercanos al bloque PCL  $-\text{CH}_2\text{OCO}-$  (c).

**Figura 2-5.** Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del copolímero sintetizado mPEG-b-PCL ~46 KDa



Espectro obtenido en  $\text{CDCl}_3$  (software, MestReNova versión 12.0.3-21384). Fuente: Elaboración propia.

Las señales correspondientes al bloque de la PCL tienen los siguientes desplazamientos característicos. Por un lado, se observan señales alrededor de 2.35 ppm, correspondiente a los protones vecinos al ester  $-\text{OOCCH}_2-$  (d), en 1.64 ppm se asocia a los protones  $-\text{OCCH}_2-$  (e), en 1.40 ppm hace referencia a los protones  $-\text{CH}_2-$  (f) y en 4.06 ppm corresponde a los protones cercanos al grupo ester  $-\text{CH}_2\text{OCO}-$  (g). Estos resultados concuerdan con lo hallado en otros estudios (Tomar et al., 2013; Shuai et al., 2004; Yang et al., 2014; Mu et al., 2017; Tomar et al., 2013; Gao et al., 2013).

Una vez se corroboró la adecuada síntesis del copolímero, se usó el espectro  $^1\text{H}$ -RMN para estimar el peso molecular en número ( $M_n$ ) por integración de señal, como se describe a continuación.

#### **Determinación del peso molecular en número ( $M_n$ ) del copolímero por $^1\text{H}$ -RMN**

El primer paso para la determinación del peso molecular en número ( $M_n$ ) del copolímero obtenido a través de  $^1\text{H}$ -RMN consistió en el cálculo de las unidades de repetición de las fracciones que lo conforman. Para esta determinación se tomó la zona de 4.20-3.35 ppm, realizando una ampliación de esta parte del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (como se presenta en la Figura 2-5). Se calculó primero la integral de la señal que aparece en 3.40 ppm con un valor de 3. Esta señal está relacionada con el grupo metilo inicial del copolímero mPEG-b-PCL, unido al oxígeno de la unidad repetitiva del PEG para tres hidrógenos, siendo un singlete característico de este metilo inicial. Posteriormente, se calcula la integral de la señal correspondiente al monómero de PEG, en 3.65 ppm con un valor de 187, siendo también un singlete de un total de 4 hidrógenos. La señal en aproximadamente 4.05 ppm, corresponde a un triplete de 2 hidrógenos y se interpreta como el primer metilo de la unidad repetitiva del PCL; el valor de la integral es de 773. Con base en esta información, se realizó el cálculo del peso molecular aparente en dos pasos: inicialmente se determina el peso molecular de cada segmento y posteriormente se suman las contribuciones de cada uno de ellos.

Para calcular el peso molecular en número de cada segmento, se dividió la respectiva integral en la cantidad de protones (hidrógenos) multiplicando este factor por el PM de la unidad repetitiva de cada dominio (Ecuación 5), donde  $a_i$  corresponde al área integrada

bajo las señales del espectro  $^1\text{H-RMN}$  para las respectivas fracciones,  $mi$  corresponde al número de protones correspondientes a cada señal y  $PMi$  es el peso molecular del monómero o fracción  $i$  (Izunobi & Higginbotham, 2011). De esa manera se muestra el cálculo correspondiente para el segmento PEG (Ecuación 6) y para el segmento PCL (Ecuación 7).

$$\text{Peso molecular aproximado aparente del segmento} = \frac{ai}{mi} \times PMi \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\begin{aligned} \text{Peso molecular aproximado aparente del segmento PEG de partida} = \\ \frac{187}{4} \times \frac{44 \text{ g}}{\text{mol}} = 2057 \text{ Da de PEG} \end{aligned} \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$\begin{aligned} \text{Peso molecular aproximado aparente del segmento PCL} = \\ \frac{773}{2} \times \frac{114 \text{ g}}{\text{mol}} = 44061 \text{ Da de PCL} \end{aligned} \quad (\text{Ecuación 7})$$

El segundo paso corresponde al cálculo del PM en número del copolímero. Para esto, se sumaron los pesos moleculares aparentes de cada dominio (Ecuación 8), evidenciando que las señales y los pesos moleculares obtenidos sí concuerdan con los planteados inicialmente, además confirman que el espectro está bien definido y que las integrales no presentan ruido.

$$\begin{aligned} \text{Peso molecular aproximado aparente del copolímero} = \\ 44061 \text{ Da PCL} + 2057 \text{ Da PEG partida} = 46118 \end{aligned} \quad (\text{Ecuación 8})$$

### Grado de polimerización

El grado de polimerización ( $Xn$ ) se calculó dividiendo la integral de la señal escogida en el número total de protones correspondientes. De esta manera, se tiene el grado de polimerización para los segmentos de los bloques correspondientes al PEG y a la PCL del copolímero (Ecuación 9 y Ecuación 10). Esta información se tomó a partir de la ampliación del espectro  $^1\text{H-RMN}$  que se mostró en la Figura 2-5.

$$Xn_{PCL} = \frac{773}{2} = 386.5 \sim 387 \quad (\text{Ecuación 9})$$

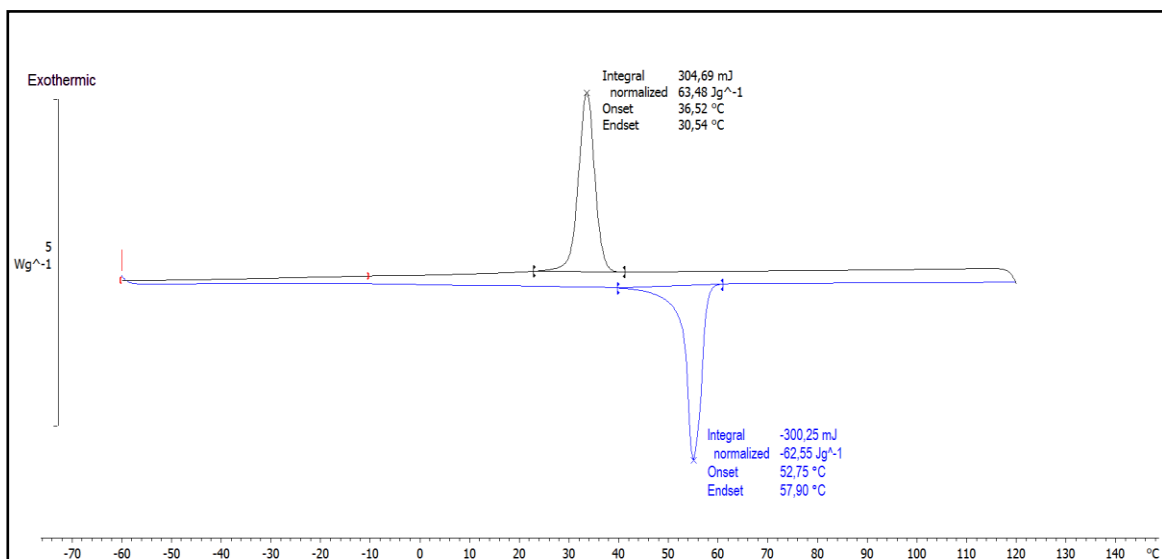
$$Xn_{PEG} = \frac{187}{4} = 46.75 \sim 47 \quad (\text{Ecuación 10})$$

El peso molecular en número y el grado de polimerización calculados por  $^1\text{H-RMN}$  concuerdan con los pesos moleculares calculados de forma teórica, confirmando que se llevó a cabo la síntesis polimérica de manera adecuada.

### Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Con el fin de estudiar el comportamiento térmico y corroborar la formación del copolímero, se realizó un análisis térmico por DSC. En la Figura 2-6 se presenta el termograma, que incluye los resultados de cristalización y punto de fusión, quitando los resultados de la etapa de borrado térmico ( $25\text{ °C} - 120\text{ °C}$ ).

**Figura 2-6.** Termograma de mPEG-b-PCL~46 KDa



Fuente: Elaboración propia.

El termograma muestra una liberación de energía térmica correspondiente a la entalpía de cristalización del polímero ( $36.5\text{ °C} - 30.54\text{ °C}$ ), donde se evidencia una formación de cristales a partir de una temperatura de  $36.52\text{ °C}$ , con una entalpía característica para este proceso de  $63.48\text{ Jg}^{-1}$ . Además, se observa un evento endotérmico correspondiente a la fusión de los dos dominios ( $52.75\text{ °C} - 57.90\text{ °C}$ ), con una entalpía de  $-62,55\text{ Jg}^{-1}$ . La pequeña diferencia en la entalpía de cristalización con respecto a la entalpía de fusión puede ser debida a una disminución del grado de cristalización y a un tamaño más pequeño de los dominios cristalinos. Los resultados obtenidos del punto de fusión concuerdan con lo reportado en la literatura, ya que se encuentran cercanos al rango de



temperatura de 40–59 °C, correspondiente a la fusión de ambos dominios de PEG y PCL (Villamil et al., 2019), confirmando la obtención del copolímero.

Hasta esta parte se sintetizó y caracterizó el copolímero mPEG-b-PCL, destacando como información obtenida un peso molecular aparente cercano a lo esperado ~ 46 KDa, una entalpía de cristalización de 63.48 Jg<sup>-1</sup>, una entalpía de fusión de -62,55 Jg<sup>-1</sup> y un grado de polimerización de ~ 387 para el segmento de PCL y de ~ 47 para el segmento de PEG. Las señales del espectro <sup>1</sup>H-RMN y las bandas obtenidas en el espectro FT-IR, reflejan la formación del copolímero mPEG-b-PCL. Teniendo el material precursor sintetizado y caracterizado, se continúa con la elaboración de los sistemas nanoestructurados con base en este copolímero.

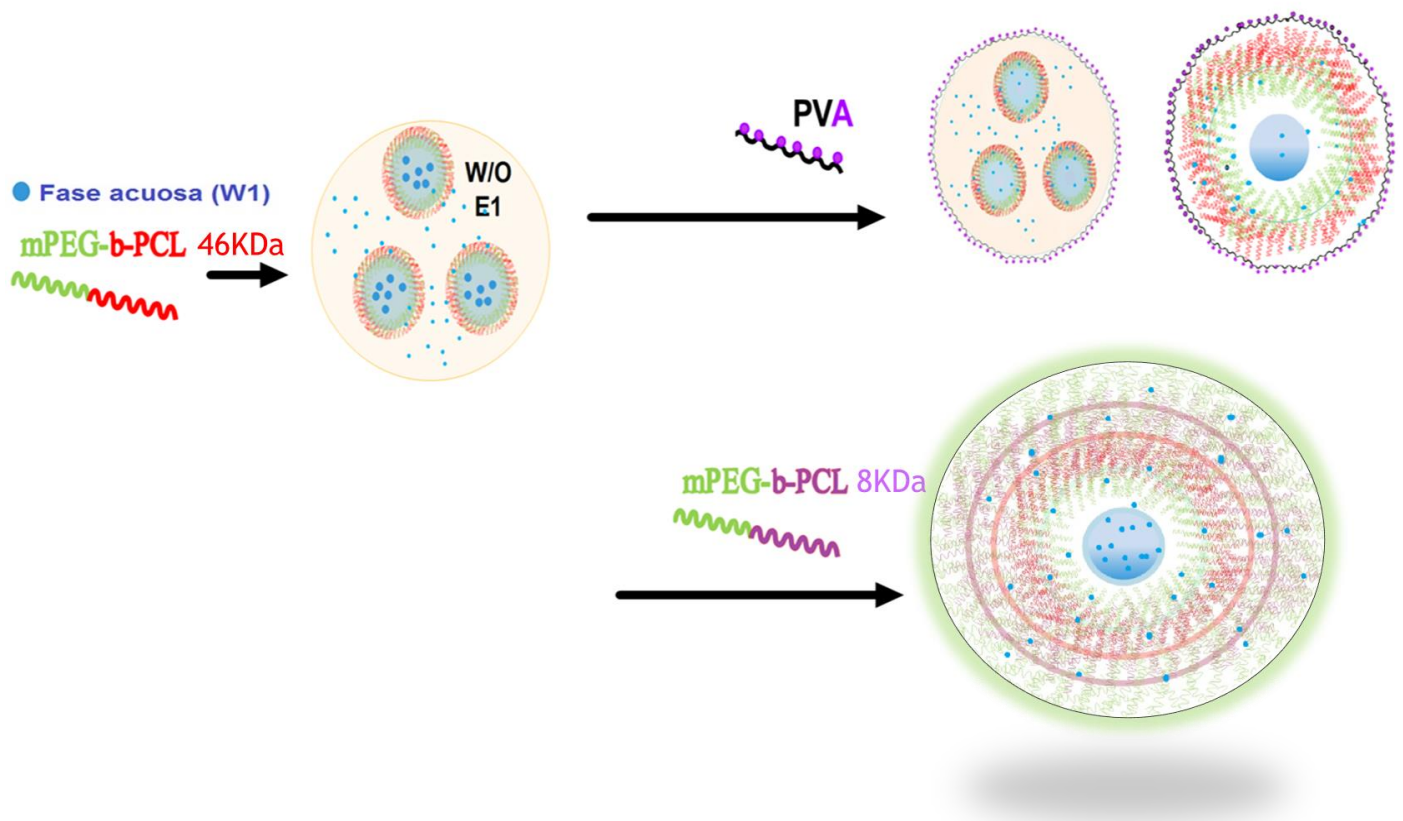
### **2.3.2. Sistemas nanoestructurados de mPEG-b-PCL ~46 KDa**

La elaboración de los sistemas nanoestructurados se llevó a cabo por una metodología DESE modificada; como estabilizantes, para minimizar el fenómeno de coalescencia y separación de fases, se emplearon mPEG-b-PCL de 8 kDa al 0.01 y 0.1 % y PVA al 2 %. Así, durante la segunda emulsión y posterior eliminación del solvente se evita la agregación de partículas, y con ello características no deseadas como tamaños de partícula grandes y altos índices de dispersión. Sin embargo, se debe tener en cuenta que muchas veces, aun siguiendo el procedimiento de doble emulsión, se podría estar obteniendo emulsiones simples debido a la inestabilidad de estos sistemas o al mismo procedimiento (Ding, Serra, Vandamme, Yu & Anton, 2018). Cabe aclarar que, para esta investigación, el estudio de estabilidad y formación efectiva de la doble emulsión no se tuvo en cuenta, pues se salía del alcance del trabajo, ya que solo se estudiaron los sistemas nanoestructurados obtenidos en la suspensión final, que corresponde a la dispersión de las nanopartículas en la fase acuosa 2.

Por otro lado, el estudio del mPEG-b-PCL de 8 KDa será publicado en la tesis “Síntesis de copolímeros dibloque biodegradables conjugados con biomoléculas como plataforma de administración de fármacos”, de la estudiante Angie Angarita, donde reportarán que la concentración micelar crítica del copolímero es de  $3.1 \cdot 10^{-7}$  moles/Litro. Partiendo de esa información, se plantea como hipótesis que el mecanismo por el que el mPEG-b-PCL de 8

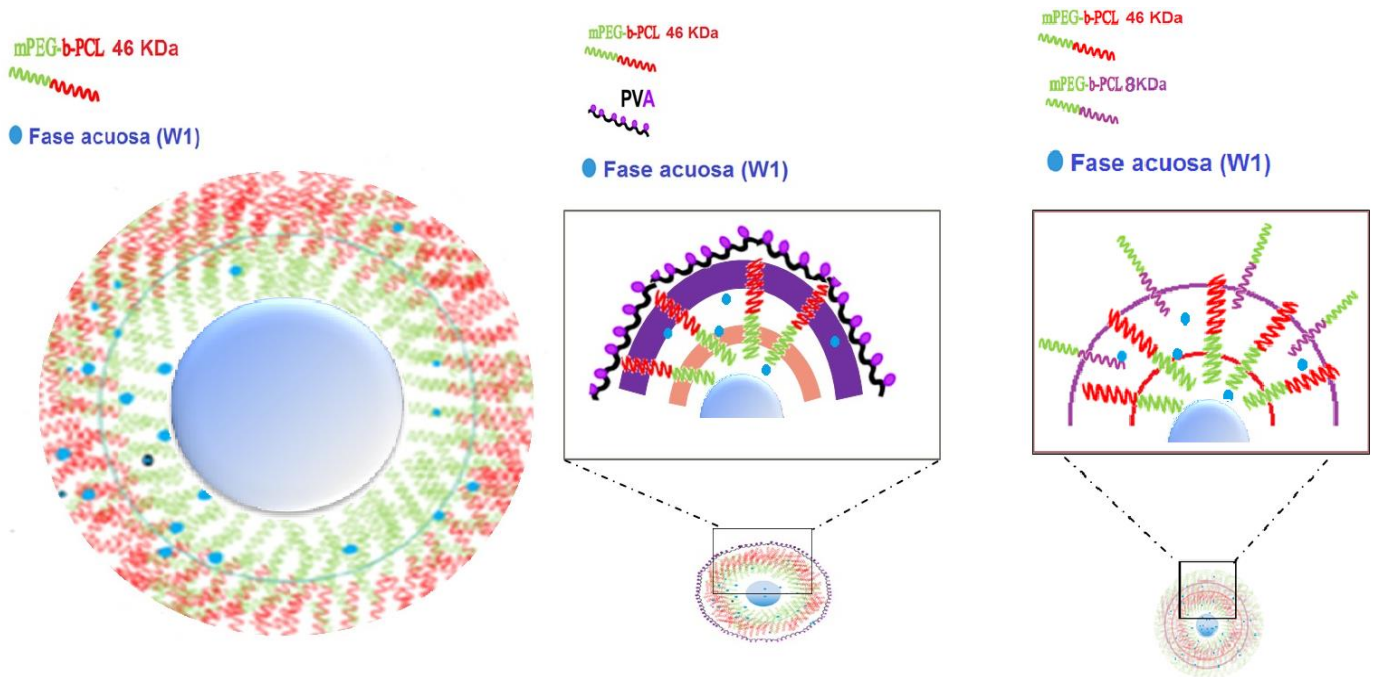
KDa estabiliza la emulsión es a través de posibles estructuras de tipo micelar; este tipo de estructuras micelares podrían estar ubicándose en la interfase de la fase orgánica y la fase acuosa 2. Estas estructuras micelares obtenidas en esta tesis tienen rangos de tamaño en número de 20-90 nm (medidas por DLS). Al ser solubles en la fase orgánica (DCM) pasarían por una fase de adsorción (Tolosa, 2016) inicial, seguida de una fase de solubilización y a una posterior saturación de esa fase orgánica, que podría generar un aumento aparente de la viscosidad interfacial (Tolosa, 2016), llegando a una insolubilización inducida por la evaporación del solvente orgánico y, de esa manera, la formación de las NPs. Con base en lo anterior, se plantea como posible hipótesis las estructuras mostradas en las Figuras (Figura 2-7, Figura 2-8 y Figura 2-9).

**Figura 2-7.** Esquema de la posible estructura de las NPs variando el tipo de estabilizante.



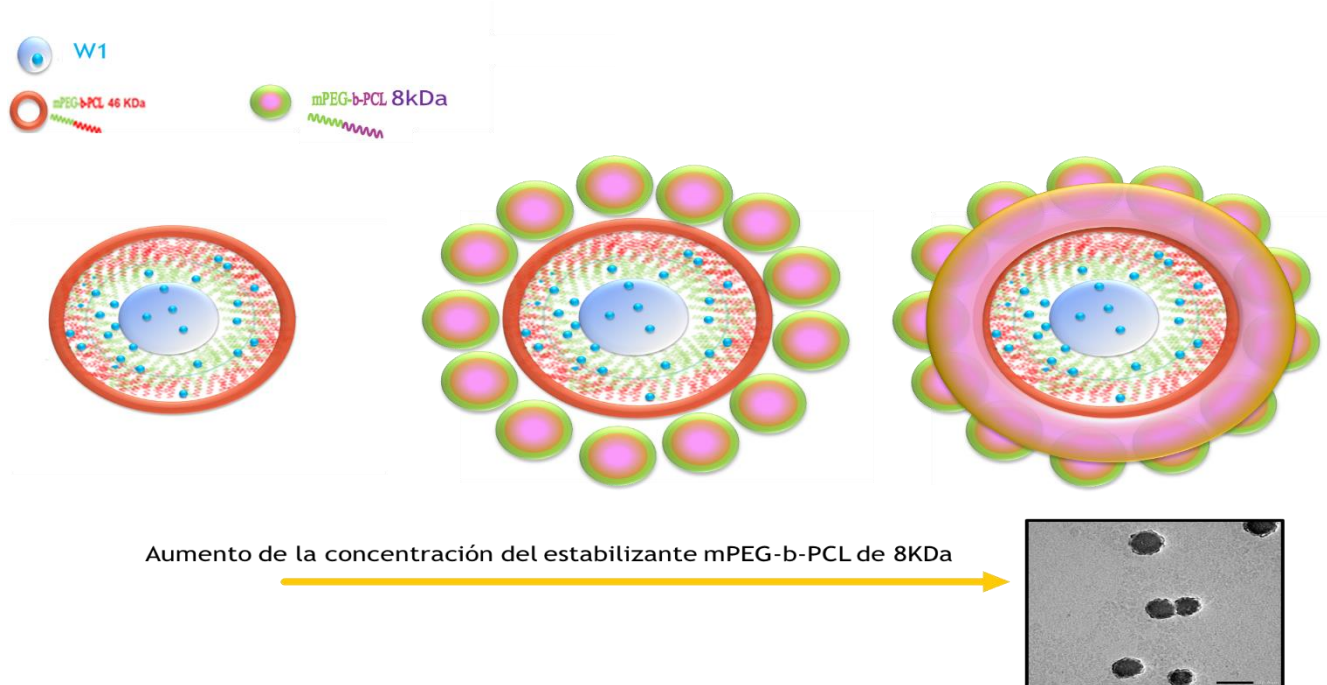
Fuente: Elaboración propia.

**Figura 2-8.** Esquema de la posible estructura ampliada de las NPs variando el tipo de estabilizante



Fuente: Elaboración propia.

**Figura 2-9.** Esquema de la posible estructura ampliada de las NPs variando el tipo de estabilizante



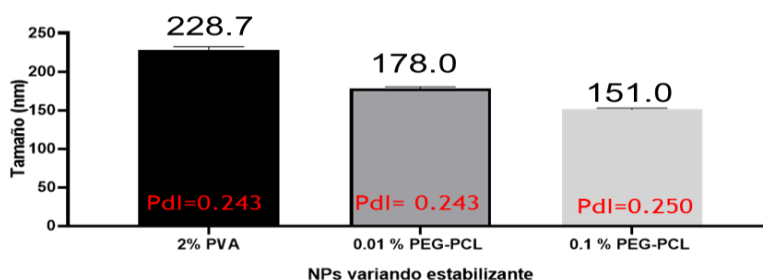
Fuente: Elaboración propia.

### Determinación del tamaño e índice de polidispersidad

El tamaño de las NPs vacías (ver Figura 2-10) se encuentran en un rango de 151-229 nm, por lo que se consideran sistemas nanoestructurados; asimismo, tienen índice de polidispersidad (Pdl) inferior a 0.300, lo cual sugiere la obtención de distribuciones moderadamente polidispersas (Martinez et al., 2017).

En la Figura 2-10 se observa que las NPs con diferentes estabilizantes tienen una diferencia estadísticamente significativa de tamaño ( $P < 0.05$ ). Esto se asocia a varias razones, una de las principales es la diferencia en el mecanismo para estabilizar las emulsiones. Por su parte, el PVA al 2 % al ser un hidrocoloide, forma una capa multimolecular alrededor de las partículas lo que incrementa la viscosidad de la fase acuosa en la que se forma la segunda emulsión, lo que posiblemente dificulta la reducción del tamaño de gota en la doble emulsión (Ibraheem, Iqbal, Agusti, Fessi & Elaissari, 2014); por otra parte, su grado de hidrólisis 86.7-88.7 %, hace que los posibles grupos acetatos residuales puedan generar segmentos de menor polaridad que podrían tener afinidad con la fase orgánica. A diferencia de esto, debido a su naturaleza química la estabilización con mPEG-b-PCL de 8 KDa podría estar asociada a la disminución de la tensión interfacial, favoreciendo la división de las gotículas al aumentar su concentración y, por lo tanto, generando menores tamaños de NPs.

**Figura 2-10.** Resultados del tamaño de las nanopartículas vacías al variar el tipo y concentración del agente estabilizante.



Resultados promedio de tamaño de partícula y promedio de índices de polidispersidad (Pdl) obtenidos para los diferentes sistemas nanoestructurados, variando el agente estabilizante y la concentración en mPEG-b-PCL de 8 KDa ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=5$ ).

Otra de las razones de este comportamiento se debe a la mayor afinidad del mPEG-b-PCL de 8KDa por el polímero y solvente orgánico (Baena Aristizábal et al., 2016). Su interacción con la fase orgánica va a ser mejor durante la segunda emulsificación, generando una capa de estabilizante alrededor de la gotícula (fase acuosa 1/ fase orgánica) (Baena Aristizábal et al., 2016). Si el grosor de esa capa es adecuado, permitirá una fácil evaporación del solvente y formación de las NPs.

Cabe notar que el PVA tiene menor afinidad por la fase orgánica, aumentando el grosor de la capa de estabilizante, lo cual dificulta la evaporación del solvente y evita la precipitación del polímero, induciendo a la formación de agregados de partículas, y aumentando el tamaño de las mismas (Baena Aristizábal et al., 2016).

Por otro lado, las diferencias de los tamaños de partículas entre las NPs que usan el mismo estabilizante mPEG-b-PCL 8 KDa y varía la concentración puede ser debido a la afinidad del PCL por la fase orgánica, así al aumentar la concentración es posible que el estabilizante mPEG-b-PCL de 8 KDa esté saturando la interfase de la segunda emulsión, lo que genera las diferencias de tamaños. Este comportamiento sugiere que al aumentar la concentración del estabilizante mPEG-b-PCL 8 KDa de 0.01 a 0.1 %, este copolímero disminuye la tensión interfacial, de manera que las gotas iniciales de la emulsión 1 se vuelven más pequeñas en la emulsión 2, lo que posiblemente sustenta el por qué al aumentar la concentración del copolímero mPEG-b-PCL 8 KDa, el tamaño de la gota disminuya, lo que da como resultado partículas más pequeñas tras la evaporación del DCM (Tolosa, 2016).

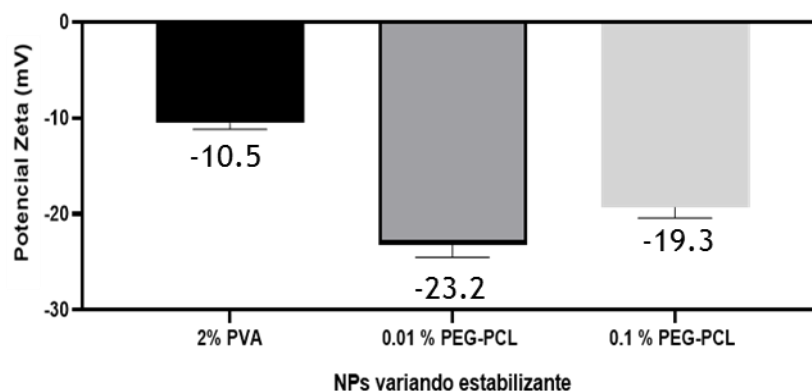
### **Potencial electrocinético (potencial $\zeta$ )**

Es importante aclarar que el potencial  $\zeta$  se puede ver afectado no solo por las propiedades de las nanopartículas, sino también por la naturaleza de la solución, el pH, la fuerza iónica, cambios en la composición de la interfase NP-agua, incluso factores experimentales difíciles de controlar, como cantidad de nanopartículas en el medio de dispersión, entre otros (Bhattacharjee, 2016; Gumustas, Sengel-turk, & Gumustas, 2017). El valor medido corresponde a la diferencia de potencial entre la doble capa eléctrica de las partículas coloidales electroforéticamente móviles y la capa de corte o dispersante a su alrededor en el plano de deslizamiento (Bhattacharjee, 2016). A continuación, se analizan los resultados

obtenidos de esta medición para las diferentes NPs, con el propósito de obtener información sobre su posible estabilidad a través de posibles fuerzas repulsivas electrostáticas.

En la Figura 2-11 se observan los valores del potencial  $\zeta$  ( $P < 0.05$ ) para las tres NPs cambiando el tipo de estabilizante, y en el caso del mPEG-b-PCL variando su concentración, los cuales son inferiores a  $-25$  mV, por lo que se descarta la posibilidad de una estabilidad electrostática. Sin embargo, estos valores se deben a la contribución del segmento del PEG, al que se le atribuye posible adsorción de iones, por lo tanto, la densidad de la cubierta hidrofílica debida a la concentración del PEG y PVA en las NPs hacen que los valores de potencial  $\zeta$  disminuyan, este es el caso del PVA al 2 % y la diferencia entre el 0.01 % y 0.1 % de mPEG-b-PCL 8 Kda (Li et al., 2009).

**Figura 2-11.** Potencial Z de las nanopartículas vacías variando el tipo y concentración del estabilizante.



Resultados promedio del potencial  $\zeta$  ( $p\zeta$ ) obtenidos para los diferentes sistemas nanoestructurados variando el agente estabilizante y la concentración de mPEG-b-PCL ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=5$ ).

Estos resultados son debidos a que el segmento mayoritario del copolímero de mPEG-b-PCL 8 KDa es el PEG de 5KDa. Así, al aumentar la concentración del copolímero, aumenta también la proporción de PEG en comparación con la policaprolactona, por lo tanto, y este genera cambios en la magnitud, disminuyendo el potencial  $\zeta$ . Adicionalmente, hay que considerar que durante el proceso de evaporación el PEG va a estar ubicado en la interfase agua- diclorometano, y al evaporar el solvente este segmento queda expuesto en la superficie, disminuyendo así el potencial  $\zeta$ . No se descarta, que las variaciones en la

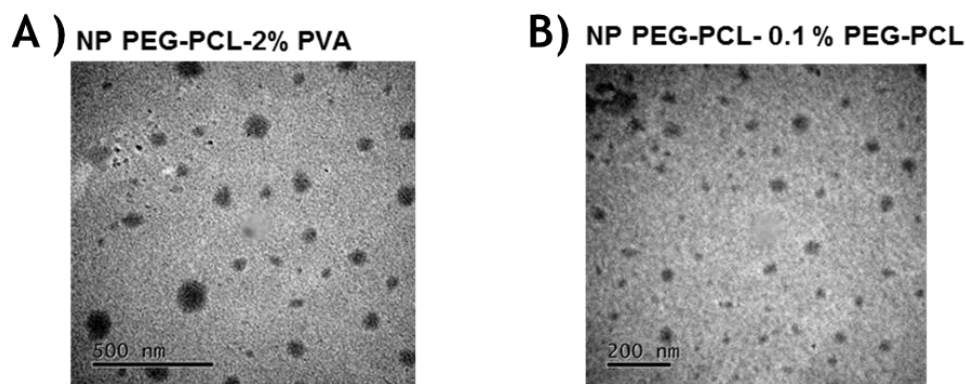
magnitud del potencial zeta para estas NPs puedan ser debidas también a cambios en el medio de dispersión, no controlados en el estudio.

Por otro lado, aunque la magnitud de valores de potencial  $\zeta$  no sean mayores o iguales a  $\pm 30$  mV, las NPs se mantienen en dispersión, esto es debido a que el PEG y PVA son polímeros de gran tamaño molecular, que influyen en la estabilidad estérica, promoviendo la repulsión de las NPs, debido a que interfieren por su tamaño en las interacciones de las fuerzas de atracción de Van der Waals, impidiendo así la agregación (Lourenco, Teixeira, Simões & Gaspar, 1996; Selvamani, 2019).

### Morfología

Para el estudio de la morfología se eligieron las NPs estabilizadas con PVA al 2 % y las estabilizadas con mPEG-b-PCL de 8 KDa al 0.1 %. Las imágenes TEM para las NPs se observan en la Figura 2-12, estas poseen una forma esférica.

**Figura 2-12.** Imagen TEM de NPs seleccionadas



**A)** mPEG-b-PCL ~46 KDa - 2 % PVA (500nm) y **B)** mPEG-b-PCL ~46 KDa - 0.1 % mPEG-b-PCL 8 KDa (200 nm)

En la Figura 2-12 se observan dos zonas en las NPs esféricas. Una zona más oscura correspondiente a una posible cavidad o núcleo y otra zona más clara que rodea esa cavidad o núcleo, esto posiblemente es debido a que se forman dos dominios de diferente composición. Por otro lado, los tamaños observados por TEM son inferiores a 250 nm, coincidiendo aproximadamente con los encontrados por DLS; hay que tener en cuenta que

estos últimos expresan diámetros de partícula hidrodinámicos que serán más grandes comparados con los mostrados por TEM.

## 2.4. Conclusiones

- El copolímero mPEG-b-PCL sintetizado (el cual fue comprobada su síntesis por IR y  $^1\text{H-RMN}$ ), de peso molecular de  $\sim 46$  KDa, con una entalpía de cristalización de  $63.48 \text{ Jg}^{-1}$ , una entalpía de fusión de  $-62.55 \text{ Jg}^{-1}$ , un grado de polimerización de  $\sim 387$  para el segmento de PCL y de  $\sim 47$  para el segmento de PEG, dio lugar a la obtención de sistemas nanoestructurados de tipo nanopartículas por el método DESEm; estas fueron elaboradas a las condiciones previamente establecidas, haciendo uso de estabilizantes como polivinilalcohol (PVA) y mPEG-b-PCL de 8 KDa, demostrando que se obtienen partículas en el rango nanométrico, de forma esférica y con un potencial  $\zeta$  de -10 a -23.
- El empleo de PVA como estabilizante lleva a obtener tamaños de partículas más grandes y valores de potencial  $\zeta$  menores, en comparación con el estabilizante mPEG-b-PCL de 8 KDa, esto es debido a la diferencia en los mecanismos para estabilizar las emulsiones por los que ellos actúan relacionados con su naturaleza química. El PVA al ser un hidrocoloide ejerce un efecto de pantalla, dado por la formación de una capa multimolecular alrededor de las partículas, mientras el mPEG-b-PCL de 8 KDa, probablemente ejerce un efecto principal en la disminución de la tensión interfacial.
- La variación en la concentración de mPEG-b-PCL de 8 KDa influye en los valores de tamaño de partícula, siendo ligeramente más pequeños al aumentar su concentración y de manera contraria, una disminución de la magnitud del potencial con el aumento de esta. Esto está relacionado con el posible mecanismo de reducción de tensión interfacial y con la proporción de segmentos de PEG presentes en este estabilizante.



## **3. Nanopartículas cargadas con extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana***

### **3.1. Introducción**

Los extractos vegetales son opciones terapéuticas versátiles para el tratamiento de diferentes enfermedades. Al ser sistemas complejos con diversos componentes tienen un modo de acción favorecido por la sinergia que se presenta entre ellos (Baena Aristizábal, 2015; Benzie & Wachtel-Galor, 2011). Sin embargo, al ser un sistema multicomponente es necesario asegurar que no exista una alta variabilidad en su composición, de manera que se mantenga la actividad farmacológica de interés. Esto se logra teniendo un extracto estandarizado, lo que implica un control sobre las diversas variables asociadas a su obtención (Baena Aristizábal, 2015).

La elaboración del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* se realizó siguiendo la metodología planteada previamente en otros trabajos de investigación del grupo, (Baena Aristizábal, 2015; Bernal, 2016), que se basó en estudios físicos, químicos y de actividad biológica por los cuales estandarizaron el extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*. Aunque en trabajos previos (Bernal et al., 2018) se determinaron los marcadores farmacológicos del extracto en diclorometano, en este extracto etanólico de todo el fruto dichos marcadores se encuentran muy diluidos para ser detectados, por lo que la opción fue emplear otros compuestos químicos presentes en el extracto, como marcadores analíticos (Bernal, 2016).

Para el caso particular de la incorporación de extractos de materiales herbales en nanopartículas poliméricas, se busca que estos conserven su actividad farmacológica una

vez liberados. Debido a que las NPs pueden mejorar la biodisponibilidad (Date, Hanes & Ensign, 2016), proteger a los extractos de la rápida degradación o depuración (Wilczewska et al., 2012) y favorecer la estabilidad (Soppimath et al., 2001) son, por lo tanto, una posible solución a la inestabilidad de los extractos a nivel fisiológico, ya que protegen a las sustancias activas de la posible degradación enzimática y del pH fisiológico.

En el caso específico del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*, ya que es un sistema multicomponente de naturaleza heterogénea que presenta componentes hidrófilos y lipófilos, su solubilidad es compleja. Por un lado (Bernal, 2016) reporta componentes como ésteres de sacarosa (Peruviosas) en el extracto fraccionado en diclorometano, los que demostraron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima alfa amilasa, con valores de inhibición similares a los observados para la acarbosa; además, se ha reportado que otros componentes que se pueden encontrar en los frutos de *Physalis peruviana* como glucósidos, vitaminas hidro y liposolubles, witanólidos, alcaloides, ésteres, ésteres de sacarosa, azúcares, entre otros múltiples componentes (Bernal, 2016; Olivares, 2017). En esta parte del trabajo, se utilizaron los materiales y la metodología empleada en el capítulo anterior (DESEm), ya que es adecuada para encapsular compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos como es la composición de este extracto.

En este capítulo se aborda la obtención del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* mediante percolación, su caracterización por índice de refracción y <sup>1</sup>H-RMN y su posterior carga en sistemas nanoestructurados. Estos sistemas se caracterizaron fisicoquímicamente y en cuanto a su comportamiento de liberación, empleando metodologías complementarias, tanto analíticas como de evaluación de su actividad, que permitieran evaluar a las nanopartículas cargadas con un extracto etanólico de *Physalis peruviana*.

## 3.2. Materiales y Métodos

### 3.2.1 Reactivos y equipos

#### 3.2.1.1 Obtención del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*

Para la elaboración del extracto se emplearon 7 kg de frutos de *Physalis peruviana* (Pp), comprados en la plaza de mercado de Paloquemao (Bogotá, Cundinamarca). Como solvente de extracción se utilizaron 14 L de etanol al 96 % (CIACOMEQ S.A.S., cod. prod. 2-04-112). Para el estudio del espectro de resonancia magnética nuclear se utilizó el extracto de *Physalis peruviana* y como solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>). Para el ensayo *in vitro* de inhibición de alfa amilasa se utilizó p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (pNPG) Sigma/Aldrich N1377, acarbosa Sigma/Aldrich A8980, alfa amilasa de páncreas porcino (PPA) Sigma/Aldrich A3176, almidón azul Sigma/Aldrich S7776.

Para la elaboración del extracto se utilizaron los siguientes equipos: estufa de circulación de aire (Stokes), refractómetro Mettler Toledo portable (lab TM), licuadora (Barboss MP Vita- Mix), balanza Ohaus (modelo PA 3102, sensibilidad 3100 g), percolador, rotaevaporador (Hei-VAP Advantage ML/G3 P/N 562-01300-00, Alemania), horno de vacío (Aceq HRV-1016, Colombia) y balanza analítica (RADWAG AS 60/220.R2). Para la caracterización se utilizó un espectrómetro RMN (Bruker Ascend 600, Suiza). Para lo correspondiente al ensayo *in vitro*, se utilizó un lector de microplacas espectrofotómetro Berthold TriStar<sup>2</sup> S LB 942 Multimode Reader.

#### 3.2.1.2. Elaboración de las nanopartículas cargadas con extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*

Para ello se emplearon el polímero mPEG-b-PCL ~ 46 KDa y el estabilizante mPEG-b-PCL 8 KDa, descritos en el capítulo 2; diclorometano Merck (Alemania, lote: K47623150610); agua grado HPLC (sistema de purificación de agua Direct-Q® (EU)); polivinilalcohol Mowiol® 4-88 Sigma Aldrich (Alemania, lote: STBH0667); papel filtro 5-10  $\mu$ m Boeco

(Alemania, lote: 09-040); membrana de diálisis Zellultrans MWCO de 3500 y el extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*.

Para la obtención del sistema se utilizó un homogeneizador de alta velocidad, IKA® Ultra-Turrax® T18 DS1, vástago grueso S18N-19G, vástago delgado S18N-10G, Alemania; plancha de agitación multipunto, IKA® RO 10 PS1, Alemania; balanza analítica, Ohaus® Pioneer PA214, E.U; refrigerador, Challenger CR420, Colombia; centrífuga, Thermo Scientific Heraeus® Megafuge® 16, rotor Highconic®II, Alemania; liofilizador, CHRIST Beta 1-8 LDplus, Alemania.

### 3.2.1.3. Caracterización

Para la caracterización se utilizaron las siguientes metodologías y equipos: espectroscopia infrarroja (IR) (espectrómetro FT-IR, Shimadzu® IRAffinity-1, Japón), calorimetría diferencial de barrido (DSC, Mettler Toledo DSC 1, Suiza), dispersión dinámica de luz (Malvern Zetasizer Nano – ZS, Reino Unido), microscopia electrónica de transmisión (microscopio electrónico de transmisión, TEM, MARCA JEOL JEM-100S, Japón).

Los datos obtenidos en la caracterización de tamaño, Pdl y potencial  $\zeta$  de las nanopartículas fueron analizados estadísticamente a través del análisis de la varianza (ANOVA) usando el software GraphPad Prism. Las diferencias significativas fueron determinadas considerando un  $p < 0.05$  como significativo. En todos los experimentos los resultados se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar.

### 3.2.1.4. Liberación de las NPs y ensayo de inhibición de la alfa amilasa

Para elaborar el buffer pH 6.5 se utilizó 16.8 g de fosfato de potasio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (A1-23) y 10.8 g de fosfato de sodio dibásico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Chemi (lote:160331-512) en 2 L de agua destilada. También se emplearon viales herméticos.

Para el ensayo *in vitro* de inhibición de alfa amilasa se utilizó p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (pNPG) Sigma/Aldrich N1377, acarbosa Sigma/Aldrich A8980, alfa amilasa de páncreas porcino (PPA) Sigma/Aldrich A3176 y almidón azul Sigma/Aldrich S7776.

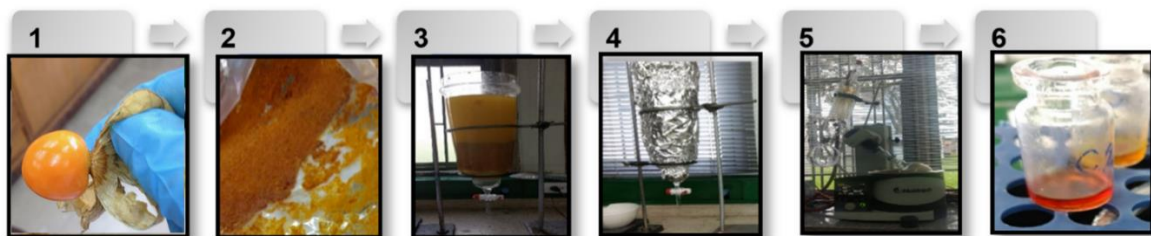
Para la liberación de las NPs se utilizó un baño termostático (LAUDA ALPHA A6), un agitador magnético analógico múltiple RO 10, IKA® y una balanza analítica (RADWAG AS 60/220.R2). Para la evaluación de la actividad de inhibición de la alfa amilasa del extracto etanólico de *Physalis peruviana*, una vez liberado de las NPs, se utilizó un lector de microplacas espectrofotómetro Berthold TriStar<sup>2</sup> S LB 942 Multimode Reader.

## 3.2.2. Metodología

### 3.2.2.1. Elaboración del extracto de frutos de *Physalis peruviana*

Se siguió la metodología ya estandarizada (Figura 3-1), descrita en los trabajos previos del grupo de investigación TECPRONA (Baena Aristizábal, 2015; Bernal, 2016) de la siguiente manera :

**Figura 3-1.** Pasos generales para la elaboración del extracto etanólico a partir de los frutos de *Physalis peruviana*.



1) Retiro del cáliz, clasificación del fruto y lavado; 2) licuado y secado; 3) trituración del material, humectación y extracción; 4) ciclos de extracción por percolación; 5) concentración por rotaevaporación; 6) caracterización del extracto.

- 1) Se retiró el cáliz de los frutos; se seleccionaron las bayas como maduras, pintonas, verdes, abiertas, dañadas (clasificación 3 a 6 según la tabla de color de la NTC 4580, ver Anexo C). Estas fueron lavadas con agua potable y secadas.
- 2) Se licuaron los frutos maduros y pintones, para un total de 5 kg, guardando una relación 5:1 de gramos de fruta y etanol al 96 %. Este licuado se distribuyó en bandejas forradas con película de polietileno calibre 3, y se secó a una temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una estufa de circulación de aire durante 24 horas (hasta peso constante del material seco).
- 3) El material seco se trituró inmediatamente hasta pulverización en la licuadora, en dos ciclos, a velocidad cinco en la escala del equipo y con una carga de material correspondiente a  $1/3$  del volumen del vaso. De esa manera, 500 g de material seco fueron colocados en un mortero de porcelana; para su humectación se adicionaron 400 ml de etanol que fueron incorporados hasta lograr un material de aspecto pastoso. El proceso se repitió con todo el material pulverizado (937 g), que posteriormente fue colocado en el percolador para poder dar inicio al proceso de extracción.
- 4) El proceso de extracción se llevó a cabo por percolación. Para ello se emplearon dos percoladores de vidrio de capacidad de 5 y 2 L, recubiertos con papel aluminio para favorecer la estabilidad del extracto y garantizando una relación droga: solvente de 1:15. Luego de 24 horas, se abrió la llave del percolador a una velocidad de goteo medio de aproximadamente 150 gotas/min. El proceso de extracción se llevó a cabo por cuatro días, partiendo de 937 g de sólidos pulverizados previamente humectados, a los cuales se les realizaron cuatro pasadas de solvente para un total aproximado de 14 L de etanol al 96 % (relación droga: solvente 1:15).
- 5) Una vez recolectado el extracto se concentró a presión reducida a una temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , velocidad de agitación de 100 rpm y presión de 100 mbar, hasta lograr un índice de refracción de 1.42, sin corrección de lectura por temperatura y cuyas mediciones fueron realizadas por triplicado. Seguido de esto, se evaluó el contenido de sólidos totales del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* obtenido. Se pesó exactamente una cantidad aproximada de 1 g de extracto en un recipiente previamente tarado y se evaporó el contenido de etanol de la muestra colocando los recipientes sobre un baño maría durante 30 min. Las muestras sin

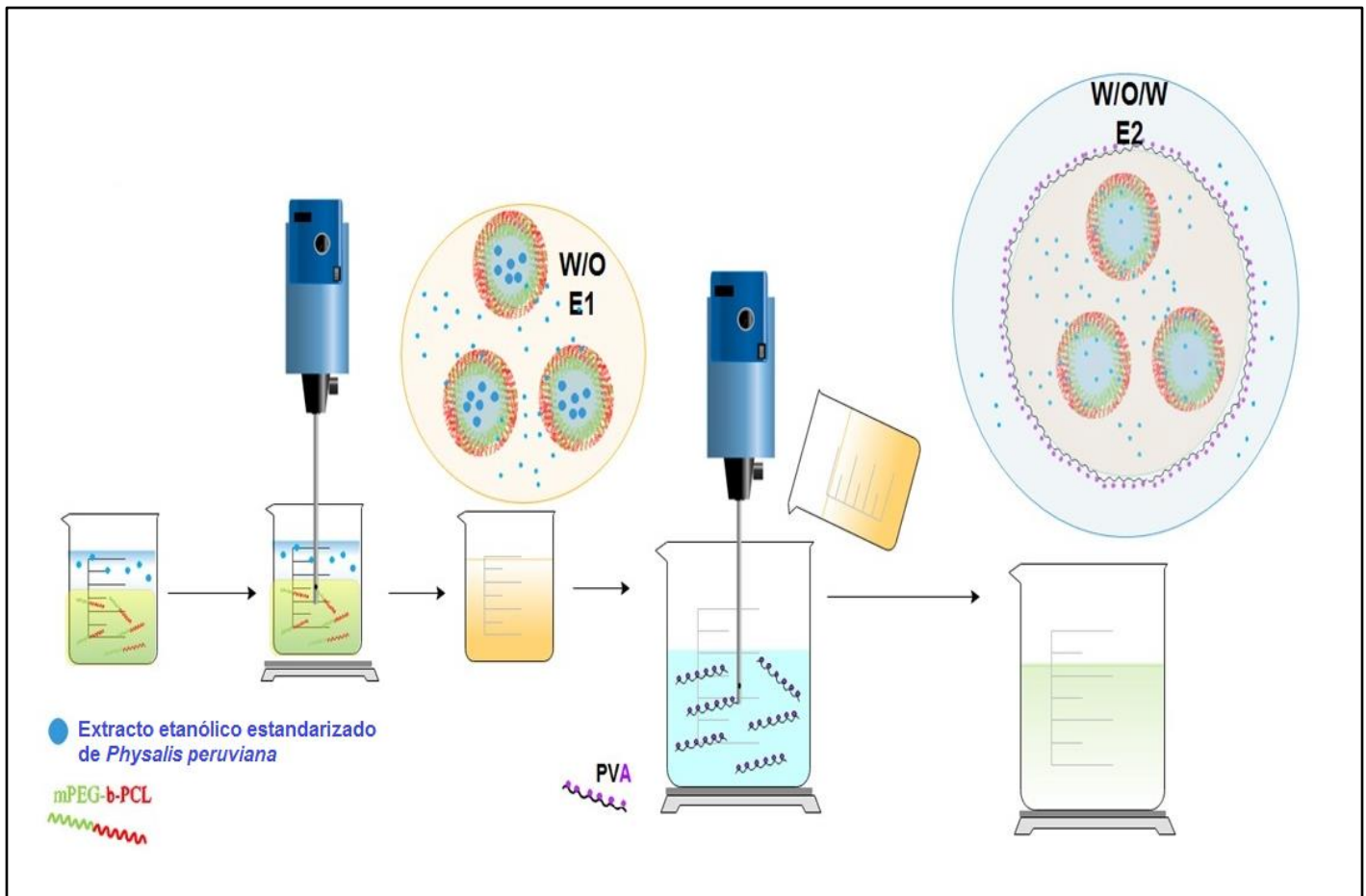
etanol fueron llevadas a una estufa al vacío a 70 °C, hasta un peso constante (variación no mayor a 5 mg). El contenido de sólidos totales se estimó utilizando la Ecuación 11:

$$\text{Porcentaje de sólidos totales} = \frac{\text{Peso final de muestra}}{\text{Peso de muestra inicial}} * 100 \quad (\text{Ecuación 11})$$

### **3.2.2.2. Elaboración de sistemas nanoestructurados con el extracto de frutos de *Physalis peruviana***

Para la elaboración de las NPs que contenían como sustancia activa el extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* se siguió un procedimiento similar (DESEm) al empleado en el capítulo 2 para la elaboración de las nanopartículas vacías, cambiando la fase acuosa 1 (W1) por el extracto etanólico de *Physalis peruviana* en agua desionizada (W1-Pp) a una concentración de 15 mg/mL (Figura 3-2).

**Figura 3-2.** Representación esquemática de la metodología de obtención de los sistemas nanoestructurados que contienen el extracto etanólico de los frutos de *Physalis peruviana*.



Para el esquema se manejan las siguientes convenciones: fase orgánica (color verde vivo con el copolímero de mPEG-b-PCL de ~ 46 KDa); fase acuosa (W1-Pp) color azul con puntos azules, primera emulsión W1/O color café claro (E1); segunda fase acuosa con estabilizante\* (W2), la cual corresponde a una solución de color agua marina con el estabilizante utilizado para el correspondiente ejemplo PVA; doble emulsión obtenida (W/O/W) (E2), color verde tenue pastel; los círculos son: una ampliación de la emulsión (W/O) círculo1 color café claro; círculo 2 ampliación de la segunda emulsión (W/O/W). (\*) se refiere a los estabilizantes escogidos en esta investigación, y a su correspondiente concentración así serán: PVA 2% O mPEG-b-PCL 8.0 KDa, a diferentes concentraciones 0.1, 0.05, 0.03, 0.01 %. Fuente: Elaboración propia.

La dispersión madre del extracto etanólico de una concentración de 15 mg/mL y las emulsiones 1 y 2, se muestran en la Figura 3-3 (I, II, III). Para ello se pesaron 750 mg del extracto, los cuales fueron adicionados gota a gota a 50 mL de agua desionizada, agitando con el homogeneizador a 13 000 rpm por 4 min (Figura 3-3-I), para así obtener la fase



acuosa con el extracto (W1-Pp) a una concentración final de 15mg/mL, como se observa en la Figura 3-3-II.

**Figura 3-3.** Fotos del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* y de la nanoemulsión final.

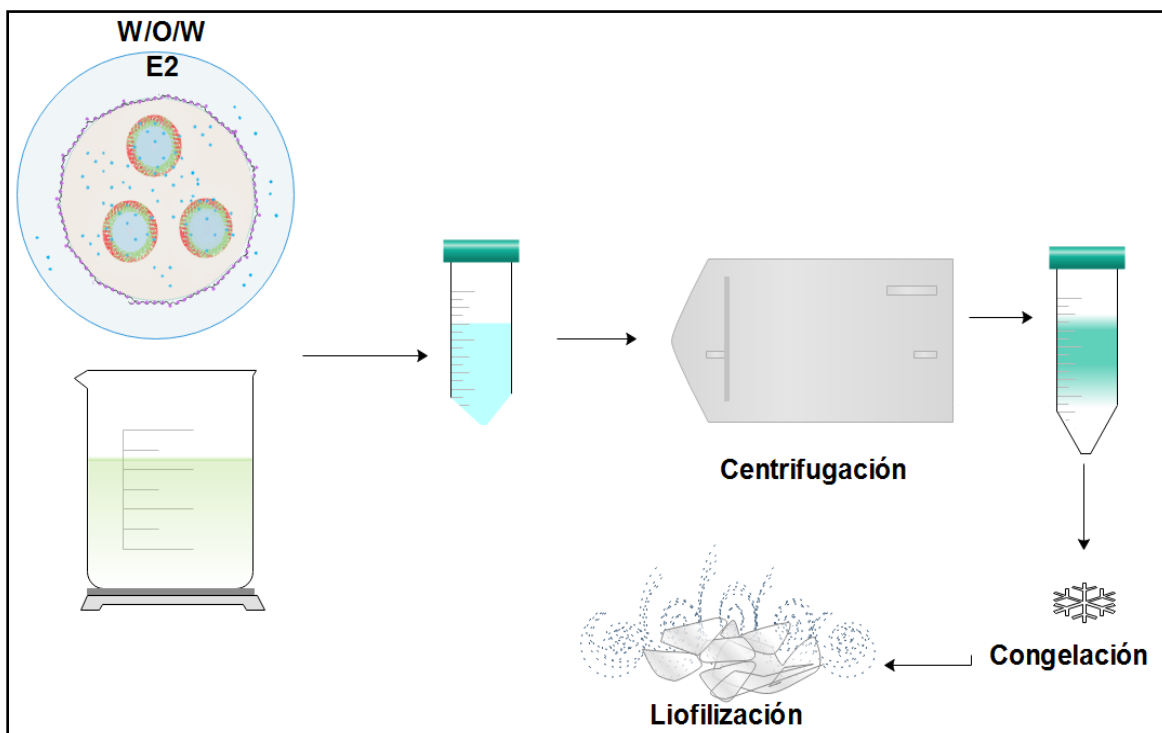


I: Proceso inicial de dispersión del extracto en la fase acuosa; II: Extracto disperso; III: Segunda emulsión.

Seguido a esto, la primera emulsión (W/O) se obtuvo adicionando gota a gota 2 mL de la fase acuosa, explicada anteriormente, sobre 10 mL de la fase orgánica (10 mg/mL del polímero mPEG-b-PCL ~ 46 KDa en diclorometano (O)), a 11600 rpm por 4 min. Una vez formada la primera emulsión, esta se adicionó gota a gota a la fase acuosa 2 (W2), que contiene el estabilizante (PVA 2 % o mPEG-b-PCL 8.0 KDa, a diferentes concentraciones 0.1, 0.05, 0.03, 0.01 %) a 13000 rpm por 4 min, como se observa en la Figura 3-3-III. Una vez obtenida la nanoemulsión (W1/O/W2) se evaporó el solvente orgánico (diclorometano) por medio de agitación magnética a 300 rpm por 24 horas, en una plancha multipunto, a temperatura ambiente. Una vez evaporado el solvente se realizó la caracterización inicial de tamaño de partícula y potencial  $\zeta$  de las nanopartículas cargadas con el extracto de frutos de *Physalis peruviana* (NPs-Pp), siguiendo la misma metodología empleada para las NPs vacías. Para los estudios posteriores se realizó la purificación y liofilización, como se observa en la Figura 3-4, con el fin de brindar más estabilidad al sistema nanoestructurado y evitar migración de la sustancia activa encapsulada hacia la superficie o hacia el medio de dispersión; para este fin se centrifugaron las Nps-Pp a 8500 rpm durante una hora por tres ciclos iniciales, recolectando los pellets y lavándolos con agua desionizada, para asegurar que no se tuviera sustancia activa no encapsulada, polímeros o estabilizantes libres, que pudieran afectar los resultados de encapsulación y carga del fármaco. Una vez

recolectados todos los pellets de NPs-Pp, estos fueron suspendidos en agua desionizada, congelados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  y liofilizados para obtener las NPs-Pp sólidas.

**Figura 3-4.** Representación esquemática la metodología de purificación de las nanopartículas.



Fuente: Elaboración propia.

### 3.2.2.3. Caracterización de las NPs-Pp

De manera similar a lo realizado con las NPs vacías, se caracterizó el tamaño de partícula y potencial  $\zeta$  por DLS, la evaluación de la morfología por TEM; adicionalmente, las interacciones entre el polímero y el extracto fueron evaluadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) y espectrofotometría infrarroja (FT-IR).

#### Distribución de tamaño de partícula, potencial $\zeta$ y morfología

La medición se llevó a cabo usando la técnica de dispersión dinámica de luz. Para ello, se tomó  $100\text{ }\mu\text{L}$  de la dispersión sin liofilizar y se diluyó en  $1\text{ mL}$  de agua destilada en una celda de plástico (DTS0012), para manejar una concentración apropiada para la medición. La medición se llevó a cabo con un ángulo de dispersión de  $173^{\circ}$ , a una temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , haciendo 10 corridas, con una duración de  $10\text{ s}$  cada una. El tamaño de partícula y

el índice de polidispersidad se calcularon teniendo en cuenta el promedio de las mediciones, y se determinó su desviación estándar.

Para medir el potencial  $\zeta$  se tomó 100  $\mu\text{L}$  de la nanosuspensión y se agregaron 900  $\mu\text{L}$  de agua destilada en una celda “dip” (Malvern ZEN1002, Reino Unido). La medición se llevó a cabo a 25 °C, haciendo 10 corridas, con un retraso entre mediciones de 30 s. El potencial  $\zeta$  se calculó usando un  $f(Ka)$  de 1.5 (modelo Smoluchowski), realizando el promedio de 5 mediciones, y se determinó la desviación estándar. Los datos fueron tratados con el software Zetasizer v7.11.

La evaluación de la morfología se llevó a cabo por TEM, siguiendo la misma metodología explicada en el capítulo 2. Se tomaron fotografías de aumento  $\times 1\mu\text{m}$ ,  $\times 0.5\mu\text{m}$ ,  $\times 200\text{ nm}$  y  $\times 100\text{ nm}$ . Las imágenes fueron procesadas por el software Gatan Microscopy Suite® versión 2.11.1404.0

### **FT-IR**

Para determinar si las Nps quedaron cargadas con el extracto de frutos de *Physalis peruviana* y si habían posibles cambios estructurales del polímero, se evaluó cualitativamente por FT-IR. Los espectros de FT-IR por transmisión, fueron tomados empleando un disco de KBr, para ello, aproximadamente 5 mg de Nps se disolvieron en 2 mL de  $\text{CHCl}_3$ , para lo cual la dispersión obtenida se distribuyó homogéneamente sobre el disco de KBr para ser leída en el espectrofotómetro FT-IR (Shimadzu® IRAffinity-1, con accesorio HATR 10, Japón), en un rango de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$  con resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$  y acumulación de 32 scans, realizando antes de cada lectura un background (Shuai et al., 2004).

### **DSC**

Se determinó el evento térmico correspondiente a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de las NPs-Pp por DSC en un rango de -60-260 °C. Se evaluaron los cambios en la temperatura de fusión con respecto a su composición; para ello se empleó un método con atmósfera de  $\text{N}_2$  con flujo 50 L/min. Inicialmente se enfrió la muestra desde 25 °C hasta -60 °C a 10 °C/min, seguido por una isoterma a -60 °C durante 10 min. Finalmente, se calentó de 10

°C/min hasta 260 °C, a la misma rampa de calentamiento. Los datos fueron procesados con el software STARe Evaluation.

#### **3.2.2.4. Seguimiento del ácido cítrico del extracto etanólico de *Physalis peruviana* libre y cargado en las NP-Pp por resonancia magnética nuclear (RMN)**

Es importante escoger un marcador del extracto para poder hacer un correcto seguimiento de este en el proceso de liberación a partir de las NPs; sin embargo, al ser un sistema complejo el seguimiento o trazabilidad se dificulta. La metodología propuesta por Bernal (2016), realizada al interior del grupo de investigación, se fundamentó en el seguimiento a marcadores analíticos, fructosa y glucosa, mediante HPLC con detector de índice de refracción, teniendo en cuenta la alta proporción de azúcares que hay en el fruto. Aunque también se habían determinado los marcadores terapéuticos, peruviosas, estos se encuentran en muy baja proporción en el extracto etanólico. Sin embargo, en este trabajo no fue posible hacer el seguimiento a la fructosa y glucosa, debido a que no se contaba con el equipo. Por esta razón, se optó por caracterizar un componente como el ácido cítrico, el cual se identifica fácilmente en los espectros de RMN del extracto.

Para obtener los espectros de RMN se tomaron aproximadamente 20 mg del extracto etanólico de *Physalis peruviana*, los cuales se secaron al vacío, y se disolvieron en DMSO- $d_6$ . El espectro se tomó operado a 600 MHz. Los datos fueron procesados con el software Mestrenova y las señales se reportaron como desplazamiento químico ( $\delta$ /ppm).

#### **3.2.2.5. Evaluación de la actividad *in vitro* de inhibición de la alfa amilasa del extracto etanólico de frutos de *Physalis Peruviana* y una vez liberado de las NPs-Pp, complementado con el seguimiento de los azúcares reductores.**

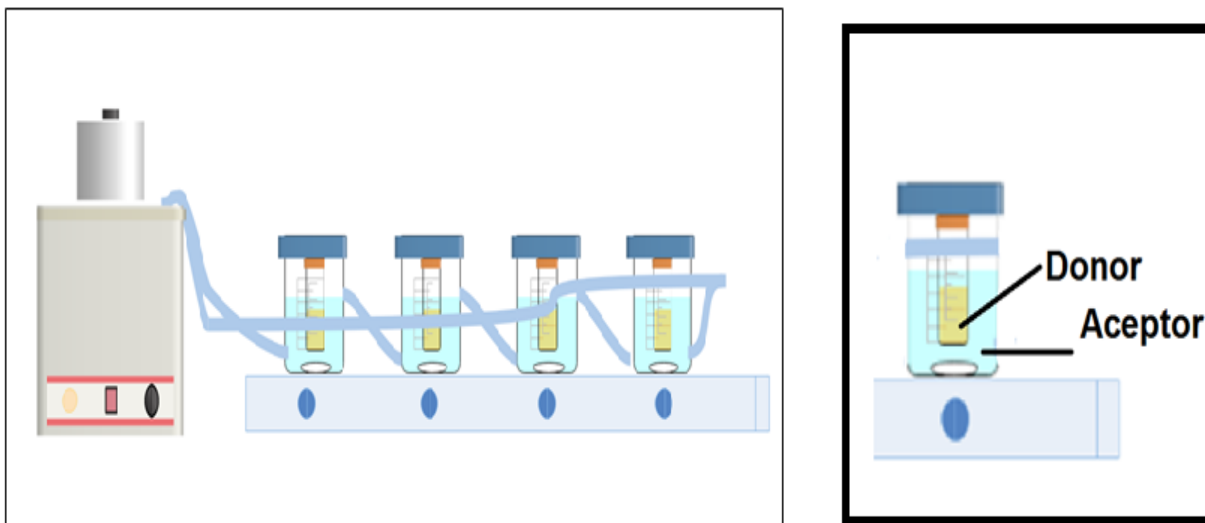
Este ensayo de actividad *in vitro* es una aproximación si existe o no actividad hipoglucemiante de acuerdo con lo demostrado en trabajos previos, realizados al interior del grupo de investigación (Bernal, 2016; Rey, 2013; Rey, Ospina & Aragón, 2015). La

evaluación del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* sobre la actividad enzimática de la alfa amilasa se realizó siguiendo la metodología propuesta por (Rey, 2013) con algunas modificaciones. Se pesaron 206.8 mg del extracto etanólico y se llevaron a un volumen de 10 mL con etanol para obtener una concentración de 20 mg/mL. A partir de esta se prepararon diluciones a concentraciones de 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 mg/mL. Como control positivo se utilizó la acarbosa a una concentración de 500 µg/mL (774.5 µM). Todas las muestras se dejaron en contacto con la enzima durante 60 minutos. La lectura de las absorbancias se realizó a una longitud de onda de 595 nm (para el procedimiento más detallado ver el Anexo D). Para la determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) se empleó el software GraphPad prism 8®, graficando la absorbancia en función del logaritmo de la concentración. La inhibición de la alfa amilasa fue calculada de la siguiente forma:

$$\% \text{ Inhibición PPA} = \frac{(A_c - A_b) - (A_m - A_b)}{(A_c - A_b)} * 100 \quad (\text{Hansawasdi, Kawabata, \& Kasai, 2000})$$

Donde  $A_c$  es la absorbancia del 100 % de la actividad enzimática (solo el vehículo con la enzima),  $A_m$  la muestra (con la enzima),  $A_b$  el blanco (vehículo sin la enzima).

Para corroborar que el extracto cargado en las NPs-Pp mantenía su actividad una vez liberado, se evaluó si había efecto de inhibición sobre la enzima alfa amilasa en función del tiempo. La metodología involucró el estudio de liberación en sí mismo, la evaluación de la actividad *in vitro* y la cuantificación de la cantidad liberada de azúcares reductores a tiempos determinados. Para evaluar el comportamiento de la liberación del extracto de *Physalis peruviana* se implementó un ensayo como el que se muestra en la Figura 3-5.

**Figura 3-5.** Esquema del montaje de liberación

Liberación con vasos enchaquetados, baño termostático para mantener una temperatura de 37 °C, membranas de diálisis, y agitación constante a 300 rpm. Fuente: Elaboración propia.

Se pesó cerca de 1 mg de cada liofilizado de NPs-Pp y NPs vacías, se colocaron en tubos de ensayo. En cada tubo se agregaron 1.25 mL de una solución de buffer fosfatos pH 6.5. Se agitaron todas las muestras por 1 min con un vortex. Cada muestra, después de agitada, fue depositada en un tubo que se cerraba en uno de los extremos y en el otro se le ponía una membrana de diálisis Zellultrans MWCO de 3500. Cada tubo era puesto por separado en un frasco enchaquetado, bajo agitación a 37 °C de temperatura, con 10 mL del medio de liberación (buffer fosfatos, pH 6.5).

Se realizó un muestreo de 2 mL de la solución con reposición de medio, correspondiente a lo liberado a partir de los sistemas a diferentes tiempos: 3 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, para la evaluación de la actividad *in vitro*. Algunos de estos muestreos fueron considerados para el ensayo de azúcares reductores: 8 h, 24 h y 72 h. En ambos casos las muestras fueron guardadas en viales ámbar. Las muestras de liberación de las NPs vacías fueron el blanco correspondiente en cada caso en las cuales no se observó ningún porcentaje de inhibición y/o contenido de azúcares reductores evidenciable.

Para evaluar la actividad *in vitro* a partir del extracto liberado de los diferentes sistemas, en función del tiempo, se siguió la metodología ya descrita y propuesta por (Rey, 2013), con algunas modificaciones. La acarbosa fue el reactivo empleado como control positivo a una concentración de 500 µg/mL (774.5 µM). Se tomaron 200 µL de las muestras de liberación de las NPs-Pp, a cada tiempo muestreado, los cuales se pusieron en contacto con 100 µL de la enzima y 200 µL de sustrato de almidón azul durante 60 minutos. La lectura de las absorbancias se realizó a una longitud de onda de 595 nm. Una vez obtenido los resultados, se calculó el porcentaje de inhibición de la enzima alfa amilasa.

Para comprobar si se estaba liberando alguno de los componentes activos del extracto, se decidió seguir los azúcares reductores de las muestras tomadas como posibles marcadores analíticos, ya que en el extracto están presentes en un rango que varía entre 6.55-7.80% (Ozturk, Özdemir & Albayrak, 2017). Las muestras fueron evaluadas por medio del reactivo de Fehling, el cual es utilizado para la detección de sustancias reductoras. Este se basa en el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído que pasa a ácido, reduciendo la sal cúprica de cobre (II) en medio alcalino a óxido de cobre (I) formando un precipitado de color rojo (Marques, Rampazo, Zilliani, Marques & Benincasa, 2016). La preparación de las soluciones del ensayo se incluyó en el Anexo I.

Se empleó el método Fehling Lane-Eynon, modificado de acuerdo con lo propuesto por el método n.º 923.09 de la AOAC Internacional (AOAC, 2005). Para ello, los análisis fueron realizados por duplicado, El volumen muestreado fue diluido a 25 mL, para luego ser cargado en una bureta digital. Por otra parte, se tomaron 10.0 mL de la solución de Fehling mixta (solución Soxhlet), diluida con 30 mL de agua destilada, en un Erlenmeyer de 250 mL, donde la solución fue calentada hasta punto de ebullición. Posteriormente, se inició la titulación en constante ebullición de la solución mixta, con una velocidad de adición de la muestra desde la bureta de 2 gotas por segundo, teniendo en cuenta no interrumpir la ebullición por disminución de la temperatura. Se continuó la titulación hasta que hubo cambio en la coloración de azul a un tono celeste verdoso. Cuando fueron añadidas tres gotas de azul de metileno 1 %, el punto final de la titulación se estableció cuando la solución viró a un color amarillo pálido.

### 3.3. Resultados y discusión

Como se ha descrito a lo largo del documento, el objetivo de este estudio es obtener un sistema nanoestructurado cargado con un extracto de frutos de *Physalis peruviana* como sustancia activa. Para ello, fue necesario, como se describió en la metodología, la obtención del extracto y su correspondiente caracterización en cuanto a contenido de sólidos totales, índice de refracción, y propiedades organolépticas, resultados que se describen a continuación.

#### 3.3.1. Extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* como sustancia activa de partida

El extracto etanólico de *Physalis peruviana* correspondió a lo descrito previamente (Baena Aristizábal, 2015; Bernal, 2016): color marrón, olor aromático, sabor amargo ácido y con partículas de aspecto semisólido graso en suspensión, un índice de refracción promedio de las diferentes muestras del extracto (n=3) de  $1.42 \pm 0.01$ , a una temperatura de  $16.9 \pm 0,9$  °C, y un  $54.7 \pm 2.1$  % de sólidos totales en dispersión (n=3). Este último dato es el resultado de interpolar el valor del índice de refracción en la curva de calibración realizada al interior del grupo en trabajos previos (Baena Aristizábal, 2015; Bernal, 2016). Como resultado final del proceso se obtuvieron 734 mL de extracto etanólico que provenían de 5 kg de material fresco equivalentes a 937 g del polvo de los frutos. Como resultado, cada mL contiene 1.30 g de material crudo, lo que concuerda con los atributos de calidad escogidos según la estandarización de extracto reportada por (Baena Aristizábal, 2015) y con la definición de extracto fluido presentada por la Farmacopea de los Estados Unidos, en donde cada mL de extracto contiene los componentes extraídos de 1 g del material crudo (The United States Pharmacopeial Convention, 2015).

Los resultados de la evaluación de la actividad de inhibición de alfa amilasa *in vitro* y de la identificación del ácido cítrico por RMN como molécula trazadora, para el extracto, serán presentados en comparación con los resultados obtenidos para las NPs cargadas con el extracto.

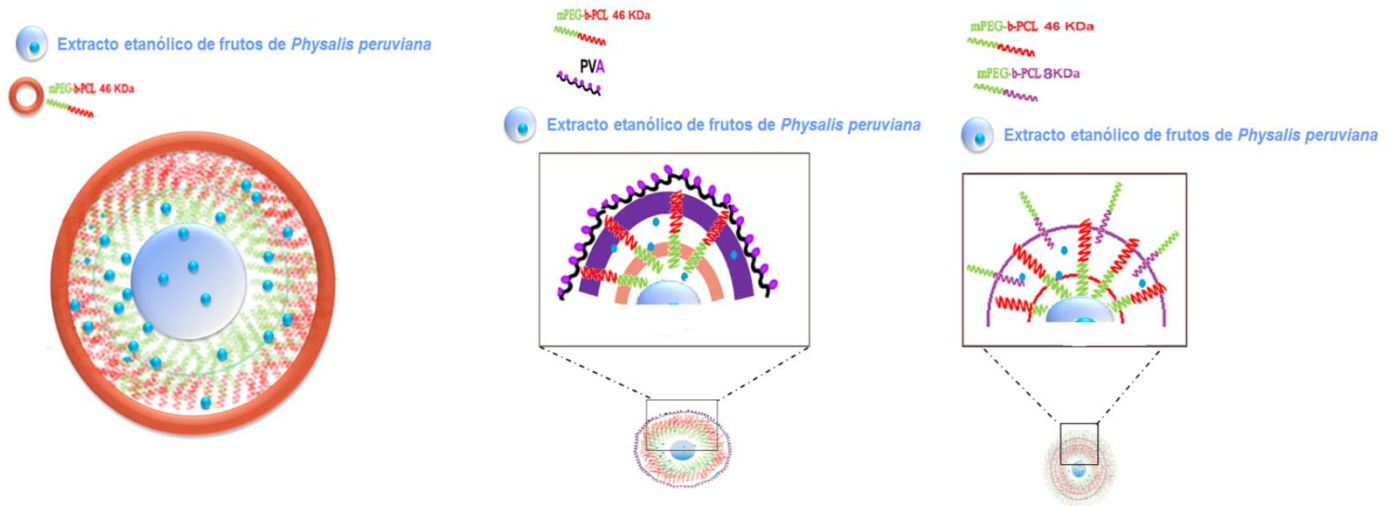


### **3.3.2. Nanopartículas cargadas con extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana***

Previo a la elaboración de las NPs-Pp, con la idea de entender la naturaleza del extracto frente a los solventes involucrados en la obtención y conociendo que el extracto tiene componentes de naturaleza hidrofílica y lipofílica, se decidió realizar una prueba preliminar para evaluar cualitativamente (colorimétricamente) cómo el extracto migraba de la fase acuosa a la fase orgánica. El extracto se adicionó al sistema bifásico compuesto por diclorometano (DCM) y agua (H<sub>2</sub>O). Al cabo de dos horas se evidencia la migración del color, seguramente debido a los betacarotenos presentes en el extracto que posiblemente con otros componentes apolares migran de la fase acuosa a la fase orgánica.

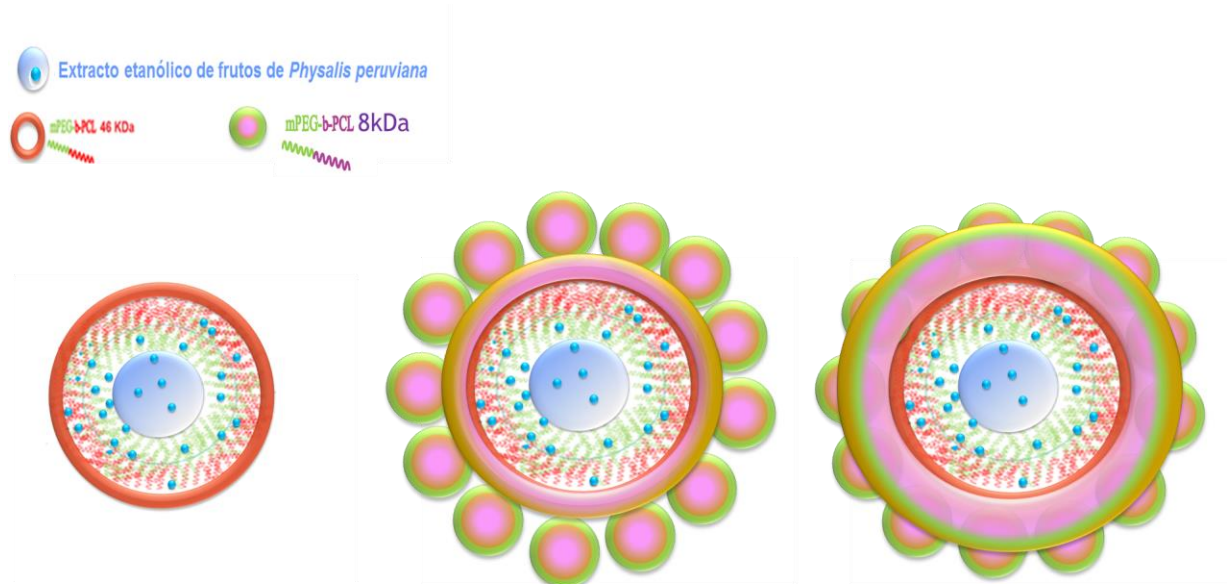
Debido a la complejidad del extracto, se plantea como hipótesis que una parte del extracto va a estar encapsulada en la zona hidrofílica de las nanopartículas, mientras que otra parte correspondiente a los compuestos de naturaleza apolar se ubicará en la zona cercana al bloque de policaprolactona. Esto hace pensar que la metodología DESEm y el empleo de polímeros anfifílicos para este tipo de sustancias es adecuado, permitiendo la incorporación de sustancias hidrofílicas y lipofílicas que, junto con el empleo de estabilizantes como los empleados, eviten la migración del extracto desde las NPs a la fase acuosa externa durante el proceso de elaboración. Estas hipótesis están fundamentadas en lo reportado por otros autores que señalan que este tipo de fenómenos de migración, especialmente para compuestos hidrofílicos, se reduce con la adición de un agente estabilizante en la segunda emulsión (Dubey et al., 2012; Mora-Huertas et al., 2010; Rodríguez Arévalo, 2019). De manera general estas hipótesis planteadas se representan en la Figura 3-6 y Figura 3-7.

**Figura 3-6.** Esquema de la posible estructura ampliada de las NPs variando el tipo de estabilizante cargadas con extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*.

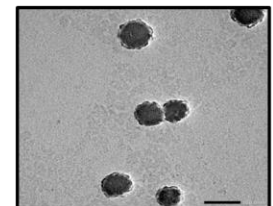


Fuente: Elaboración propia.

**Figura 3-7.** Esquema de la posible estructura ampliada de las NPs variando el tipo de estabilizante cargadas con extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*



Aumento de la concentración del estabilizante mPEG-b-PCL de 8KDa



Fuente: Elaboración propia.

### 3.3.3.1. Caracterización de las NPs-Pp

En la Figura 3-8 se presentan las fotos correspondientes a diferentes dispersiones de NPs-Pp obtenidas por DESEm variando el estabilizante (PVA 2 %, mPEG-b-PCL 0.01, 0.03, 0.05, 0.1 %). Estas son de color blanco-beige debido posiblemente al color de los materiales de partida: los polímeros (blancos) y el extracto (amarillo-anaranjado).

**Figura 3-8.** Foto de los sistemas de nanoestructurados en dispersión



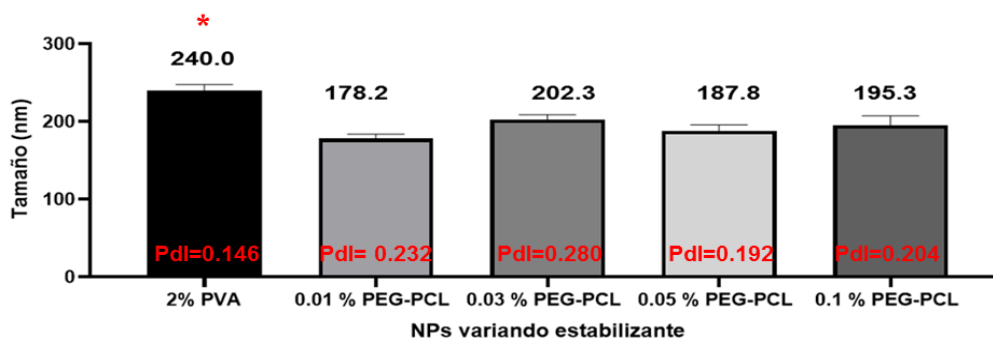
Sistemas con polímero mPEG-b-PCL ~46KDa que contienen el extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (NP-Pp) dispersos en la fase acuosa, en los que varía el agente estabilizante (mPEG-b-PCL 8 KDa 0.01, 0.05 y 0.1%, PVA 2%). **(A-C)** NPs-Pp mPEG-b-PCL ~46KDa- mPEG-b-PCL 8 KDa 0.01 %, **(D-F)** NPs-Pp mPEG-b-PCL ~46 KDa- mPEG-b-PCL 8 KDa 0.05 %, **(G-I)** NPs-Pp mPEG-b-PCL ~46KDa- mPEG-b-PCL 8 KDa 0.1 %, **(J-K)** NPs-Pp mPEG-b-PCL ~46 KDa- PVA 2.0 %. Fuente: Elaboración propia.

A continuación, se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica de los sistemas elaborados.

### Distribución de tamaño de partícula e índice de polidispersidad

En la Figura 3-9 se presentan de manera gráfica la variación del tamaño e índice de polidispersidad de las NPs-Pp en función del estabilizante. El tamaño medio de las partículas para cada muestra se encuentra dentro de la escala nanométrica, inferior a 250 nm, índice de polidispersidad inferior a 0.360, correspondiendo a una distribución polidispersa moderada (Martinez et al., 2017). En el Anexo G, se presentan las distribuciones de tamaño de partícula. En comparación con las NPs sin carga (capítulo 2), estas aumentan su tamaño (con excepción de lo ocurrido para la concentración del copolímero estabilizante de 0,01%) y presentan un incremento en el Pdl, lo que sugiere la encapsulación del extracto en el sistema.

**Figura 3-9.** Resultados del tamaño de las nanopartículas que contienen el extracto



NPs cargadas con el extracto al variar el tipo y concentración del agente estabilizante: PVA al 2% y mPEG-b-PCL 8 KDa al 0.01, 0.03, 0.05 y 0.1 % (Promedio  $\pm$  SD. n=3). (\*) Diferencia significativa por la prueba de Tukey. Fuente: Elaboración propia.

El valor del tamaño promedio de las respectivas NPs-Pp variando el estabilizante sigue el orden 0.01 % mPEG-b-PCL < 0.05 % mPEG-b-PCL < 0.1 % mPEG-b-PCL < 0.03 % mPEG-b-PCL < 2 % PVA. Como se observó en el capítulo 2, las NPs vacías tenían tamaños inferiores a 250 nm, característica que se mantiene para las NPs-Pp.

Los resultados de tamaño de las NPs-Pp empleando como estabilizante el mPEG-b-PCL 8 KDa variando su concentración (0.01, 0.03, 0.05, 0.1 %) muestran en la prueba de Tukey que no hay diferencias significativas en tamaño (Anexo F). Estas se mantienen en un

tamaño cercano a los 195 nm; sin embargo, para una concentración de 0.01 % de mPEG-b-PCL de 8 KDa, estas se alejan de esos valores con respecto a las demás concentraciones con un tamaño de ~178 nm (Anexo F).

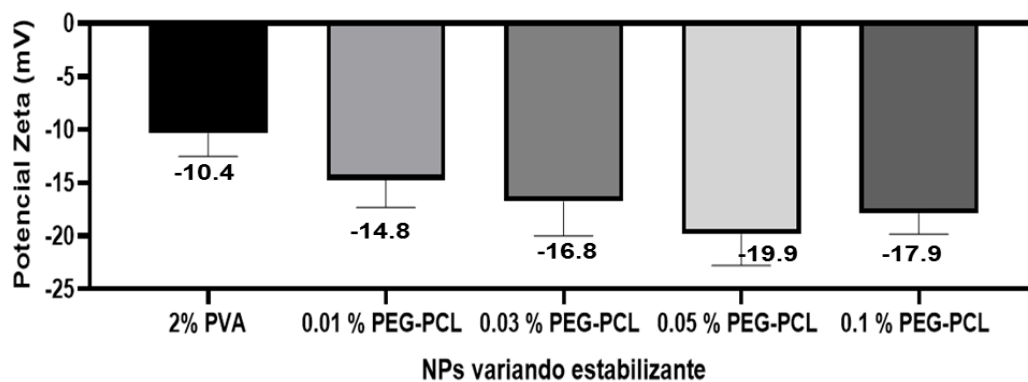
Las NPs-Pp utilizando como estabilizante PVA presentaron una diferencia estadísticamente significativa de tamaño en comparación de las demás NPs-Pp con mPEG-b-PCL 8 KDa (Anexo F) ( $p < 0,05$ ) para la prueba de Tukey, ~240 nm en este caso. Para estas NPs-Pp se evidencia un aumento de tamaño al estar cargadas con el extracto con respecto a las NPs vacías (~229 nm). Este comportamiento concuerda con los resultados reportados para las NPs con mPEG-b-PCL y PVA encapsulando un fármaco como goserelina; en este, el tamaño de las nanopartículas aumenta al incorporar un principio activo (NPs vacías con un tamaño de 162 nm respecto a las NPs con goserelina con un tamaño de 174 nm) (Tomar et al., 2013), lo que hace inferir que la encapsulación de un principio activo aumenta usualmente el tamaño de las NPs-Pp utilizando PVA como estabilizante. Por otro lado, es interesante que estas NPs-Pp son las que muestran unos comportamientos más cercanos a una distribución monodispersa, y los resultados de la prueba de Tukey para los valores de Pdl muestran que hay una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de estas NPs-Pp con PVA con respecto a las demás (Anexo F).

Estos comportamientos se pueden deber a dos razones: en primer lugar, en la segunda fase acuosa 2, correspondiente al PVA al 2 %, este estabilizante está disuelto y al evaporar el solvente orgánico se podría estar generando una capa de PVA en la superficie del mPEG-b-PCL de ~46 KDa, que al medir el tamaño de partícula corresponderían solamente a las NPs PVA- mPEG-b-PCL de ~ 46 KDa dispersas en una fase acuosa y, por lo tanto, un menor Pdl; por otro lado, ya que el copolímero mPEG-b-PCL de 8 KDa posiblemente está ubicado en la interfase de las gotículas (mPEG-b-PCL de ~46 KDa disuelto en DCM)-agua, este copolímero podría saturar la interfase de las gotículas, y una vez saturada la interfase, el copolímero de 8Kda libre podría permanecer en forma de micelas poliméricas con un tamaño definido. Por lo tanto, al evaporarse el solvente y solidificar las NPs, las medidas de Pdl pueden aumentar porque se estaría midiendo el Pdl de las NPs de mPEG-b-PCL de 8 KDa - mPEG-b-PCL de ~46 KDa y de las micelas poliméricas de mPEG-b-PCL de 8 KDa.

### Potencial $\zeta$

El Potencial  $\zeta$  de las NPs-Pp (Figura 3-10) se mantiene cargado negativamente y, de manera similar a lo explicado en el capítulo 2, se debe adsorción de iones por el segmento PEG del copolímero. El valor de potencial  $\zeta$  sigue el orden, en valor absoluto, 0.05 % mPEG-b-PCL > 0.1 % mPEG-b-PCL -PP > 0.03 % mPEG-b-PCL > 0.01 % mPEG-b-PCL > 2% PVA.

**Figura 3-10.** Potencial Z de las nanopartículas cargadas con el extracto



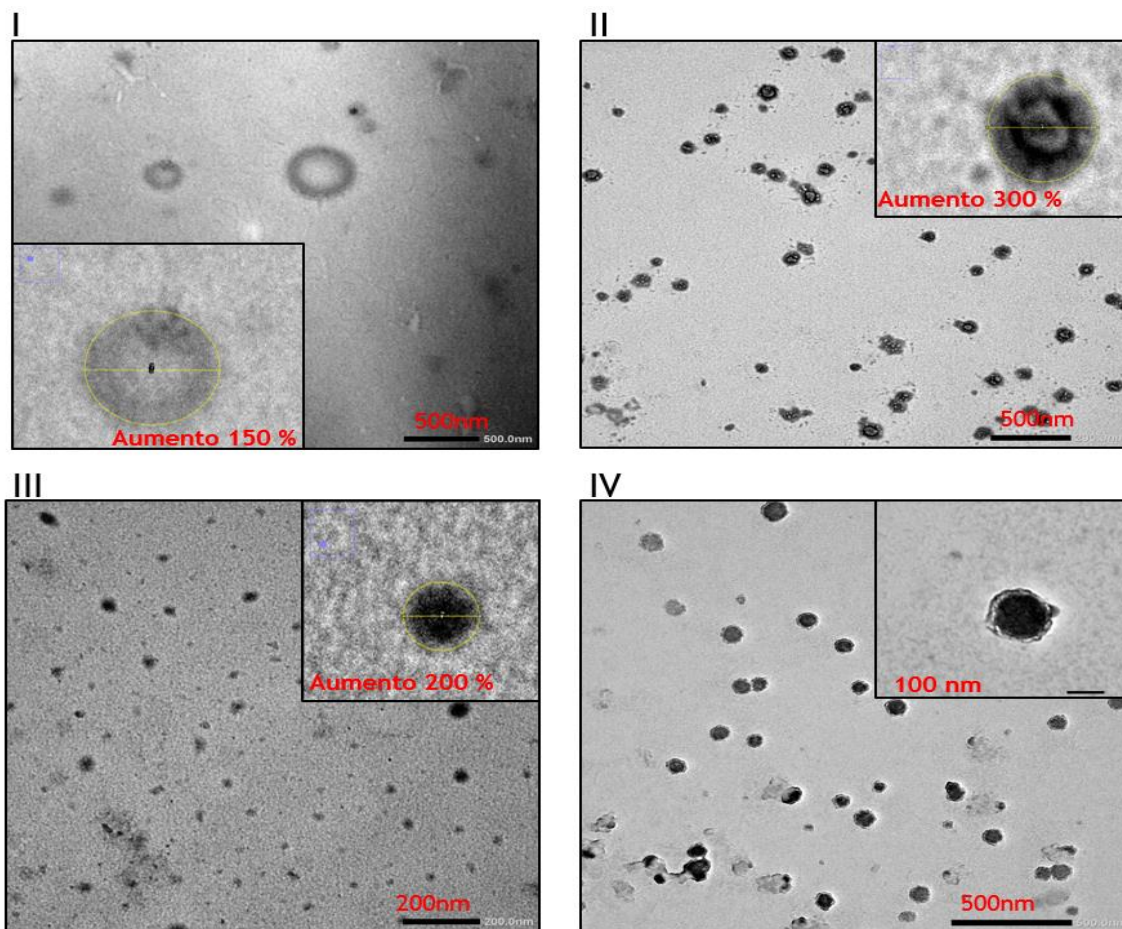
NPs cargadas con el extracto empleando como agente estabilizante PVA al 2% y mPEG-b-PCL 8 KDa al 0.01,0.03, 0.05, 0.1 % (Promedio  $\pm$ S.D. n=3). Fuente: Elaboración propia.

Los datos muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), que pueden estar relacionadas con la concentración del estabilizante, e influenciadas levemente por la ubicación del extracto en las nanopartículas. Al comparar estos valores con los de las NPs vacías es posible suponer que algunos componentes del extracto como flavonoides u otros podrían estar influenciando la magnitud del potencial  $\zeta$ , disminuyéndolo (Maruenda, Cabrera, Cañari-Chumpitaz, Lopez, & Toubiana, 2018; Olivares, 2017; Zhang et al., 2013).

### Morfología

Las imágenes TEM de las diferentes NPs-Pp variando el estabilizante (PVA 2%, mPEG-b-PCL 0.01, 0.03, 0.05, 0.1%) se presentan en la Figura 3-11, caracterizadas por tener una forma esférica.

**Figura 3-11.** Imagen TEM de nanopartículas seleccionadas que contienen el extracto



Aumentos en el software Fiji de 150, 200 y 300 % y escala nanométrica de 500nm, 200nm, 100nm (en rojo) según correspondan; **I** (NP-Pp mPEG-b-PCL ~46 KDa-2% PVA); **II**(NP-Pp mPEG-b-PCL ~ 46 KDa-0.01 % mPEG-b-PCL 8 KDa); **III** (NP-Pp mPEG-b-PCL ~ 46 KDa- 0.05 % mPEG-b-PCL 8 KDa); **IV** (NP-Pp mPEG-b-PCL ~46 KDa- 0.1 % mPEG-b-PCL 8 KDa). Fuente: Elaboración propia.

En la primera imagen (I) de la Figura 3-11 se observan las NPs-Pp, utilizando como estabilizante PVA al 2 % con dos dominios de la siguiente manera: una corteza de color gris ligeramente más oscuro y un núcleo o cavidad interna más claro, mostrando una

estructura similar a una nanocápsula. En las imágenes (II), (III) y (IV) se observan las NPs-Pp utilizando como estabilizante mPEG-b-PCL, las cuales tienen dos dominios: una corteza (gris oscuro) y un núcleo o cavidad interna, mostrando también una estructura similar a una nanocápsula. Sin embargo, al observar las imágenes TEM, se puede sugerir que, al aumentar la concentración del estabilizante, posiblemente la corteza va tomando una forma más definida y establecida, como una corona que concuerda con la hipótesis de la estructura propuesta.

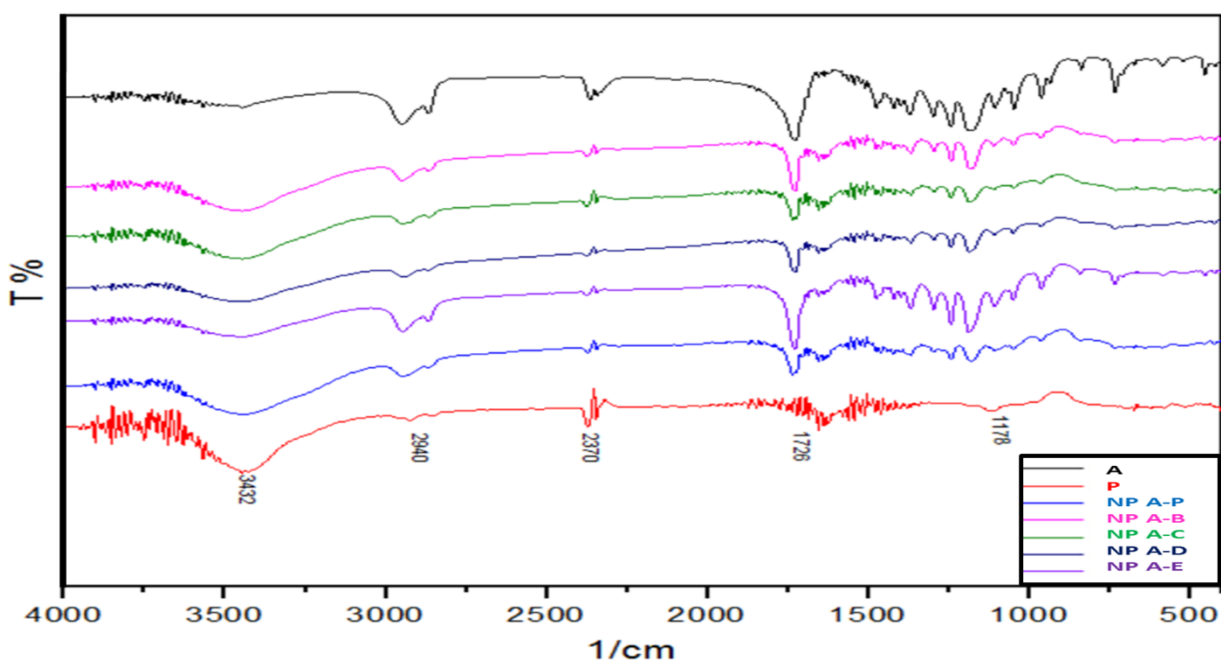
Los resultados tienen una correlación adecuada por DLS y TEM. Como se observa en las figuras, el tamaño de partícula por TEM es inferior a lo reportado para los tamaños medidos por DLS, debido a que por esta última metodología se están midiendo los radios hidrodinámicos en medio acuoso, por lo que las nanopartículas podrían estar hidratadas generando tamaños mayores.



### FT-IR

La evaluación de los sistemas empleando esta técnica, se realizó para confirmar la incorporación del extracto y posibles cambios a nivel estructural, debidos a la interacción del copolímero de mayor peso molecular, estabilizantes y el extracto. En la Figura 3-12 se presentan los espectros de infrarrojo de los polímeros mPEG-b-PCL ~46 KDa y PVA, así como los correspondientes a las NPs-Pp que incluyen estos materiales de partida. El análisis de estos espectros se describe con detalle a continuación.

**Figura 3-12.** Espectro infrarrojo de las diferentes NPs-Pp,



Espectro de las NPs elaboradas con los estabilizantes mPEG-b-PCL 8 KDa y con el PVA en comparación con los materiales de partida, copolímero mPEG-b-PCL ~46 KDa y PVA 31 KDa 2 %. Las convenciones para los espectros FT-IR son las siguientes: **(A)** copolímero de mPEG-b-PCL de ~46 KDa, **(NP A)** nanopartículas de mPEG-b-PCL de ~46 KDa, las letras A, B, C, D, E refieren a las NPs utilizando como estabilizante mPEG-b-PCL de 8 KDa para las diferentes concentraciones **(B)** 0.01 % color rosado, **(C)** 0.03 % color verde y **(D)** 0.05 % color azul oscuro y **(E)** 0.05 % color morado. **(NP A-P)** nanopartículas de mPEG-b-PCL de ~46 KDa utilizando como estabilizante PVA 2 % azul rey y **(P)** corresponde al PVA color rojo. Todas las NPs evaluadas corresponden a las NPs cargadas con el extracto. Fuente: Elaboración propia.

En primer lugar, se analizan los espectros correspondientes del mPEG-b-PCL ~46 KDa y PVA; no se incluyó el espectro del copolímero de bajo peso molecular de 8 KDa pues las

bandas que se analizan corresponden a las características del espectro del copolímero de alto peso molecular, presentes en las demás muestras. El espectro IR de PVA de color rojo tiene como señales características: una banda simétrica y ancha, en aproximadamente  $3432\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a estiramientos de tipo OH asociado, característico de grupos hidroxilo enlazados; las señales de los estiramientos de los metilenos en una zona de  $2849\text{-}2933\text{ cm}^{-1}$ , y la banda de  $1210\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al carbono unido al oxígeno del grupo alcohol secundario.

El espectro del mPEG-b-PCL de  $\sim 46\text{ KDa}$ , color negro, como ya se describió en el capítulo 2, presenta una banda en  $3444.87\text{ cm}^{-1}$  no muy notoria, debido a la posible captación de agua por el segmento PEG; las bandas de estiramiento de los enlaces C–H se observan alrededor de  $2947.23\text{ cm}^{-1}$  y  $2866.22\text{ cm}^{-1}$ ; la banda de absorción más característica del espectro está en  $1724.36\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración del grupo carbonilo C=O de la PCL; en cuanto a la banda en  $1242.16\text{ cm}^{-1}$ , se atribuye a las vibraciones con estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces C–O–R del copolímero; finalmente, la banda en  $1188.15\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a las vibraciones de estiramiento del enlace C–O–C de la unidad repetitiva  $\text{–O–CH}_2\text{–CH}_2$  (Tomar et al., 2013; Shuai et al., 2003; Yadav et al., 2008).

Para las NPs-Pp que utilizaron como estabilizante PVA 2 %, cuyo espectro corresponde al de color azul, se observa la banda correspondiente al grupo OH del PVA y las señales características del copolímero mPEG-b-PCL  $\sim 46\text{ KDa}$  en aproximadamente  $1730\text{ cm}^{-1}$ , con una menor intensidad y corrimiento de banda. En  $1242\text{ cm}^{-1}$  también con una menor intensidad, posiblemente debido a un solapamiento del espectro de PVA con el del copolímero. Por otra parte, en la región de  $3440\text{ cm}^{-1}$  se observa un ensanchamiento de la banda correspondiente a los grupos OH, provenientes del PVA y mPEG-b-PCL, ya descritos, y adicionalmente ese ensanchamiento puede corresponder a grupos OH de alguno de los componentes del extracto, como pueden ser del ácido cítrico, azúcares, ésteres de sacarosa, entre otros componentes con grupos OH en sus moléculas.

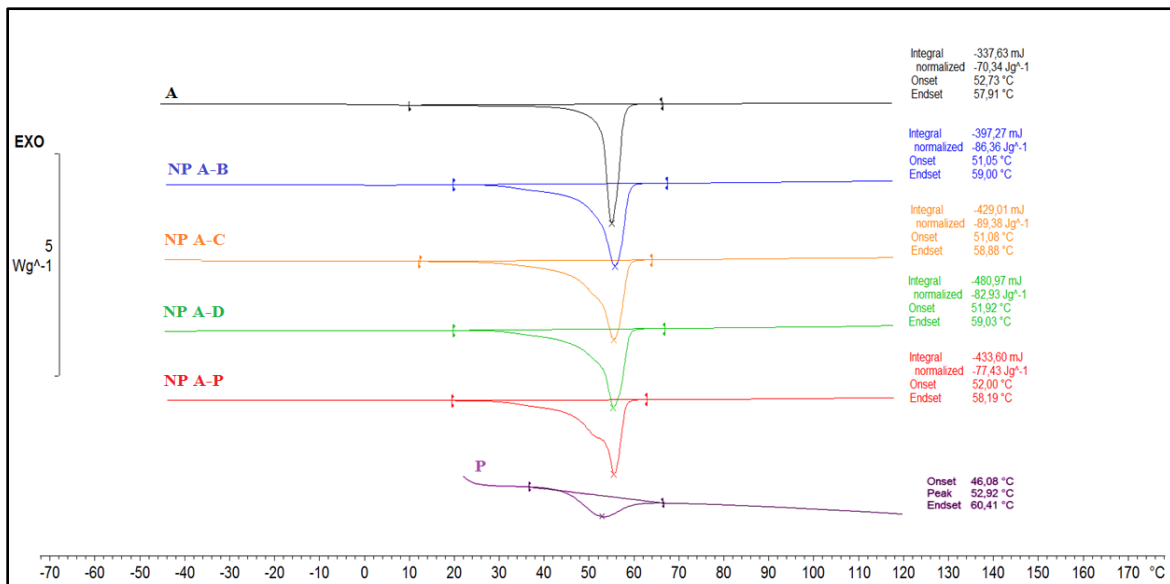
En cuanto a los espectros de las NPs-Pp que tienen como estabilizante el copolímero mPEG-b-PCL de  $8\text{ kDa}$  en diferentes concentraciones, también se observan las bandas anchas elongadas, no tan intensas, correspondientes a las vibraciones de los grupos OH,

que seguramente son debidas a algunos de los componentes del extracto, como ya se mencionó. Adicionalmente, se ve un corrimiento y variación en la intensidad de la señal a  $1724\text{ cm}^{-1}$ , característica de la vibración del grupo carbonilo C=O de la PCL. A medida que aumenta la concentración del estabilizante aumenta la intensidad de esta banda (con excepción de lo que ocurre para la concentración de 0,01 % de mPEG-b-PCL 8 KDa). Esto es posiblemente debido a que está aumentando la proporción de los grupos carbonilo en comparación a los grupos metilos de la cadena carbonada o a factores experimentales como el peso de la muestra, por lo tanto, esta banda será más intensa.

De acuerdo con lo anterior, se podría sugerir que posiblemente haya una capa de estabilizante rodeando al copolímero de recubrimiento mPEG-b-PCL de ~46 KDa que podría generar variaciones en la intensidad de las bandas. Por otro lado, la aparición de nuevas bandas, que no corresponden con las características de los grupos funcionales del copolímero de ~46 KDa, pueden ser posiblemente atribuidas al extracto. De esa manera, se podría inferir que el extracto posiblemente está cargado en las NPs-Pp.

### **Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las NP-Pp**

En la Figura 3-13 se observan los resultados de los análisis de calorimetría diferencial de barrido para el copolímero mPEG-b-PCL de ~46 KDa, el PVA y las cuatro NPs-Pp con diferentes estabilizantes debido a la variación de concentración en mPEG-b-PCL de 8 KDa y PVA 2 %. En el termograma del mPEG-b-PCL (color negro) se puede apreciar la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de las cadenas poliméricas a  $58\text{ }^\circ\text{C}$ , que es producto de los segmentos del copolímero PEG ( $T_m = 61\text{ }^\circ\text{C}$ ) y PCL ( $T_m = 59\text{ }^\circ\text{C}$ ), ya que estos son polímeros semicristalinos (Huang, Li, & Li, 2015). Además, en el termograma del PVA (color púrpura) se puede evidenciar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) acompañada de una relajación entálpica a  $53\text{ }^\circ\text{C}$  (Guirguis & Moselhey, 2012).

**Figura 3-13.** Termogramas de las diferentes NPs-Pp

NPs-Pp elaboradas con los estabilizantes (mPEG-b-PCL 8 KDa y PVA) en comparación con los materiales de partida (copolímero mPEG-b-PCL ~46 KDa y PVA 31 KDa 2 %). Las convenciones para el termograma son las siguientes: **(A)** copolímero de mPEG-b-PCL de ~46 KDa, **(NP A)** nanopartículas de mPEG-b-PCL de ~46 KDa, las letras A, B, C refieren a las NPs utilizando como estabilizante mPEG-b-PCL de 8 KDa para las diferentes concentraciones **(B)** 0.01 % color azul, **(C)** 0.03 % color naranja y **(D)** 0.05 % color verde. **(NP A-P)** nanopartículas de mPEG-b-PCL de ~46 KDa utilizando como estabilizante PVA 2 % color rojo y **(P)** corresponde al PVA color morado. Termograma extracto (Anexo H). Fuente: Elaboración propia.

Asimismo, en los termogramas para las cuatro NPs-Pp es notable la misma  $T_m$  que el copolímero en bloque, debido a su núcleo de mPEG-b-PCL de ~46 KDa; sin embargo, es importante resaltar dos variaciones, la primera correspondiente a las bandas más anchas de fusión, y la segunda debida a los diferentes valores entálpicos con respecto al mPEG-b-PCL de ~46 KDa.

En las NPs-Pp estabilizadas con diferente concentración de mPEG-b-PCL de 8 KDa y 2 % PVA, la disminución en la temperatura de inicio (onset) se debe al posible aumento de dominios cristalinos en la corteza de las NPs-Pp, lo cual promueve una ampliación en los picos de fusión. Por otra parte, la diferencia de los valores entálpicos sigue un orden, como se explica a continuación: NPs-Pp con 0.03 % mPEG-b-PCL 8 KDa > NPs-Pp con 0.01 %

mPEG-b-PCL 8 KDa > NPs-Pp con 0.05 % mPEG-b-PCL 8 KDa > NPs-Pp con 2 % PVA. Esto puede ser producto, primero, de la corteza de mPEG-b-PCL de 8 KDa y 2 % PVA, ya que se encuentran más dominios cristalinos y segundo, a la presencia del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*, puesto que se necesita más energía para desorber de las NPs-Pp el extracto.

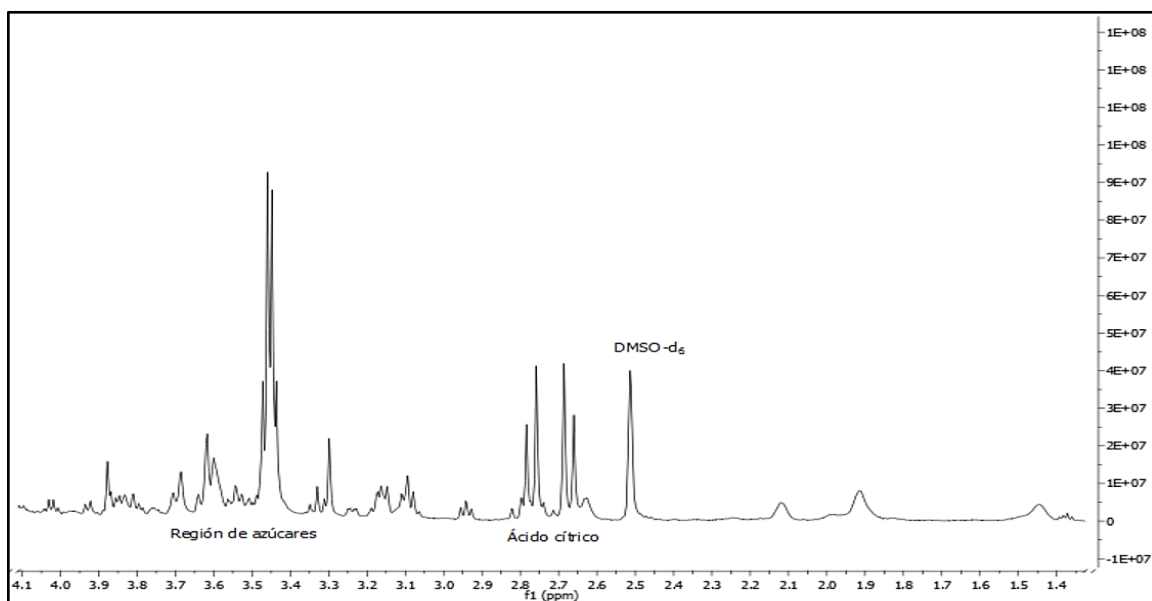
Cabe añadir que en el caso particular de las nanopartículas NP A-P se observa un cambio entálpico menor, en comparación con las NPs-Pp cuyo estabilizante era el mPEG-b-PCL de 8 KDa. Esta diferencia podría ser debida a un posible entrecruzamiento polimérico del PVA en la interfase del copolímero mPEG-b-PCL~46 KDa, disminuyendo los dominios cristalinos y, por tanto, los valores de entalpía de fusión.

De acuerdo con esta discusión se podría sugerir que la presencia de estabilizantes modifica la cristalinidad propia de la conformación de las cadenas del copolímero de recubrimiento, mPEG-b-PCL de ~46 KDa, al interactuar con dichos componentes, generando una variación en las entalpías de fusión de las NPs-Pp, en comparación con el copolímero de partida. Resultado que concuerda con lo dicho por el análisis del espectro FT-IR.

### 3.3.3.2 Seguimiento del ácido cítrico como molécula trazadora del extracto etanólico libre y cargado en las NPs-Pp

En la Figura 3-14 se presenta el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*, en el que se identifican las señales correspondientes al ácido cítrico y a la región de azúcares que concuerdan con lo reportado en la literatura (Bernal, 2016; Cañari, Nieva & Maruenda, 2012; Maruenda, Cabrera, Cañari-chumpitaz, Lopez & Toubiana, 2018).

**Figura 3-14.** Espectro de resonancia magnética nuclear del extracto de frutos de *Physalis peruviana*.



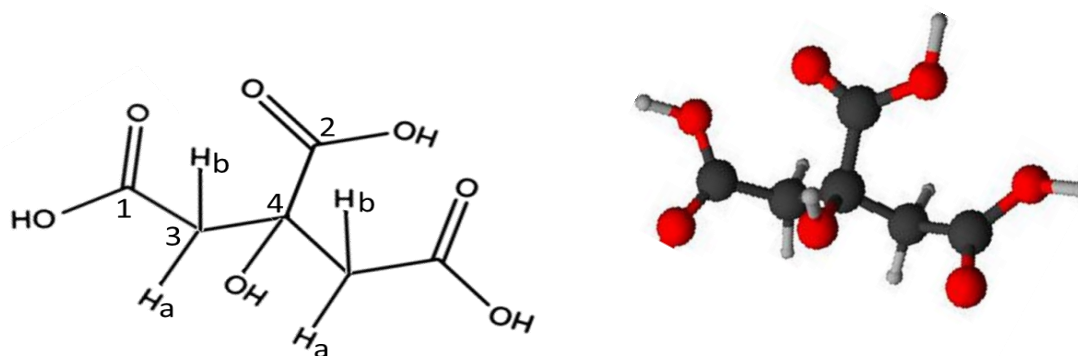
Fuente: Elaboración propia.

Con el objetivo de contar con una técnica de cuantificación del extracto, para las siguientes etapas de este trabajo de investigación se eligió la zona correspondiente al ácido cítrico (marcador analítico), ya que permite una identificación y seguimiento. Es necesario advertir que en trabajos previos del grupo de investigación TECPRONA se había acudido al seguimiento de los marcadores analíticos glucosa y fructosa empleando la técnica de HPLC con detector de índice de refracción (Bernal, 2016); sin embargo, para el desarrollo de esta tesis no se pudo disponer del equipo requerido, por lo que se acudió a la alternativa de RMN, teniendo en cuenta la experticia del grupo de investigación BioNanoTechnology

(BNT) de la Universidad de Wageningen University & Research, donde se realizó una parte experimental de esta tesis en modalidad pasantía de investigación.

Para explicar los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN del ácido cítrico, en la Figura 3-15 se observa su estructura molecular, con la correspondiente asignación de señales de hidrógenos y carbonos, y en la Tabla 3-1 se presentan los valores para cada una de las señales asignadas, comparando las obtenidas experimentalmente con las reportadas en la literatura (Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ácido cítrico, n.d.).

**Figura 3-15.** Asignación de las señales de hidrogeno y carbono para el ácido cítrico.



Nota: La información se complementa con la tabla 3-1. Fuente: Elaboración propia.

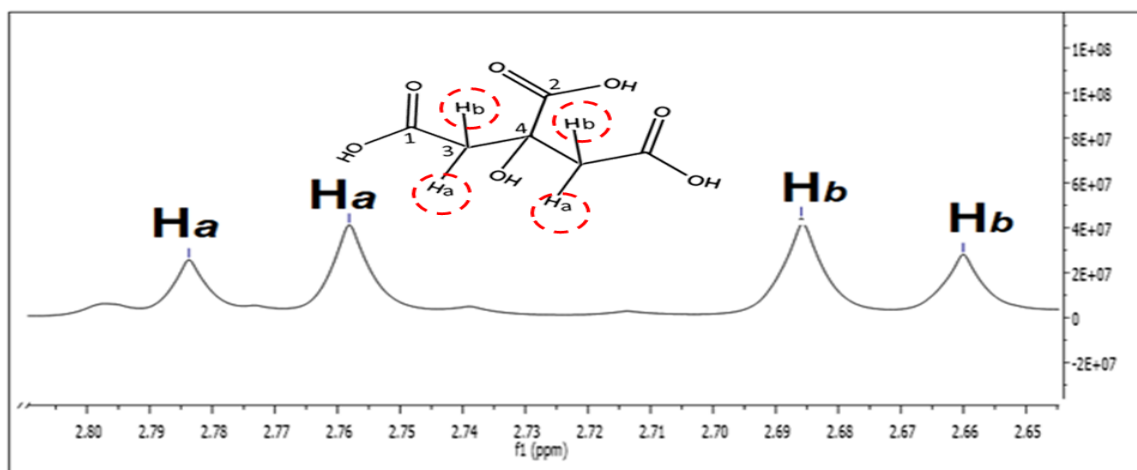
**Tabla 3-1.** Comparación de los datos (de la literatura y experimentales) de resonancia magnética nuclear de carbono $^{13}$  e hidrogeno $^1$  del ácido cítrico.

	$\text{H}^1$		$\text{C}^{13}$	
	Teórico Ppm	Experimental ppm	Teórico Ppm	Experimental ppm
Ha	2.783	2.78	C2	174.37
Ha	2.745	2.76	C1	171.10
Hb	2.677	2.69	C4	72.42
Hb	2.638	2.66	C3	42.61
				43.20

**Nota:** **H** y **C** corresponden a los hidrógenos y carbonos de la molécula del ácido cítrico (ácido 2-Hidroxipropano-1, 2, 3-tricarboxílico), respectivamente, la letra que lo acompaña corresponde a su asignación en la molécula de la Figura 3-15, **Hb** (hidrógenos cercanos al grupo carboxílico, el cual está en la posición 2 según nombre IUPAC), **Ha** (hidrógenos cercanos al alcohol en la posición 2), **C1** (carbonos de los ácido carboxílicos en las posiciones 1 y 3), **C2** (carbono del ácido carboxílico posición 2), **C3** (carbonos de los metilenos de las posiciones 1y 3) (Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ácido cítrico, n.d.).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la zona correspondiente al ácido cítrico se presenta en la Figura 3-16, donde se evidencian las señales propias de esta molécula.

**Figura 3-16.** Espectro de resonancia magnética nuclear del ácido cítrico presente en el extracto etanólico de los frutos de *Physalis peruviana*.



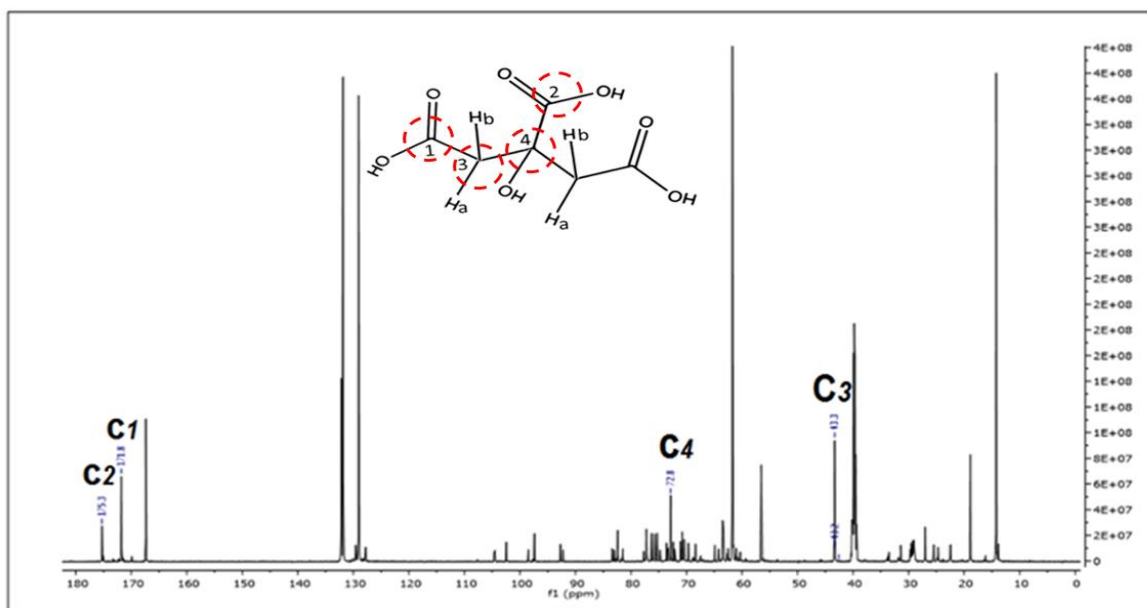
**Hb** (hidrógenos cercanos al grupo carboxílico, el cual está en la posición 2 según nombre IUPAC), **Ha** (hidrógenos cercanos al alcohol en la posición 2). Fuente: Elaboración propia.

De lo observado en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 3-16), se presentan señales como dos dobletes. Este comportamiento se debe a las diferencias en el entorno químico de los hidrógenos de los metilenos (posiciones 1,3, IUPAC), por lo tanto, los hidrógenos cercanos al grupo carboxílico (**Hb**) tendrán más apantallamiento 2.69 y 2.66 ppm. Por otro lado, los hidrógenos (**Ha**) cercanos al hidroxilo del carbono C4 (posición 2) tendrán un menor apantallamiento, debido a su cercanía con el oxígeno del grupo hidroxilo, el cual es un átomo electronegativo que retira densidad, por eso genera un mayor desplazamiento de las señales, las cuales están en un rango de 2.783-2.745 ppm (Bernal, 2016; Maruenda et al., 2018).



El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para el extracto de *Physalis peruviana* se muestra en la Figura 3-17 con las señales correspondientes a los carbonos primarios, secundarios y terciarios, propias del ácido cítrico.

**Figura 3-17.** Espectro de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  para el ácido cítrico presente en el extracto etanólico de los frutos de *Physalis peruviana*.



**C1** (carbonos de los ácidos carboxílicos en las posiciones 1 y 3, IUPAC), **C2** (carbono del ácido carboxílico posición 2) **C3** (carbonos de los metilenos de las posiciones 1y 3). Fuente: Elaboración propia.

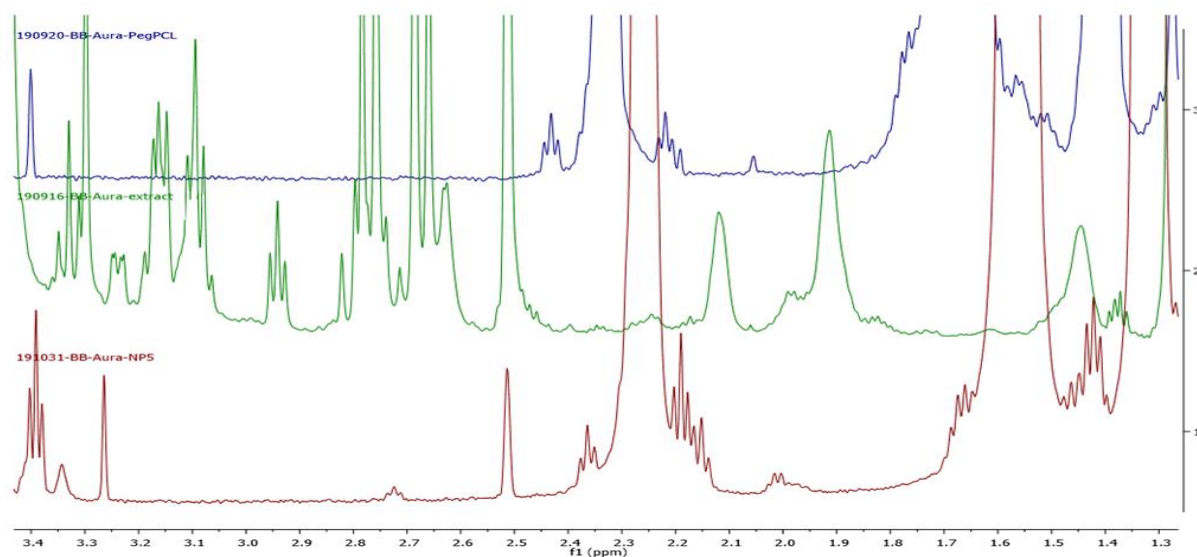
En este espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observan las señales correspondientes a los diferentes carbonos de la molécula del ácido cítrico de la siguiente manera: los carbonos primarios de los ácidos carboxílicos en 171.78 ppm C1 (posiciones 1, 3, IUPAC) y el correspondiente al C2 en 175.27 ppm (posición 2), el carbono terciario C4 en 72.8 ppm unido a los dos metilenos, un ácido carboxílico y un alcohol (posición 2), y, por último, los carbonos secundarios C3 con un desplazamiento de 43.3 ppm, característica de los metilenos (posiciones 1,3).

Con base en la metodología planteada anteriormente y el análisis realizado, se compararon los espectros de resonancia magnética nuclear del extracto obtenido y del polímero. De lo anterior se observó que para la señal del espectro de resonancia magnética nuclear correspondiente al ácido cítrico del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* no

había solapamiento con las señales del espectro de RMN del mPEG-b-PCL, lo que permitiría la cuantificación del extracto de frutos de *Physalis peruviana* en las NPs-Pp, mediante el seguimiento del ácido cítrico proveniente de este.

Los resultados del seguimiento del ácido cítrico del extracto etanólico de *Physalis peruviana* frente a los espectros de resonancia magnética nuclear del copolímero y de las nanopartículas destruidas cargadas con el extracto, se presentan en la Figura 3-18.

**Figura 3-18.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, ampliación del espectro en el segmento característico del ácido cítrico



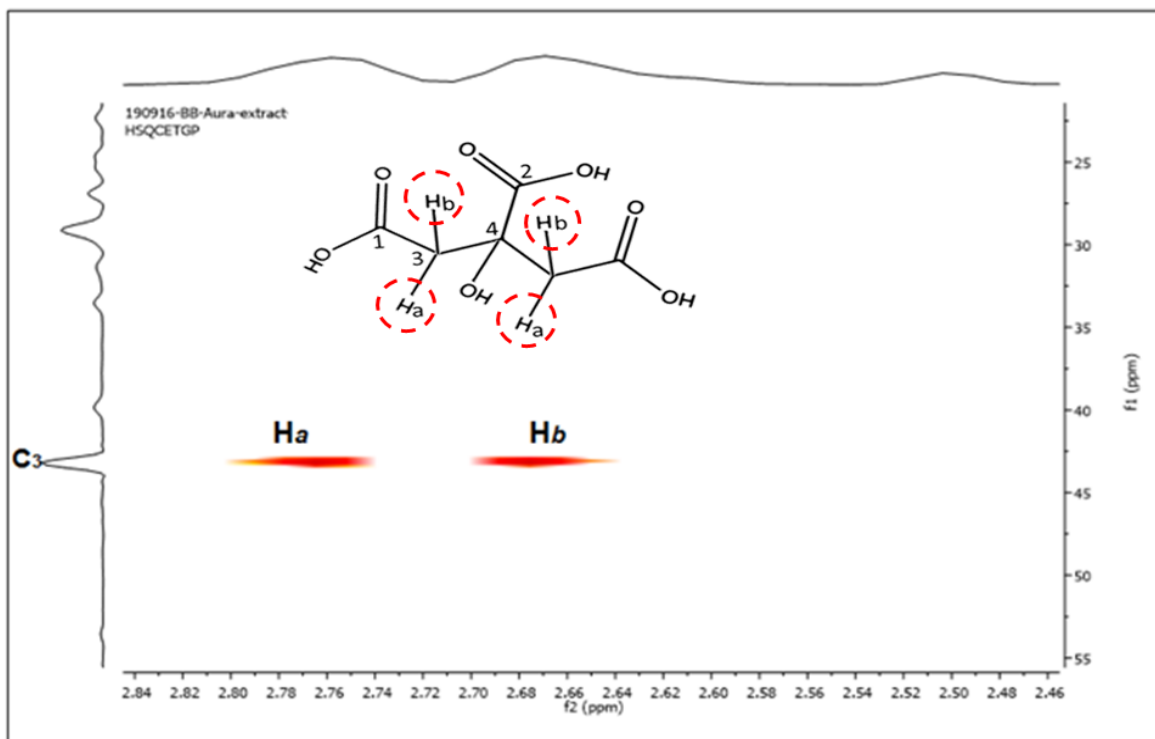
Para el extracto de *Physalis peruviana* (verde) y de las NPs-Pp destruidas (rojo) y del polímero mPEG-b-PCL (azul). Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3-18 se observa el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para el copolímero (color azul), para el extracto (color verde) y para las NPs-Pp destruidas (color rojo). El espectro  $^1\text{H}$ -RMN del copolímero sintetizado muestra la presencia de señales características asociadas al bloque PEG y al bloque PCL (explicadas con detalle en el capítulo 2). Por otro lado, en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del extracto (verde) se observan las señales características del ácido cítrico ya explicadas en este capítulo, que corresponden al ácido cítrico (molécula trazadora), de manera general a un doblete, en un rango de desplazamiento de 2.8 a 2.6 ppm.

Al comparar el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de las NPs-Pp destruidas (rojo), en la zona de 2.8 a 2.6 ppm con el espectro del copolímero no hay ninguna señal de este que se pudiera solapar con las señales del extracto. Sin embargo, a pesar de no existir interferencias detectables, las señales del espectro del ácido cítrico del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* provenientes de las NPs-Pp destruidas (a.c-NPs) (tripleto) no tienen suficiente intensidad, por lo que no se lograron calcular las constantes de acoplamiento de una manera adecuada, para corroborar su equivalencia con las señales del espectro del ácido cítrico del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (a.c-eePp) (dobles dobletes). Aparte de esta señal, también hay otras señales de baja intensidad que posiblemente correspondan a algún componente del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* diferentes al ácido cítrico. Debido a la complejidad de los diferentes componentes del extracto y falta de tiempo para caracterizarlos adecuadamente frente a bases de datos, estos no fueron caracterizados como la molécula trazadora, y por lo tanto, no se les realizó el seguimiento. Por otro lado, a raíz de que la señal que podría corresponder al ácido cítrico tiene una baja intensidad, se puede suponer que posiblemente la concentración del extracto en las muestras de NPs-Pp está por el orden de los microgramos, por lo tanto, las señales no alcanzan a observarse de una manera adecuada. Sin embargo, estas señales de baja intensidad no corresponden a ninguna señal de los copolímeros de partida y sí están relacionadas con las presentes en el extracto. La existencia de estas señales, relacionadas con componentes del extracto, son un indicio positivo de que efectivamente en las nanopartículas este se encuentra incluido.

Adicionalmente, para corroborar que el tripleto del espectro de RMN del ácido cítrico (ya explicado) sí se correlaciona con los carbonos e hidrógenos característicos de esta molécula, se realizó un espectro de correlación heteronuclear (*heteronuclear single quantum coherence*, HSQC), extended tripolar gradient (ETPG)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-ETGP, tanto para el extracto solo (Figura 3-19) como para las nanopartículas destruidas cargadas con el extracto (Figura 3-20-I). Lo anterior permitió estudiar la correlación heteronuclear entre carbonos e hidrógenos del extracto correspondiente al ácido cítrico.

**Figura 3-19.** Espectro de resonancia magnética nuclear, correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-ETGP del ácido cítrico presente en el extracto etanólico de los frutos de *Physalis peruviana*.

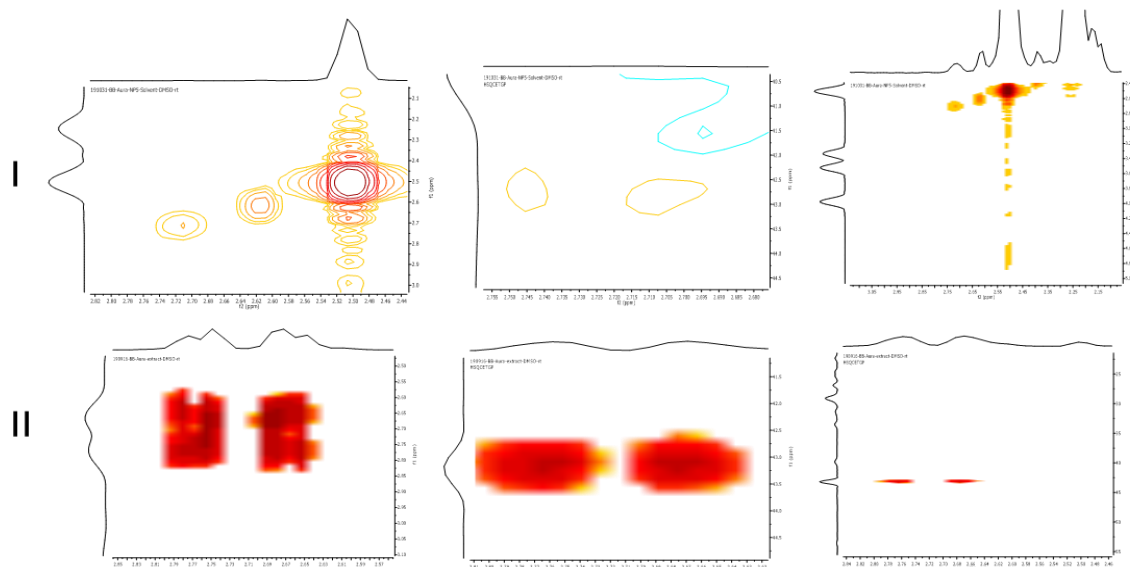


Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo con la Figura 3-19, los carbonos secundarios C3, presentes en la molécula de ácido cítrico (posición 1,3, IUPAC) en 43.20 ppm, se correlacionan con los hidrógenos Ha y Hb, cuyos desplazamientos están hacia 2.75 y 2.68 ppm, respectivamente, confirmando la identificación del ácido cítrico proveniente del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*.

En la Figura 3-20 se observan los resultados de una zona ampliada de los espectros de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-ETGP de las NPs-Pp y del extracto, en ambos casos se da la correlación heteronuclear entre carbonos e hidrógenos, que corrobora lo ya explicado.

**Figura 3-20.** Espectro de resonancia magnética nuclear-correlación heteronuclear



Correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-ETGP del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* solo y presente en las nanopartículas. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3-20-II se observan los espectros de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-ETGP del ácido cítrico del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* (a.c-eePp), donde se ven los hidrógenos con los desplazamientos característicos en 2.75 y 2.68 ppm, acoplados a los carbonos secundarios en  $\sim 43$  ppm de la molécula de ácido cítrico, explicados con detalle en la figura 3-19. Al comparar los resultados de la Figura 3-20-II con los resultados de la Figura 3-20-I se encuentra una posible similitud en la posición de los acoplamientos, que puede ser por las señales del a.c-NPs, de esa manera, junto con la Figura 3-18, donde se observa una señal (tripleto) que posiblemente corresponda al a.c-NPs, en la zona de espectro de RMN de 2.8 a 2.6 ppm, se puede sugerir que esa señal está relacionada con a.c-NPs, lo que confirmaría posiblemente la encapsulación del extracto.

Esta caracterización, complementa el estudio realizado, sin embargo, al evidenciarse que no fue posible cuantificar el ácido cítrico en las NPs-Pp, seguramente por su baja concentración, fue necesario buscar otra alternativa de cuantificación (valoración de

azúcares reductores) y complementarla con la evaluación *in vitro* de la inhibición de la alfa amilasa, de acuerdo con lo explicado en la metodología.

### 3.3.3.3. Evaluación de la actividad *in vitro* de inhibición de la alfa amilasa del extracto etanólico de frutos de *Physalis Peruviana* y una vez liberado de las NPs-Pp, complementado con el seguimiento de los azúcares reductores.

El comportamiento de la concentración del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* en función de la respuesta, representada en este estudio por la inhibición de la alfa amilasa, se muestra en la Tabla 3-2.

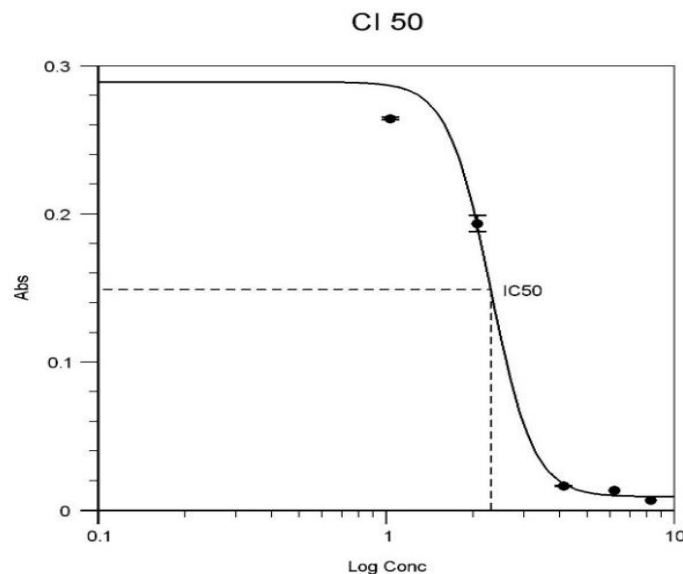
**Tabla 3-2.** Porcentajes de inhibición de la alfa amilasa en función de la concentración del extracto etanólico de frutos de *P. peruviana*.

Concentración inicial (mg/mL)	Concentración en placa (mg/mL)	Inhibición (%)
20.7	8.3	98.4± 1.1
15.5	6.2	94.7±1.7
10.3	4.1	93.7±1.6
5.2	2.1	37.4±3.4
2.6	1.0	14.2±0.3
<b>Acarbosa 500 µg/mL (774.5 µM)</b>	<b>200 µg/mL(309.8 µM)</b>	<b>95.8±1.5</b>

Nota: Los resultados se expresan como la media ± S.D (n=3).

La concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) del extracto etanólico de los frutos de *Physalis peruviana* frente a la alfa amilasa se muestran en la Figura 3-21, con un valor que corresponde a 2.3 mg/mL, mayor a la concentración de 619,9 µg/mL reportada por (Rey, 2013). Estas diferencias pueden asociarse a que para este estudio se trabajó con un extracto estandarizado, mientras en la otra investigación no lo estaba, por lo tanto, pueden variar. Sin embargo, está dentro del rango de las concentraciones usualmente reportadas para CI<sub>50</sub> de extractos de plantas de 1.75 µg/mL (Kim et al., 2005) a 50.9 ± 0.17 mg/mL (Subramanian, Asmawi & Sadikun, 2008).

**Figura 3-21.** Concentración inhibitoria 50 del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* sobre la actividad enzimática de la alfa amilasa.



Absorbancia (**Abs**), logaritmo de la concentración (**Log Conc**), concentración inhibitoria 50 (**CI 50**).

Adicionalmente, esta diferencia puede ser debida a la variación en el contenido de compuestos activos inhibidores de alfa amilasa presentes en los frutos de *Physalis peruviana*, con los cuales se realizó el extracto etanólico (la diferencia en tener un extracto estandarizado o no), así como en la preparación de las muestras del extracto etanólico (dilución del extracto y su concentración de compuestos activos por muestra), ya que este presenta componentes semigrasos, los cuales pueden causar la no interacción con la enzima, generando así resultados menores de inhibición de alfa amilasa y, por lo tanto, mayores de  $CI_{50}$  (Baena Aristizábal, 2015; Bernal, 2016; Medina, 2012; Rey, 2013). Este menor valor de inhibición sobre la alfa amilasa por parte del extracto posiblemente podría disminuir los efectos adversos (flatulencias, meteorismo y diarrea) en comparación con la acción de la acarbosa (Bischoff, 1994; Rey, 2013).

Retomando lo dicho, el porcentaje de inhibición de la alfa amilasa en extractos de plantas puede variar, ya que esta depende de la concentración, composición del extracto vegetal y del método de extracción, además que la actividad inhibitoria frente a la alfa amilasa puede ser debida a sinergismos de los componentes. Por lo tanto, no es posible hacer una comparación directa de la posible dosis o concentración mínima efectiva del extracto frente a la acarbosa, ya que este es un compuesto específico, con estructura definida, mientras

el extracto es un sistema multicomponente. Sin embargo, este fármaco se utiliza generalmente como control positivo del bioensayo de inhibición de alfa amilasa (Rey, 2013).

Los resultados obtenidos del extracto etanólico de *Physalis peruviana* a una concentración de 15 mg/mL presentan un porcentaje de inhibición del ~95 %, el cual es cercano al porcentaje de inhibición de la alfa amilasa de la acarbosa, ~96 %, por lo cual esta concentración del extracto fue la escogida para la elaboración de las NPs-Pp, que equivale a aproximadamente 500 microgramos de acarbosa. Esta concentración, está respaldada por un estudio previo, según (Baena Aristizábal, 2015), en el que se obtienen mejores resultados de encapsulación, por supuesto para el sistema estudiado.

Con base en lo anterior, se confirmó que el extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* posee actividad inhibitoria frente a la alfa amilasa, comparándola con un control positivo de acarbosa y un blanco de liberación de las NPs vacías. Basados en estos resultados, se quiso evaluar la actividad del extracto durante el proceso de liberación a partir de las diferentes NPs-Pp. En la Figura 3-22 se presenta el comportamiento de la liberación del extracto presente en un 1 mg de NPs-Pp; en esta se observa que todas las muestras estudiadas posiblemente mantienen un porcentaje de inhibición de alfa amilasa dentro de un rango de 13 a 58 %. En comparación con lo reportado por (Narkhede et al., 2012), los porcentajes de inhibición inferiores a 29 % corresponderían a una concentración de acarbosa menor a 5 µg/mL. Como se puede ver en la Tabla 3-3, los rangos de inhibición de 29-53 % de inhibición de alfa amilasa podrían corresponder a un rango de concentración de la acarbosa de 5-60 µg/mL.

**Tabla 3-3.** Valores de concentración de acarbosa y su correspondiente inhibición de alfa amilasa.

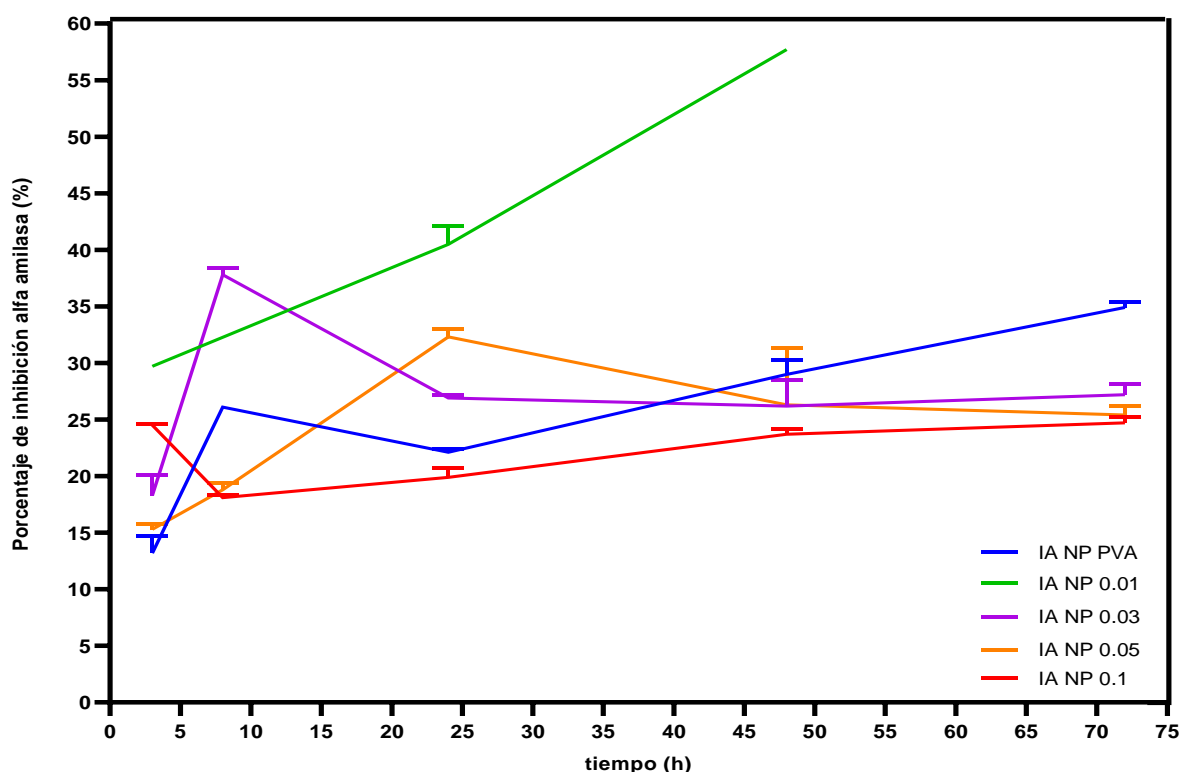
Concentración de acarbosa (µg/mL)	Inhibición de alfa amilasa (%)
5	29.1
10	32.5
20	37.7
30	43.5
40	45.2
50	48.2
60	52.6

Nota: Tabla adaptada de (Narkhede et al., 2012)



En otras palabras, la inclusión del extracto en un sistema nanoparticulado posiblemente no afecta su actividad, de manera similar a lo demostrado para otros sistemas en estudios realizados al interior del grupo de investigación con este mismo extracto (Baena Aristizábal, 2015; Rodríguez Bernal, Linck, Castellanos, Ramos & Baena, 2019). Esto también abre la posibilidad de a futuro contar con un fitoterapéutico que pueda ser coadyuvante en el tratamiento de la diabetes, mediante el mecanismo ya establecido (Baena Aristizábal, 2015; Bernal, 2016; Rey, 2013).

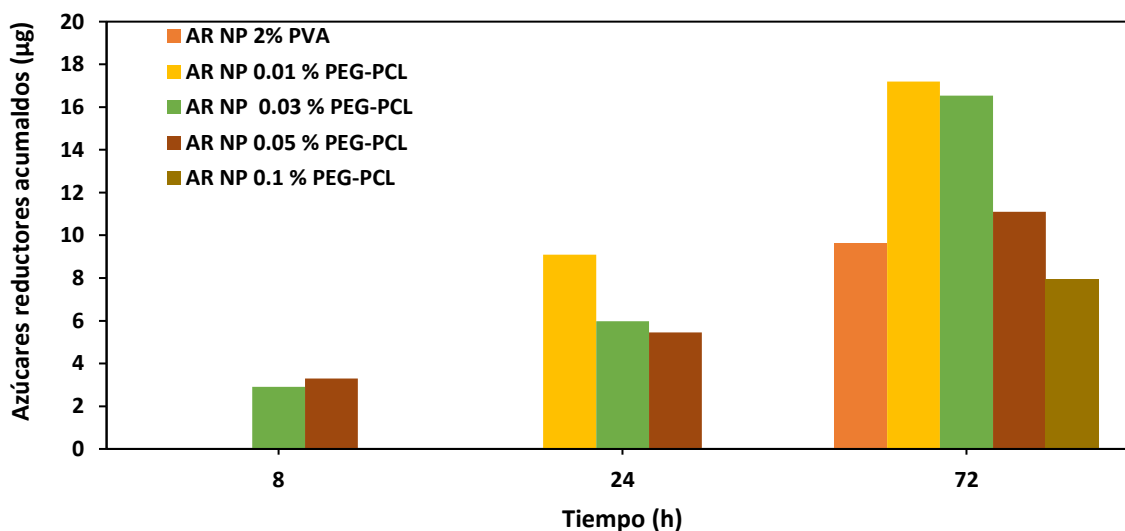
**Figura 3-22.** Evaluación de la liberación del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* de las diferentes NPs-Pp



Evaluación de la liberación del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* de las diferentes NPs-Pp mediante la evaluación de la inhibición de la actividad enzimática de la alfa amilasa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  S.D (n=3). **IA**: inhibición de alfa amilasa, **NP**: Nanopartículas que contienen el extracto. **IA NP PVA**: NP mPEG-b-PCL -2 % PVA, **IA NP 0.01**: NP mPEG-b-PCL~46 KDa- 0.01 % mPEG-b-PCL 8 KDa, **IA NP 0.03**: NP mPEG-b-PCL ~46 KDa- 0.03 % mPEG-b-PCL 8 KDa, **IA NP 0.05**: NP mPEG-b-PCL ~46 KDa- 0.05 % mPEG-b-PCL 8 KDa, **IA NP 0.1**: NP mPEG-b-PCL ~46 KDa-0.1 % mPEG-b-PCL 8 KDa). Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo con lo explicado en la metodología, se decidió también evaluar la cantidad de azúcares reductores presentes en el medio de liberación procedentes del extracto, utilizando como blanco lo liberado de las NPs vacías, por medio de reactivo de Fehling (cuyos resultados se muestran en la Figura 3-23), en los que se evidencia que posiblemente para la mayoría de las NPs-Pp hay un aumento progresivo de la concentración de azúcares reductores en función del tiempo. Es de aclarar que la concentración de azúcares reductores en los muestreos iniciales no fue suficiente para ser detectados, en comparación con las muestras en las que había transcurrido más tiempo. Es así como para un análisis más cuantitativo se hacen necesarias metodologías y equipos más sensibles para este tipo de sustancias. A continuación, se presenta el análisis junto con los resultados de la actividad *in vitro*.

**Figura 3-23.** Cantidad acumulada de azúcares reductores de las de NPs-Pp



Cantidad acumulada de azúcares reductores en µg procedentes del extracto etanólico de *Physalis peruviana*, evaluada en las muestras de NPs-Pp con diferentes estabilizantes una vez liberado el extracto. (**AR**) Azúcares reductores acumulados, (**NP**) nanopartículas, **PEG-PCL** indica el estabilizante usado de mPEG-b-PCL de 8 KDa. Fuente: Elaboración propia.

Las NPs-Pp de 0.01 % son las que muestran un mayor incremento de azúcares reductores en función del tiempo y además corresponden a los mayores porcentajes de inhibición alfa amilasa con un rango aproximado de 30 a 58 % (Figuras 3-22 y 3-23). Esto puede ser

debido a que el extracto y, por lo tanto, sus azúcares reductores están adsorbidos en la superficie de la NPs-Pp, liberándose más rápidamente y generando una concentración detectable en el medio aceptor; adicionalmente, estas NPs-Pp fueron las que tuvieron un tamaño de partícula menor, por consiguiente una mayor área superficial; esto implica que al tenerse una superficie expuesta mayor, se tenga una más alta presencia de extracto adsorbido en la superficie, en comparación con los otros sistemas. Por otro lado, la liberación rápida podría estar asociada a que estas NPs-Pp están perdiendo polímero de su estructura, es decir, se podrían estar erosionando.

Los resultados correspondientes a las NPs-Pp de mPEG-b-PCL 8 KDa al 0.03 y 0.05% (Figuras 3-22 y 3-23) ilustran un aumento progresivo de la actividad *in vitro*, que corresponde con el aumento de la concentración de azúcares reductores. Las NPs-Pp al 0.1 % (Figuras 3-22 y 3-23) presentan una menor cantidad de azúcares reductores a las 72 h, en comparación de los otros sistemas; a las 8 h y 24 h no hay aparentemente azúcares reductores detectables. Frente a la evaluación de la actividad *in vitro*, estas NPs-Pp mostraron un menor porcentaje de inhibición frente a la alfa amilasa con un rango aproximado de 19-25 %, en comparación con las demás NPs-Pp dando un indicio de una liberación más lenta. Esto podría estar asociado a un mayor atrapamiento del extracto en la estructura de la nanopartícula. Es importante resaltar que el efecto del extracto liberado de las NPs-Pp sobre la actividad de la enzima alfa amilasa a las 3 h es el que presenta un mayor porcentaje de inhibición, aproximadamente 24% en comparación con las demás NPs-Pp, lo que posiblemente sea debido a un efecto ráfaga (burst) por desorción del extracto de la superficie. Las NPs-Pp con PVA (Figuras 3-22 y 3-23) tienen un efecto de inhibición sobre la alfa amilasa en un rango de 13% a 35%, al igual que las NPs-Pp de 0.1 %, posiblemente el extracto se esté liberando más lentamente.

El control de la liberación cambia dependiendo de la concentración del estabilizante, lo que concuerda con los resultados sobre la variación de la  $T_m$  y la entalpía de las diferentes nanopartículas. El análisis de resultados realizado, podrían dar un indicio de la distribución del extracto en este tipo de NPs-Pp; el extracto estaría adsorbido en la superficie y presente en el núcleo de estas, asociado a los valores de actividad inhibitoria logrados a cortos tiempos, posiblemente por la desorción del extracto, y a la liberación continua en el tiempo.

La actividad *in vitro* del extracto etanólico de *Physalis peruviana* se mantiene una vez liberado de los diferentes sistemas, lo que está acorde con lo reportado para el extracto solo y el extracto en una forma farmacéutica (Baena Aristizábal, 2015; Bernal, 2016; Mora, Aragón, & Ospina, 2010; Rey, 2013).

Con base en los resultados obtenidos, se considera que el extracto liberado de las diferentes NPs-Pp mantiene su actividad de inhibición de alfa amilasa comparado con los resultados de acarbosa reportados (Narkhede et al., 2012), y con los rangos de porcentajes conocidos para extractos de plantas, correspondientes al extracto sólo y no a lo liberado a partir de un sistema farmacéutico, lo que lo hace más complejo. Según (Silva Pinto et al., 2009) se obtienen resultados de aproximadamente 12 % de inhibición de alfa amilasa y 50 % de inhibición de glucosidasa para una concentración de 50 mg/mL de un extracto de frutos de extracto de *Physalis peruviana* al 12 % de etanol; (Kidane et al., 2018) reportan un porcentaje de inhibición de la alfa amilasa del  $25 \pm 2$  % con una concentración de 0.5 mg/dL de un extracto etanólico de *M. bengalensis*; (Nair, Kavrekar & Mishra, 2013) reportan un  $CI_{50}$  sobre la actividad enzimática de la alfa amilasa para los extractos metanólicos de *Cinnamomum zeylanicum* de 130.55  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , *Artocarpus altilis* de 118.88  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , *Betel* de *Piper* de 84.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y para *Artocarpus heterophyllus* de 70.58  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .; (Kazeem, Adamson & Ogunwande, 2013) reportan una  $IC_{50}$  de 2.30 mg/mL para un extracto acuoso de *Morinda lucida*.

### 3.4. Conclusiones

- Se logró la elaboración de un sistema nanoestructurado (nanopartículas poliméricas) con un copolímero de m-PEG-b-PCL, por el método DESEm, encapsulando un extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*, empleando una metodología previamente establecida.
- La caracterización de las NPs-Pp confirman la obtención de nanopartículas esféricas, mediante DLS y TEM, con tamaños, en su mayoría superiores a los de las nanopartículas vacías.

- Se estableció que el extracto de *Physalis peruviana*, queda incluido dentro del sistema nanoparticulado de acuerdo con los análisis realizados por IR, DSC y RMN.
- El comportamiento de liberación demostró la influencia del agente estabilizante en la velocidad a la que se da este proceso y se sustentó la posibilidad de que parte del extracto se encuentre adsorbido a la superficie de los sistemas.
- Se demostró que el extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* mantenía porcentajes de inhibición sobre la enzima alfa amilasa una vez liberado de las nanopartículas.

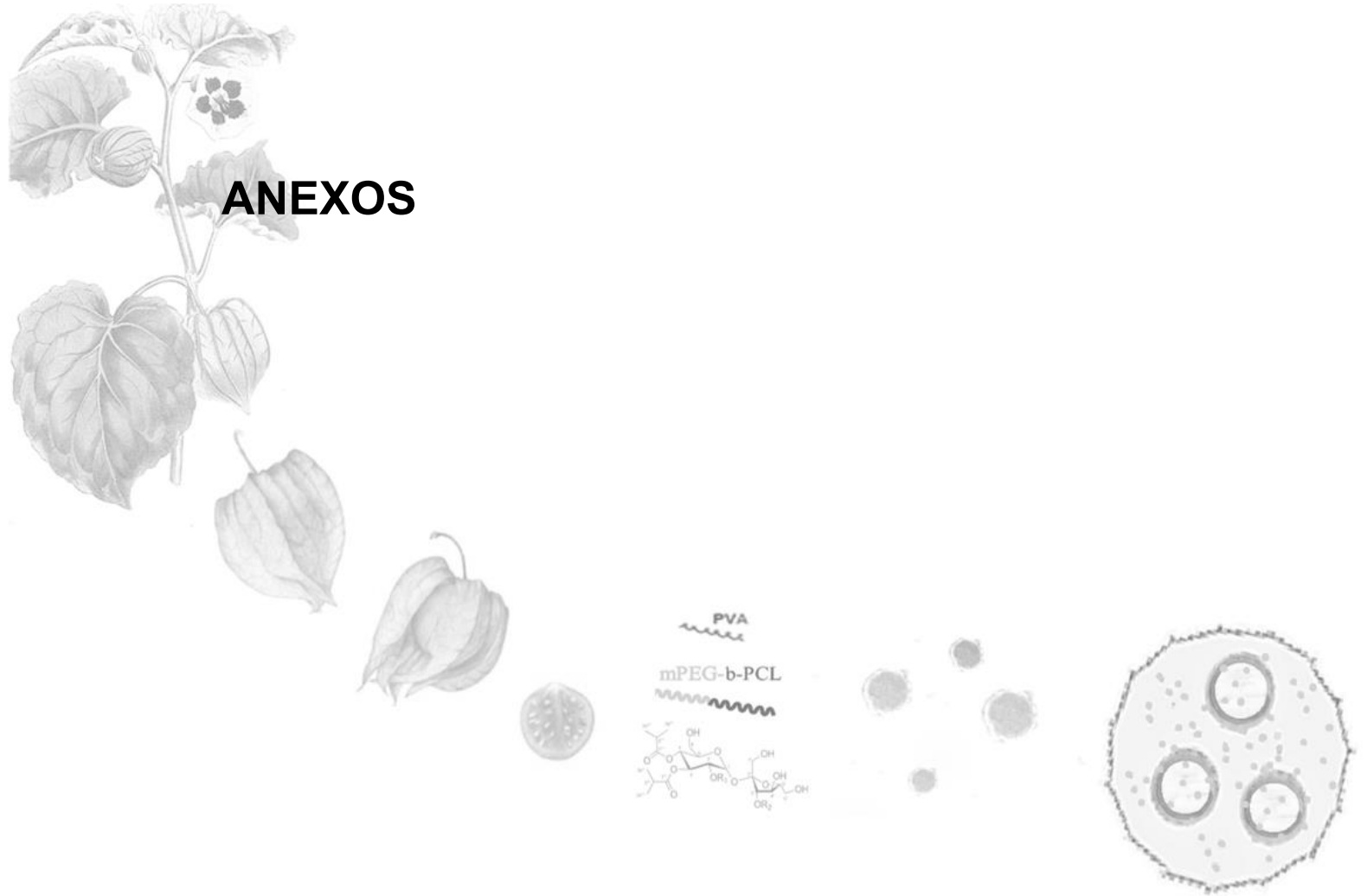
## Conclusiones generales

- Fue posible obtener NPs vacías y cargadas con un extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana* por medio de una metodología DESEm, empleando como estabilizantes mPEG-b-PCL 8 KDa (0.01, 0.03, 0.05, 0.1 %) y PVA 2%, con tamaños que oscilaron entre 150 y 250 nm, de forma esférica, con una potencial  $\zeta$  que va desde aproximadamente de -10 a -23 mV y una dispersión inferior a 0.281.
- Los resultados sugieren que el extracto etanólico de *Physalis peruviana* cargado en las NPs-Pp al ser liberado generan un aumento progresivo de los azúcares reductores liberados que corresponden con un aumento del porcentaje de inhibición de la alfa amilasa evaluada *in vitro*.
- Los resultados de esta tesis contribuyen al desarrollo de una futura formulación de un extracto de frutos de *Physalis peruviana*, en un sistema nanoestructurado, con posible inhibición de la alfa amilasa *in vitro*.

## Recomendaciones

- Para la trazabilidad de sistemas complejos, como lo son nanopartículas cargadas con extractos vegetales, se recomienda tener una metodología fácil, accesible y un marcador analítico ya estudiado, que permita la correlación y cuantificación adecuada del mismo, tanto en el extracto etanólico como en las NPs, ya que sin este se dificulta el análisis de este tipo de sistemas.
- Para poder correlacionar la concentración del extracto con respecto a su actividad inhibitoria se hace necesario contar con metodologías analíticas más sensibles, que permitan la trazabilidad del extracto y de su concentración.
- Se recomienda realizar ensayos de degradación y estabilidad de las NPs copoliméricas y asegurar que ningún producto de descomposición este generando falsos resultados.
- Se recomienda estudiar las condiciones de elaboración de las nanopartículas como concentración de la sustancia activa, copolímero, estabilizante y velocidad y tiempo de emulsificación 2, que permitan mejorar las características de los sistemas nanoestructurados a elaborar.

# ANEXOS





## A. Anexo: Resumen general de varias metodologías recopilando ventajas, desventajas, y principios activos a encapsular

Este anexo está basado en (Crucho & Barros, 2017; Mora-Huertas et al., 2010; Vauthier & Bouchemal, 2009).

**Tabla Anexo A-1.** Resumen general de varias metodologías recopilando ventajas, desventajas, y principios activos a encapsular.

Método de preparación	Ventajas	Desventajas
<b>Gelificación de las gotas de emulsión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posibilidad de utilizar macromoléculas naturales, hidrofílicas y biocompatibles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitado a la encapsulación de fármacos hidrofílicos.</li> </ul>
<b>Diálisis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método simple y común.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El gran volumen del medio de diálisis podría provocar una liberación prematura de la carga de las nanopartículas debido a la larga duración del proceso.</li> </ul>
<b>Doble emulsión- evaporación de disolvente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proporciona una ventaja de encapsulación de activos hidrófilos e hidrófobos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Partículas grandes y no uniformes (polidispersas).</li> <li>• Proceso de dos pasos.</li> <li>• La fuga del activo hidrofílico en la fase acuosa externa. Difícil de escalar.</li> </ul>
<b>Emulsificación -difusión del solvente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite la incorporación de fármacos termosensibles.</li> <li>• Reduce el tamaño de partícula medio y la distribución de tamaño estrecho.</li> <li>• Buena reproducibilidad de lote a lote.</li> <li>• Mayor atrapamiento de fármacos lipofílicos.</li> <li>• Proceso de escalado fácil.</li> <li>• Uso de solventes no tóxicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se requiere concentración de formulación final.</li> <li>• Posibles residuos de disolventes orgánicos en la formulación final.</li> <li>• Poca encapsulación de fármacos hidrofílicos.</li> <li>• Se requiere un tiempo más prolongado de agitación en emulsión.</li> <li>• Fugas de fármacos solubles en agua en la fase externa acuosa saturada.</li> <li>• Requieren un mayor volumen de agua para la formación de nanopartículas.</li> </ul>
<b>Emulsión simple- evaporación de disolvente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proporciona un alto atrapamiento de activos lipofílicos.</li> <li>• El tamaño de las partículas se puede ajustar cambiando la velocidad de homogeneización, la cantidad de estabilizador, la viscosidad de las fases orgánica y acuosa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atrapamiento de fármacos hidrofílicos es pobre.</li> <li>• Es difícil escalar.</li> <li>• Posible coalescencia de las nanogotículas durante el proceso de evaporación.</li> </ul>
<b>Formación de complejos polielectrolitos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil de lograr de acuerdo con la naturaleza del polielectrolito utilizado en exceso.</li> <li>• Se pueden sintetizar nanopartículas con carga positiva o negativa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesidad de optimizar la relación entre moléculas cargadas negativa y positivamente.</li> </ul>
<b>Formación de nanopartículas a partir de nanogeles neutros</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método libre de solvente orgánico liberación controlada del fármaco.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No es aplicable a fármacos hidrofílicos.</li> </ul>

Tabla Anexo A-1. (Continuación)

Método de preparación	Ventajas	Desventajas
<b>Homogeneización de alta presión (caliente y fría)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Buena reproducibilidad.</li> <li>Homogeneización bien establecida tecnología a gran escala.</li> <li>Método libre de solvente orgánico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proceso de alta temperatura.</li> <li>Alta energía de entrada.</li> <li>Se requiere equipo complejo.</li> <li>Posible degradación de los componentes causada por la homogeneización a alta presión.</li> </ul>
<b>Método de coacervación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Permite la incorporación de fármacos termosensibles.</li> <li>Económico para aplicaciones de laboratorio e industriales.</li> <li>Posibilidad de controlar la forma y el tamaño por las condiciones de reacción.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Posible degradación de los componentes en condiciones ácidas.</li> </ul>
<b>Método de inyección de solvente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fácil de manejar.</li> <li>producción rápida.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Posibles residuos de disolventes orgánicos en la formulación final.</li> </ul>
<b>Método de temperatura de inversión de fase</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Método libre de solvente orgánico.</li> <li>Método que no consume energía.</li> <li>Fácil de escalar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No es adecuado para moléculas termosensibles como péptidos o proteínas.</li> </ul>
<b>Nanopartículas obtenidas usando molino coloidal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Producción de emulsiones bien caracterizadas.</li> <li>Tamaño uniforme.</li> <li>Fácil de escalar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alta energía para el proceso de emulsificación.</li> </ul>
<b>Nanoprecipitación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Simple y rápido.</li> <li>Utiliza solventes no altamente tóxicos.</li> <li>Alta reproducibilidad por lotes.</li> <li>No requiere alto esfuerzo de corte.</li> <li>Partículas monodispersas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mayormente limitado a encapsulación activa hidrofóbica.</li> <li>El tamaño de las nanopartículas depende principalmente de la concentración del polímero.</li> </ul>
<b>Polimerización en emulsión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Es rápido y escalable.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se usan solventes y monómeros orgánicos tóxicos.</li> <li>Difícil eliminar monómeros residuales, iniciadores y surfactantes del producto final.</li> </ul>
<b>Procedimientos de un paso: métodos basados en la gelificación iónica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Método libre de solvente orgánico.</li> <li>Posibilidad de controlar la liberación de un fármaco encapsulado en las nanopartículas ante la acción de un pH o un estímulo de variación de la concentración iónica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Posible desintegración de partículas debido a la debilidad de las interacciones iónicas</li> </ul>
<b>Salting out</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se requiere un alto esfuerzo de corte.</li> <li>Aplicable a medicamentos sensibles al calor.</li> <li>Alta eficiencia de carga para drogas lipofílicas.</li> <li>Escalar fácilmente.</li> <li>Alta reproducibilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Paso de lavado extenso de nanopartículas.</li> <li>Exclusivamente aplicable solo a fármacos lipofílicos.</li> <li>Posible incompatibilidad entre las sales y los fármacos.</li> <li>La purificación es necesaria para eliminar electrolitos.</li> </ul>
<b>Técnica de microemulsión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduce el tamaño medio de partícula y la estrecha distribución del tamaño.</li> <li>Método libre de solvente orgánico.</li> <li>Sin proceso de consumo de energía.</li> <li>Fácil de escalar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alta concentración de surfactantes y co-tensoactivos.</li> <li>Se requiere concentración de formulación final.</li> </ul>
<b>Tecnología por fluidos supercríticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Son una alternativa. usan tecnología ecológica, fácil y reproducible escalar, buen control de la homogeneidad estructural y la producción de nanomedicina de alta pureza.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Requiere una gran inversión para equipos de alta presión.</li> <li>La mayoría de los polímeros presentan poca solubilidad o incluso no solubilidad en fluidos supercríticos.</li> </ul>

Tabla Anexo A-1. (Continuación)

Método de preparación	Ventajas	Desventajas
<b>Reacciones de policondensación interfaciales</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bajas concentraciones de surfactantes.</li><li>• Modulación del grosor de la nanocápsula variando la concentración de monómero.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Limitado a la encapsulación de fármacos lipofílicos.</li><li>• la purificación es necesaria.</li></ul>

## **B. Anexo: Procedimiento para la elaboración de las diferentes fases orgánicas y acuosas para la elaboración de las nanopartículas**

### **FASE ACUOSA (W1)**

- **FASE ACUOSA W1-PP**

Se pesó 750.5 mg del extracto etanólico de *Physalis peruviana*, los cuales fueron adicionados gota a gota con Ultra-Turrax® a 13 000 rpm por 4 min en 50 mL de agua desionizada para obtener una fase acuosa homogénea del extracto con una concentración final de 15 mg/mL.

### **FASE ACUOSA 2 (W2)**

- **PVA 2 % (100 mL)**

Para realizar una solución madre de PVA 2 %, se pesó 2000 mg, los cuales se disolvieron en agua desionizada con agitación magnética a 300 rpm y fueron llevados a un volumen final de balón de 100 mL.

- **mPEG-b-PCL 0.1 % (300 mL)**

Se pesaron 100 mg de mPEG-b-PCL 8 KDa, los cuales se disolvieron en 4 mL de diclorometano y fueron adicionados en agua desionizada gota a gota con Ultra-Turrax® hasta un volumen final de 100 mL a 13 000 rpm por 4 min, y dejando en agitación por 24 h a 300 rpm para asegurar la evaporación del DCM. Se repitió el mismo procedimiento 3 veces para obtener 300 mL.

- **mPEG-b-PCL 0.05 % (300 mL)**

Se pesaron 50 mg de mPEG-b-PCL 8 KDa, los cuales se disolvieron en 4 mL de diclorometano y fueron adicionados en agua desionizada gota a gota con Ultra-Turrax® hasta un volumen final de 100 mL a 13 000 rpm por 4 min, y dejando en agitación por 24 h a 300 rpm para asegurar la evaporación del DCM, y se repitió el mismo procedimiento 3 veces para obtener 300 mL.

- **mPEG-b-PCL 0.03 % (300 mL)**

Se pesaron 30 mg de mPEG-b-PCL 8 KDa, los cuales se disolvieron en 4 mL de diclorometano y fueron adicionados en agua desionizada gota a gota con Ultra-Turrax® hasta un volumen final de 100 mL a 13 000 rpm por 4 min y dejando en agitación por 24 h a 300 rpm para asegurar la evaporación del DCM. Se repitió el mismo procedimiento 3 veces para obtener 300 mL.

- **mPEG-b-PCL 0.01 % (300 mL)**

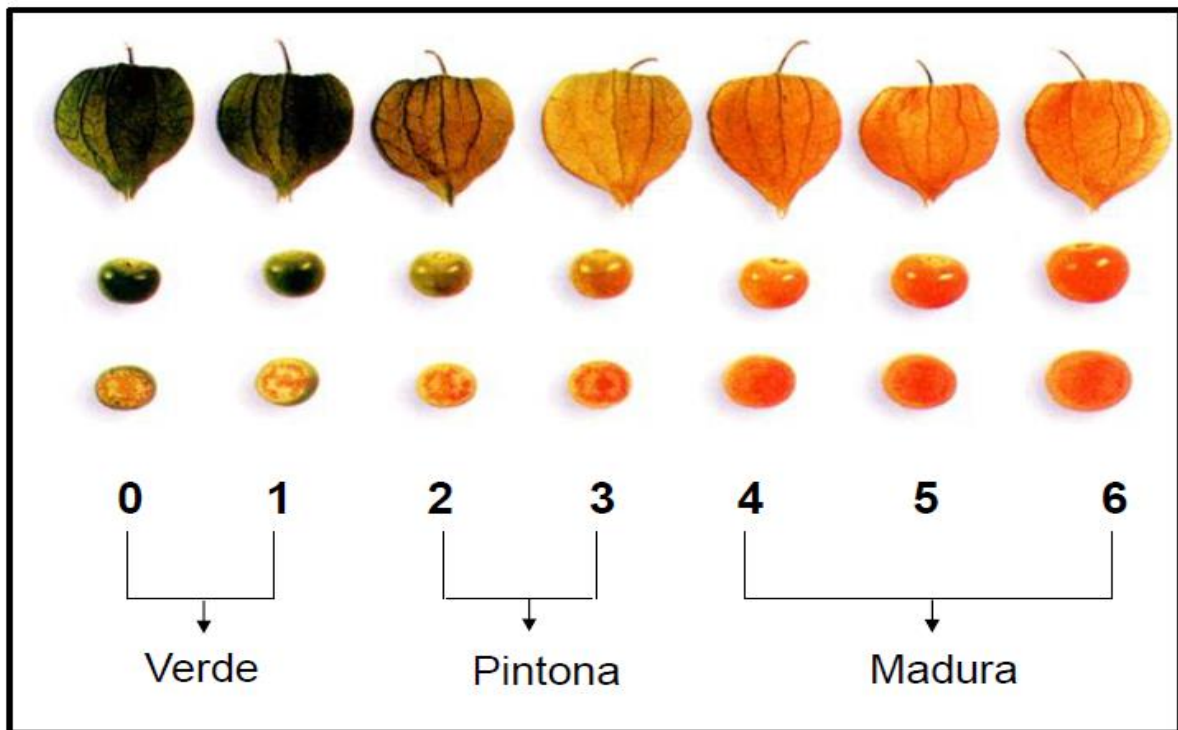
Se pesaron 10 mg de mPEG-b-PCL 8 KDa, los cuales se disolvieron en 4 mL de diclorometano y fueron adicionados en agua desionizada gota a gota con Ultra-Turrax®, hasta un volumen final de 100 mL a 13 000 rpm por 4 min y dejando en agitación por 24 h a 300 rpm para asegurar la evaporación del DCM, Se repitió el mismo procedimiento 3 veces para obtener 300 mL.

### **FASE ORGÁNICA (O)**

Para realizar una solución madre de mPEG-b-PCL aproximadamente ~46 KDa se pesó 1000 mg, los cuales se disolvieron en diclorometano y fueron llevados a un volumen final de balón de 100 mL para obtener una concentración final de 10 mg/mL.

### C. Anexo: Datos, procedimientos metodologías y demás respecto al extracto etanólico estandarizado de frutos de *Physalis peruviana*.

**Figura Anexo C-1.** Figura Cambios de color del fruto de *Physalis peruviana* L. según el estado de Madurez.



Fuente: Tomada de (Baena Aristizabal, 2015).

**Figura Anexo C-2.** Etapas involucradas en el proceso de obtención del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*



Fuente: Tomada de (Baena Aristizábal, 2015).

## **D. Anexo: Protocolo para evaluar la inhibición de alfa amilasa**

Para el correspondiente ensayo se utiliza: solución Buffer de Tris-HCl (0.05M, pH 6.9) que contiene cloruro de calcio 0.01 M, solución de enzima alfa amilasa de 2.11 U.I./mL, solución del sustrato almidón azul de 10 mg/mL, y como control positivo inhibidor se utiliza la acarbosa (774.5  $\mu$ M). El procedimiento para la elaboración de las anteriores soluciones y del ensayo es el siguiente. En primer lugar, se describe la elaboración de cada una de las soluciones como se ve a continuación, seguido de los pasos generales para la realización del ensayo. Se siguió el mismo protocolo establecido por (Rey, 2013) para poder ejecutar la evaluación del efecto de una sustancia sobre la inhibición de la enzima alfa amilasa:

Para este se pesan 21 g de Trizma Base (Sigma/Aldrich) y 4.4 g de CaCl<sub>2</sub> anhidro; se diluyen con un litro de agua destilada, para obtener una solución de 0.2 M de Tris, que contiene 0.04 M de CaCl<sub>2</sub>. Aparte se prepara una solución de ácido clorhídrico 0.01 M, para el cual se toma 1 mL de una solución de ácido clorhídrico 1 M y se lleva a volumen final de 100 mL. Seguido de esto, a 50 mL de la solución de Tris 0.2 M, que contiene CaCl<sub>2</sub> 0.04 M, se le agrega ácido clorhídrico 0.01 M hasta obtener pH 6.9 y se lleva a un volumen final de 200 mL con agua destilada para obtener un buffer de Tris-HCl (0.05 M pH 6.9) que contiene CaCl<sub>2</sub> 0.01 M (Rey, 2013).

**Enzima:** se deben pesar 15 mg de amilasa porcina pancreática Sigma A3170 y diluir en 1 mL del buffer; teniendo en cuenta que el producto contenía 22 UI/mg de sólido equivaliendo a 330 UI/mL; con base en esto, para obtener una concentración de 2 UI/mL, se toman 6 $\mu$ L de 330 UI/mL que se llevan a 1 mL para obtener la concentración deseada de 2 UI/mL (Rey, 2013).

**Sustrato:** pesar 15 mg de almidón azul Sigma S7776, los cuales se suspenden en 1 mL del buffer Tris-HCl 0.05M pH 6.9; para obtener una concentración de 10mg/mL se debe tomar 267  $\mu$ L de la solución de 15 mg/mL a un volumen de 0.4 mL para obtener la concentración deseada (Rey, 2013).



**Tabla Anexo D-1.** Procedimiento para la determinación de inhibición de alfa amilasa

Llevar a ebullición (100°C) 200µl de almidón azul (10mg/mL) por 5 min				
Incubar a 37°C por 5 minutos				
Reactivos	Blanco control	del Control (100% actividad enzimática)	Blanco de la muestra	Patrón o Muestra
Sustrato	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Alfa amilasa	-	100 µL	-	100 µL
Muestra	-	-	200 µL	200 µL
Buffer de Tris-HCl (0,05M, pH 6.9) que contiene CaCl <sub>2</sub> 0,01M	200 µL	200 µL	-	-
	100 µL	-	100 µL	-
Mezclar agitando vigorosamente				
Incubar a 37°C por 60min				
Centrifugar a 3000 rpm por 5 min a 4°C				
Medir Absorbancia a 100 µL del sobrenadante a 595nm				

**Variables fijas:** temperatura, concentración de la enzima, concentración de sustrato. Variables para determinar, concentración inhibitoria 50. Nota: elaborada a partir de (Bernal, 2016; Rey, 2013).

Para llevar a cabo el protocolo se tomó 200 µL del sustrato, los cuales fueron llevados a ebullición (100 °C) por 5 min y posteriormente se incubaron a 37 °C por 5 minutos. Seguido de esto se agregó 200 µL del inhibidor y 100 µL de solución de alfa amilasa 2 U./mL. La reacción fue llevada a cabo a 37 °C por 10 min. La mezcla de reacción fue centrifugada a 3000 rpm por 5 min a 4 °C. A 100 µL del sobrenadante, se le midió una absorbancia a 595 nm, utilizando un espectrofotómetro (Rey, 2013).

Las últimas 3 columnas de la placa se destinan para el blanco, en el cual se colocaban todos los reactivos, excepto la enzima. Para la última fila de la placa no se colocó inhibidor, definiendo este sistema como el 100 % de actividad enzimática. La inhibición de la alfa amilasa fue calculada de la siguiente forma (Rey, 2013):

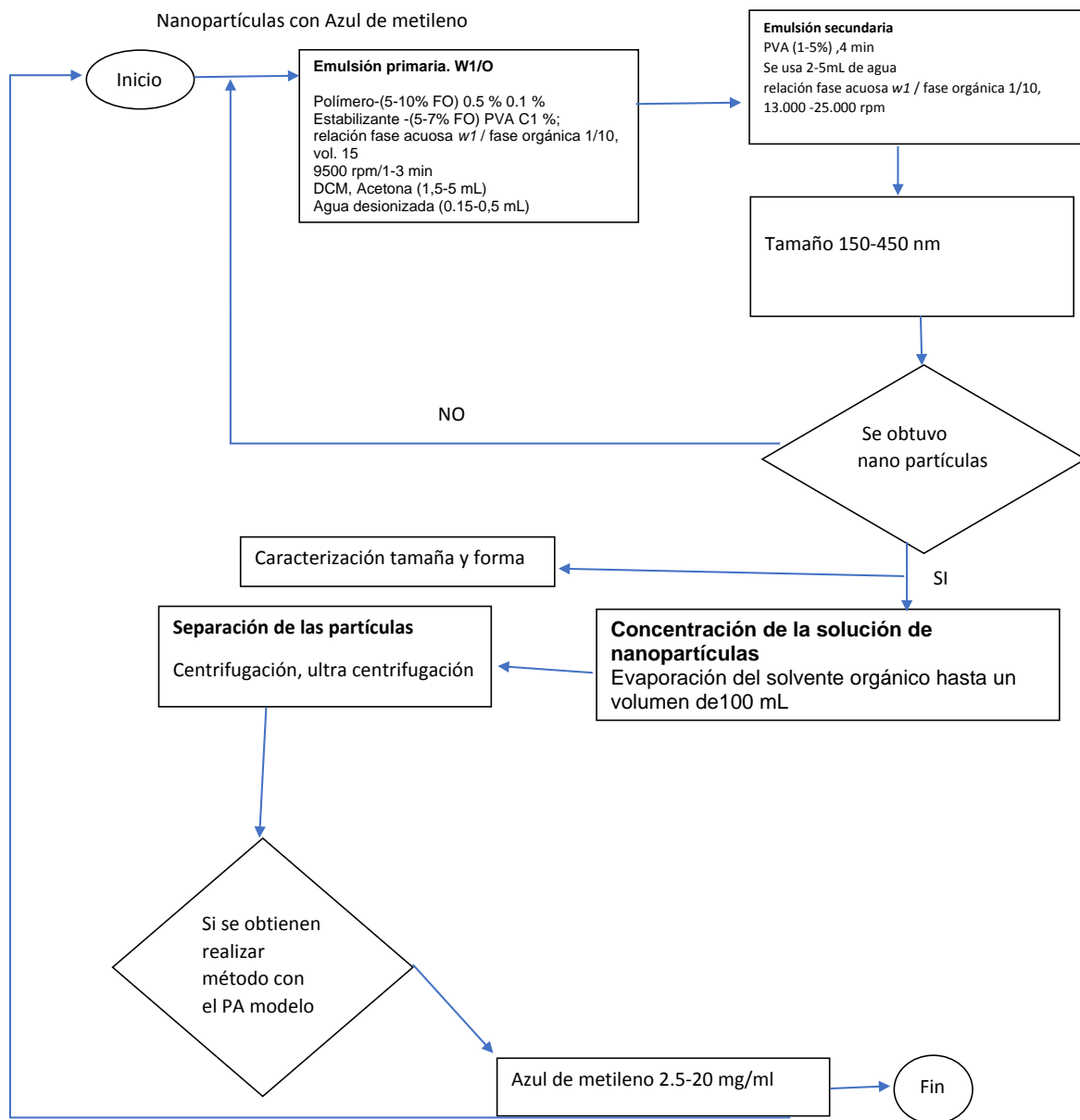
$$\% \text{ Inhibición PPA} = \frac{(Ac-Ab)-(Am-Ab)}{(Ac-Ab)} * 100 \quad (\text{Hansawasdi et al., 2000})$$

Donde  $A_c$  es la absorbancia del 100 % de la actividad enzimática (solo el vehículo con la enzima),  $A_m$  la muestra (con la enzima),  $A_B$  el blanco (vehículo sin la enzima).

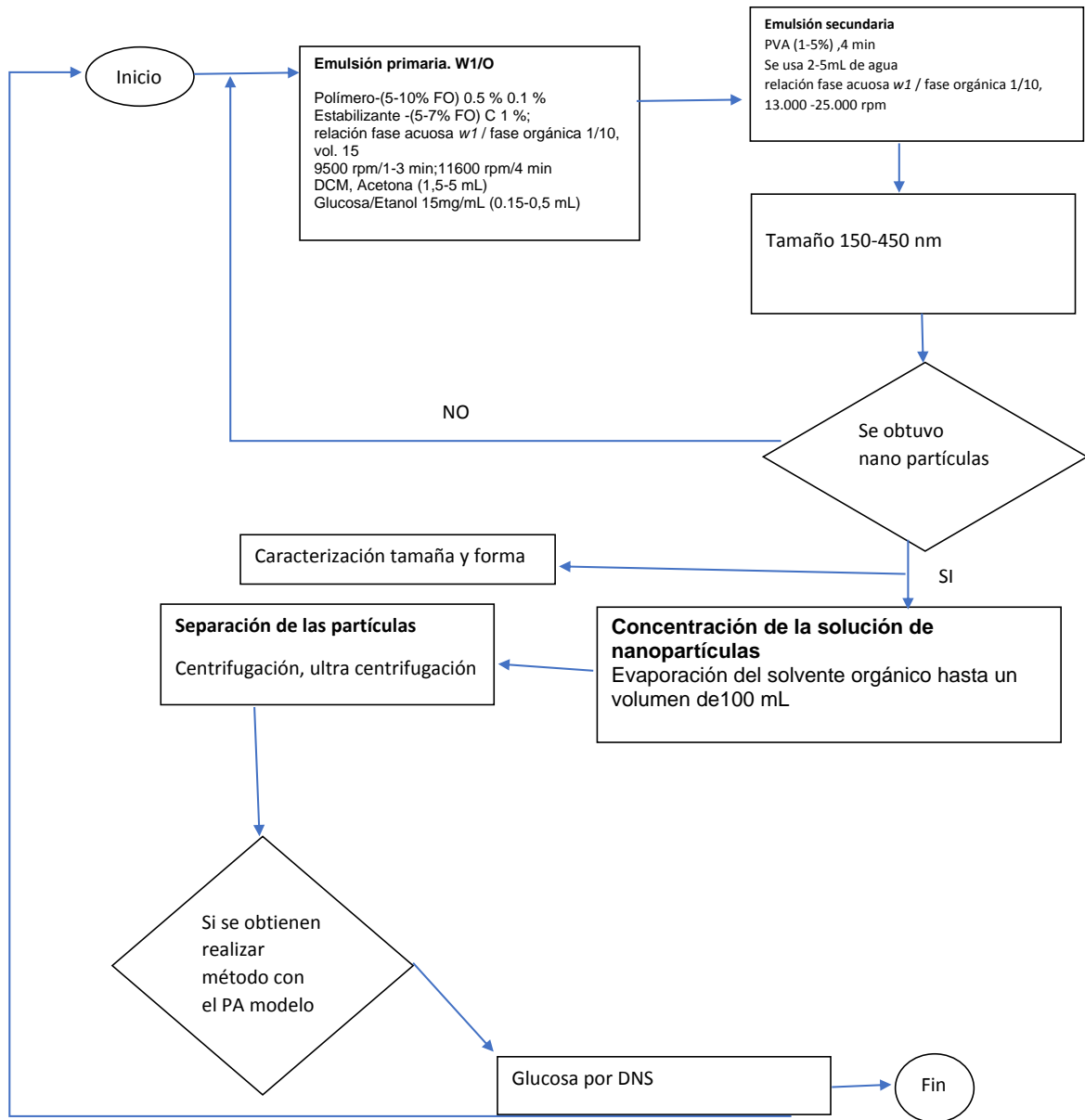
### **E. Anexo: pruebas preliminares nanopartículas procedimientos**

Una vez escogida la metodología DESEm para la elaboración de las NPs, fue necesario asegurar que esta metodología permitía encapsular sustancias activas con los materiales de partida escogidos, dando un indicio de cómo sería el comportamiento de la fase orgánica con el volumen de fase acuosa escogida, y de los tamaños de partículas obtenidos; además que estas pruebas preliminares permitieron establecer si se estaba cargando o no una sustancia activa de una manera rápida y fácil, puesto que las metodologías cualitativas o cuantitativas tanto para el azul de metileno como para la glucosa son de fácil acceso.

En primer lugar, las pruebas preliminares se hicieron con un colorante como el azul de metileno pues tanto visualmente como al verificar por espectroscopia UV-VIS permitían obtener información importante, y así saber si efectivamente estaba siendo cargado en las NPs. Posterior a esto se decidió estudiar una sustancia que se acercara a algún componente del extracto, pues como se sabe el extracto etanólico tiene un contenido de azúcares de 19 % (Bernal, 2016). Por eso se decidió hacer NPs cargadas con glucosa, lo cual también permitía una metodología de fácil acceso y rápida confirmación.



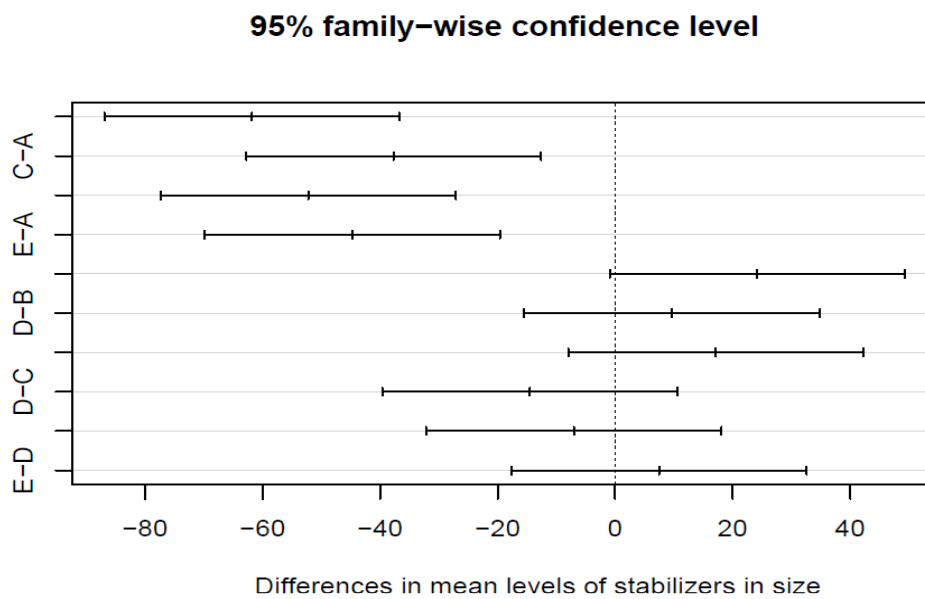
## Nanopartículas con Glucosa



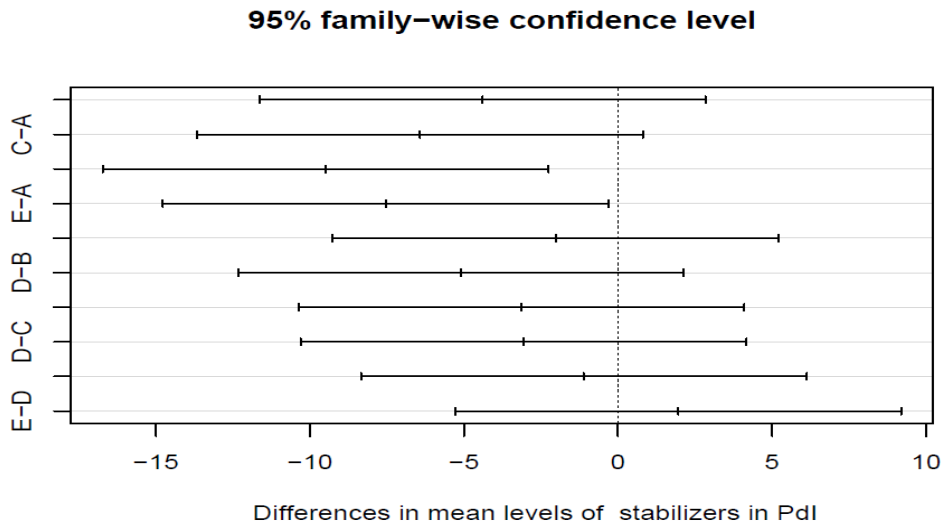
## F. Prueba Tukey para NPs

Los resultados de la prueba de Tukey se presentan para las siguientes NPs 2% PVA (A), 0.01 % mPEG-b-PCL 8 KDa (B), 0.03 % mPEG-b-PCL 8 KDa (C), 0.05 % mPEG-b-PCL 8 KDa (D), 0.1 % mPEG-b-PCL 8 KDa (E).

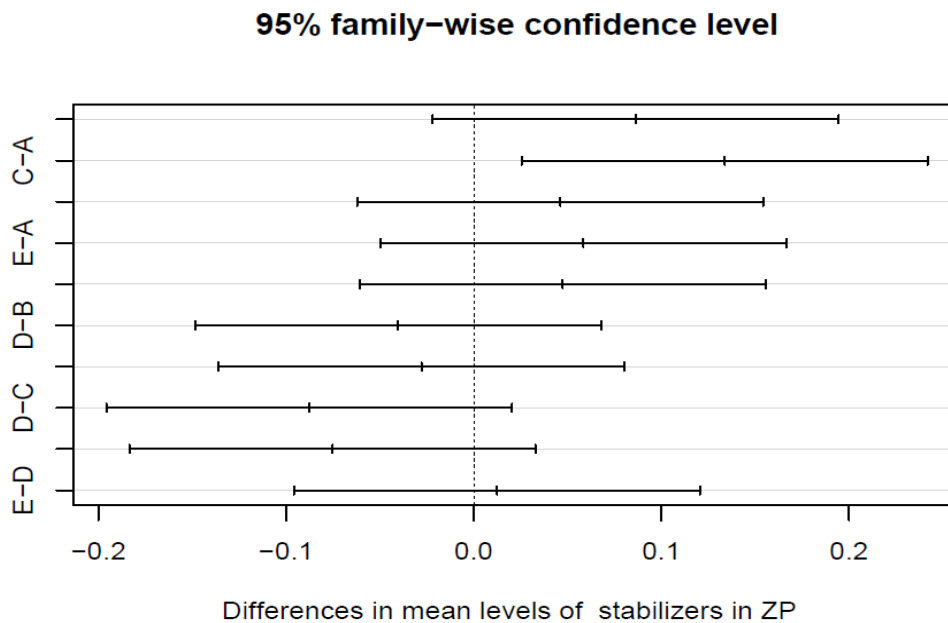
**Figura Anexo F-1.** Prueba de Tukey para las NPs cargadas con *Physalis peruviana* para los resultados de tamaño de partícula.



**Figura Anexo F-2.** Prueba de Tukey para las NPs cargadas con *Physalis peruviana* para los resultados de índice de polidispersidad.



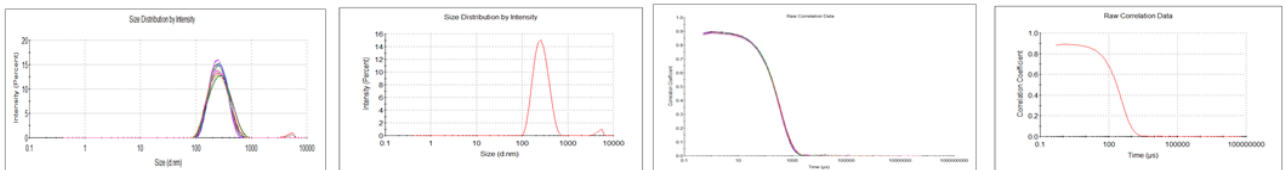
**Figura Anexo F-3.** Prueba de Tukey para las NPs cargadas con *Physalis peruviana* para los resultados de potencial  $\zeta$ .



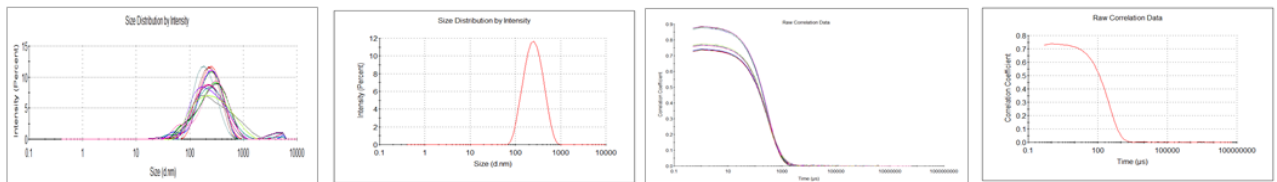
## G. Anexo: size distribution and correlation

Las gráficas muestran distribuciones unimodales, permitiendo obtener el tamaño promedio de las partículas.

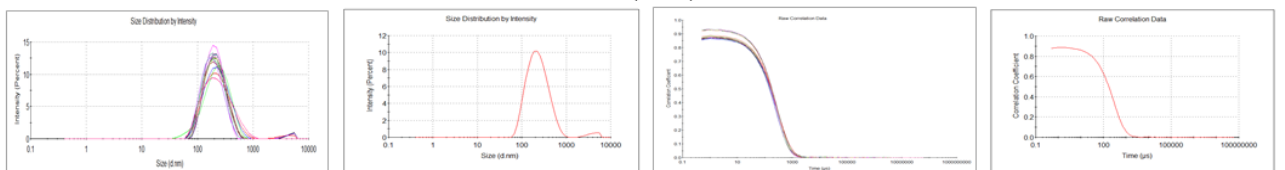
### NP PEG-PCL-2% PVA-PP R1, R2, R3



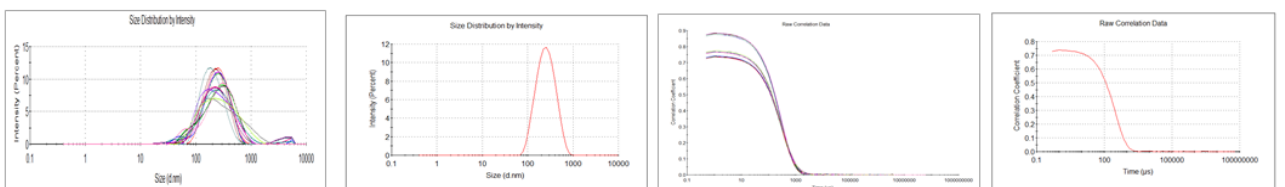
### NP PEG-PCL- 0.01 % PEG-PCL-PP R1,R2, R3



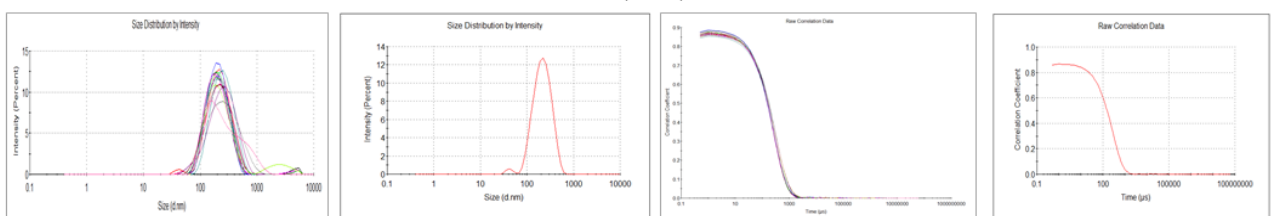
### NP PEG-PCL- 0.05 % PEG-PCL-PP R1,R2, R3



### NP PEG-PCL- 0.03 % PEG-PCL-PP R1,R2, R3

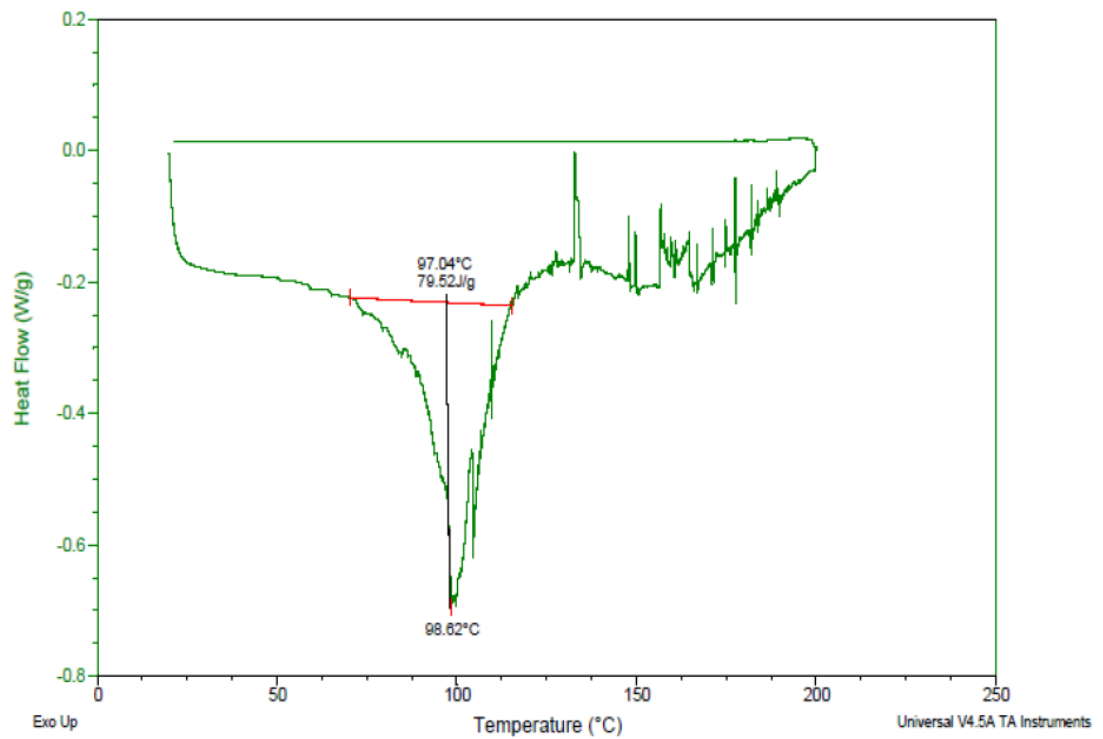


### NP PEG-PCL- 0.1 % PEG-PCL-PP R1,R2, R3



## H. Anexo: Termograma por DSC del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*

Figura Anexo H-1. Termograma por DSC del extracto etanólico de frutos de *Physalis peruviana*



Fuete: Tomado de (Baena Aristizabal, 2015).



## I. Anexo: Protocolo de evaluación de azúcares reductores

Para la evaluar los azúcares reductores el protocolo seguido por el miembro del grupo de investigación de macromoléculas tiene como base de referencia los siguientes documentos: official Methods of Analysis, AOAC, método n.º 968.28; official Methods of Analysis, AOAC, método n.º 923.09; official Methods of Analysis, AOAC, método n.º 920.175. Esta identificación o evaluación se basa en que los monosacáridos y algunos disacáridos (lactosa y maltosa) contienen un grupo aldehído o cetona libre, por lo cual actúan como agentes reductores. Las disoluciones de disacáridos no reductores, como la sacarosa, rinden monosacáridos por hidrólisis ácida, por un tratamiento adecuado se convierten en reductoras. Todos los métodos habituales antiguos de determinación química de hexosas y disacáridos están basados en el hecho de que las disoluciones neutras de estos azúcares (con o sin previa hidrólisis ácida) reducen las disoluciones alcalinas de las sales de los metales pesados; tal reacción es la que tiene lugar entre las disoluciones de azúcares y la de Fehling (AOAC, 2005).

### **Materiales y equipos utilizados**

Para este tipo de identificaciones se utiliza papel filtro Whatman n.º 40, Erlenmeyer de 250 mL, bureta digital de 25 ml, probetas de 250 y 25 ml, filtro fibra de vidrio 0.45 µm, vaso de precipitados de 100 y 50 ml, pipetas aforadas de 1 ml, 5 ml y 10 ml, balones aforados de 50 ml, 100 ml, 500ml y 1000 ml, vasos de precipitados de 250 ml, plancha de calentamiento con agitación (AOAC, 2005).

### **Materiales**

Para el procedimiento de azúcares reductores se usa azul de metileno, sulfato de cobre pentahidratado, tartrato de sodio y potasio, sacarosa, grado reactivo, hidróxido de aluminio, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio. La preparación de las soluciones realizadas a partir de los materiales anteriormente nombrados se describe a continuación (AOAC, 2005).

- **Solución a (Solución de sulfato de cobre):** para la cual se disuelven 34.639 g de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada, llevados a 500 mL, filtrados a través de papel de

filtro. Se determinó el contenido de cobre (Cu) de la solución y se ajustó a una concentración de 440.9 mg Cu /25 mL.

- **Solución b (Solución de tartrato alcalino):** disolver 173 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (sal de Rochelle) y 50 g de NaOH en  $\text{H}_2\text{O}$ , se diluyo a 500 mL, se dejó reposar durante 2 días y se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio (0,45  $\mu\text{m}$ ).
- **Solución de Fehling mixta:** la cual se preparará mezclando volúmenes iguales (5mL o 12,5mL) de las soluciones (a) y (b) inmediatamente antes de su uso.
- **Solución de NaOH 1 M:** pesar 40 g de hidróxido de sodio y diluir a 1 L con agua destilada.
- **Azul de metileno 0,2 %:** pesar con precisión 200 mg de clorhidrato de azul de metileno y diluir en 100 mL de agua destilada.
- **Hidróxido de aluminio 10 %:** pesar 100 g de hidróxido de aluminio y diluir a 1 L con agua destilada.

**Determinación del porcentaje de azúcares totales en la muestra:** al finalizar la prueba se determina el porcentaje o la concentración de azúcares reductores en la muestra de la siguiente manera (Ecuación 13):

$$\% \text{ Azucares totales} = \frac{V_M * T}{W_M * V_{\text{Titulación}}} * FD * 100 \text{ (Ecuación 13)}$$

Donde:

$V_M$  = Volumen al que se llevó la disolución inicial de la muestra (mL).

$T$  = Equivalencia de la solución de Fehling A. (g)

$W_M$  = Peso de la muestra. (g)

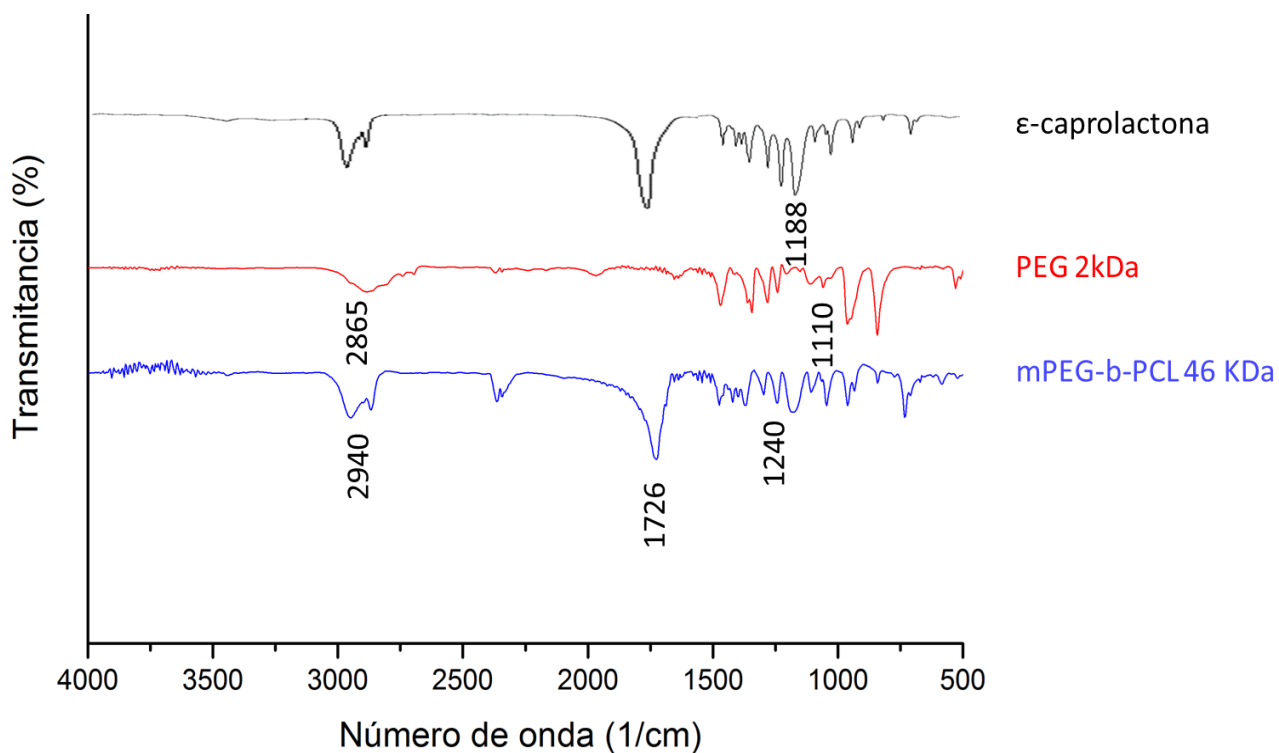
$V_{\text{Titulación}}$  = Volumen de titulación. (mL)

$FD$  = Factor de dilución

**Nota:** Si se elige otro volumen final u otro peso según lo descrito en el anterior protocolo, deberá hacer los correspondientes recálculos y de esa manera mantener el factor de dilución.

## J. Anexo: Espectro FT-IR de los materiales de partida para la síntesis del copolímero

El espectro de los materiales de partida se muestra a continuación con respecto a la  $\epsilon$ -caprolactona, PEG 2KDa en comparación con el copolímero mPEG-b-PCL -46 KDa. Estos espectros confirman la presencia de los principales grupos funcionales de estos. De esa manera, se observa que el PEG de 2kDa, presenta la banda correspondiente al estiramiento del grupo éter C–O–C a  $1100\text{ cm}^{-1}$ , de igual manera se observan las vibraciones debidas al estiramiento del grupo metileno -CH<sub>2</sub> en  $2865\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro del PEG-b-PCL, aparece la banda de absorción acentuada característica del estiramiento del grupo éster (C=O) a  $1726\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la señal intensa del grupo carbonilo.





## Bibliografía

- Abu Hassan, N. A., Sahudin, S., Hussain, Z., & Hussain, M. (2018). Self-Assembled Chitosan Nanoparticles for Percutaneous Delivery of Caffeine: Preparation, Characterization and *in Vitro* Release Studies. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 10(4). <https://doi.org/10.22159/ijap.2018v10i4.25947>
- Agronegocios (2016). Uchuva, el fruto que rompe fronteras. Recuperado de <https://www.agronegocios.co/agricultura/uchuva-el-fruto-que-rompe-fronteras-2622244>
- Al haushey, L., Bolzinger, M. A., Bordes, C., Gauvrit, J. Y., & Briançon, S. (2007). Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. *International Journal of Pharmaceutics*, 344(1–2), 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.067>
- Alberto, C., & Rodríguez, B. (2012). *Contribución al estudio farmacotécnico del extracto estandarizado de frutos de Physalis peruviana L. con miras a la obtención de un producto fitoterapéutico* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/9016/1/192546.2012.pdf>
- Alfonso, K. (2017a). Frutas exóticas viven su cuarto de hora en el mercado de Europa. Recuperado de <https://www.agronegocios.co/agricultura/frutas-exoticas-viven-su-cuarto-de-hora-en-el-mercado-de-europa-2622992>
- Alfonso, K. (2017b). La uchuva duplica exportaciones a EE.UU. Recuperado de <http://www.agronegocios.co/noticia/la-uchuva-duplica-exportaciones-eeuu>.
- Alvarez, R., Gómez, M. (2009). *Influencia del estado de maduración sobre la composición y las Características de Calidad de frutos de Physalis peruviana como materia prima para la elaboración de fitoterapéutico* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- American Diabetes Association (2019). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2019. *Diabetes Care*, 42(1), S13-S28. <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>
- Amuri, B., Maseho, M., Simbi, L., Okusa, P., Duez, P., & Byanga, K. (2017). Hypoglycemic and Antihyperglycemic Activities of Nine Medicinal Herbs Used as Antidiabetic in the

- Region of Lubumbashi (DR Congo). *Phytotherapy Research*, 31(7), 1029-1033. <https://doi.org/10.1002/ptr.5814>
- AOAC (2005). *AOAC Official Method 923.09. "Invert sugar in sugars and syrups. Lane-Eynon General Volumetric Method. Final action.* AOAC
- Arana, L., Salado, C., Vega, S., Aizpurua-olaizola, O., De, I., Suarez, T., ... Alkorta, I. (2015). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Solid lipid nanoparticles for delivery of *Calendula officinalis* extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.020>
- Ascher, K. R., Nemny, N. E., Eliyahu, M., Kirson, I., Abraham, A., & Glotter, E. (1980). Insect antifeedant properties of withanolides and related steroids from Solanaceae. *Experientia*, 36(8), 998-999. <https://doi.org/10.1007/BF01953844>
- Bach, J. F. (1994). Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrine Reviews*, 15(4), 516-542. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-4-516>
- Baena Aristizábal, C. M. (2015). *Vectorización del extracto de Physalis peruviana L. en nuevos sistemas de liberación de uso farmacéutico* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/52419/>
- Baena-Aristizábal, C. M., Fessi, H., Elaissari, A., & Mora-Huertas, C. E. (2016). Biodegradable microparticles preparation by double emulsification-Solvent extraction method: A Systematic study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 492, 213–229. doi: 10.1016/j.colsurfa.2015.11.067
- Bagheri, L., Madadlou, A., Yarmand, M., & Mousavi, M. E. (2014). Spray-dried alginate microparticles carrying caffeine-loaded and potentially bioactive nanoparticles. *Food Research International*, 62, 1113-1119. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.040>
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237, 623-631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.142>
- Bazana, M. T., da Silva, S. S., Codevilla, C. F., de Deus, C., Lucas, B. N., Ugalde, G. A., ... de Menezes, C. R. (2019). Development of nanoemulsions containing *Physalis peruviana* calyx extract: A study on stability and antioxidant capacity. *Food Research International*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108645>

- Bell, J. G. (2019). En lo corrido del año colombia ha exportado 122 toneladas de uchuva a Estados Unidos. Recuperado de <https://www.agronegocios.co/agricultura/en-lo-corrido-del-ano-colombia-ha-exportado-122-toneladas-de-uchuva-a-estados-unidos-2841318>
- Benzie, I. F., & Wachtel-Galor, S. (Eds.) (2011). *Herbel Medicine Biomolecular and clinical aspects*. Herbel Medicine Biomolecular and clinical aspects. Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1063/1.2756553>
- Bernal, C. A. (2016). *Desarrollo de un sistema de liberación modificada de un extracto estandarizado de Physalis peruviana L. aplicando el método de secado*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/62574/1/Carlos%20Bernal%2080049977.pdf>
- Bernal, C. A., Castellanos, L., Aragón, D. M., Martínez-Matamoros, D., Jiménez, C., Baena, Y., & Ramos, F. A. (2018). Peruvioses A to F, sucrose esters from the exudate of *Physalis peruviana* fruit as  $\alpha$ -amylase inhibitors. *Carbohydrate Research*, 461, 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.03.003>
- Bernal, C. A., Aragón, M., & Baena, Y. (2016). Dry powder formulation from fruits of *Physalis peruviana* L. standardized extract with hypoglycemic activity. *Powder Technology*, 301, 839–847. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.07.008>
- Bernal, C. A., Ramos, F. A., & Baena, Y. (2019). Dry powder formulation from *Physalis peruviana* L. fruits extract with antidiabetic activity formulated via co-spray drying. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(3), 109-117. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i3.29520>
- Bhattacharjee, S. (2016). Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bischoff, H. (1994). Pharmacology of  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*, 24(3), 3-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1994.tb02249.x>
- Bula, J., & Cruz, A. (1993). *Comprobación de la actividad hipoglicemiante por vía oral de Physalis peruviana* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Cagel, M., Tesan, F. C., Bernabeu, E., Salgueiro, M. J., Zubillaga, M. B., Moretton, M. A., & Chiappetta, D. A. (2017). Polymeric mixed micelles as nanomedicines: Achievements and perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and*

- Biopharmaceutics*, 113, 211-228. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.019>
- Calixto, J. B. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(2), 179-189. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000200004>
- Cañari, C., Nieva, A., & Maruenda, H. (2012). NMR Metabolic Profiling of Two Exotic Native Fruits from Peru: *Vanilla pompona* ssp *Grandiflora* and *Physalis peruviana* L. En *SMASH 2012 NMR Conference, september 9th-12th, Providence, Rhode Island* (p. 127). SMASH-NMR
- Chiang, C. S., Hu, S. H., Liao, B. J., Chang, Y. C., & Chen, S. Y. (2013). Enhancement of cancer therapy efficacy by trastuzumab-conjugated and pH-sensitive nanocapsules with the simultaneous encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.07.009>
- Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., & Golomb, G. (2009). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 133(2), 90-95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.073>
- Crucho, C. I., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C*, 80, 771-784. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>
- Date, A., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. *Journal of Controlled Release*, 240, 504-526. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.016>
- Dewi, L., Sulchan, M., & Kisdjamiatun. (2018). Potency of cape gooseberry (*Physalis peruviana*) juice in improving antioxidant and adiponectin level of high fat diet streptozotocin rat model. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis.*, 25(3), 253-260. <https://doi.org/10.2478/rjdnmd-2018-0029>
- Ding, S., Serra, C. A., Vandamme, T. F., Yu, W., & Anton, N. (2018). Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *Journal of Controlled Release*, 235, 31-49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.037>
- Dubey, N., Varshney, R., Shukla, J., Ganeshpurkar, A., Hazari, P. P., Bandopadhyaya, G.



- P., ... Trivedi, P. (2012). Synthesis and evaluation of biodegradable PCL/PEG nanoparticles for neuroendocrine tumor targeted delivery of somatostatin analog. *Drug Delivery*, 19(3), 132-142. <https://doi.org/10.3109/10717544.2012.657718>
- Echeverry, S. M., Valderrama, I. H., Costa, G. M., Ospina-Giraldo, L. F., & Aragón, D. M. (2018). Development and optimization of microparticles containing a hypoglycemic fraction of calyces from *Physalis peruviana*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(5), 10-18. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8502>
- Esfanjani, A. F., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Mohammadi, A. (2015). Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 165, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.022>
- Esmaeili, A., & Asgari, A. (2015). *In vitro* release and biological activities of Carum copticum essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.010>
- Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ácido cítrico (n.d.). Recuperado de [https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre\\_index.cgi](https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi)
- Fievez, V., Plapied, L., des Rieux, A., Pourcelle, V., Freichels, H., Wascotte, V., ... Préat, V. (2009). Targeting nanoparticles to M cells with non-peptidic ligands for oral vaccination. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73(1), 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.04.009>
- Flórez, V., Fisher, G., & Sora, Á. (2000). *Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (Physalis peruviana L.)*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Forero, D. (2008). *Desarrollo de una metodología para la obtención y caracterización de un extracto estandarizado de Physalis peruviana L. y propuesta para su adecuación tecnológica* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Furniss, B., Hannaford, A., Smith, P., & Tatchell, A. (1990). *Vogel's textbook of practical organic chemistry* (5th ed.). New York: Longman scientific & Technical.
- Gaignaux, A., Réeff, J., Siepmann, F., Siepmann, J., De Vriese, C., Goole, J., & Amighi, K. (2012). Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 437, 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.006>
- Gamboa Ortiz, J. (2010). *Ensayo clínico patogenésico sobre los cálices de Physalis*

- peruviana* L (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/3797/1/598305.2010.pdf>
- Gao, X., Gou, B., Huang, M., Huang, N., Qian, F., Wei, F., ... Liu, Y. (2013). Preparation, characterization and application of star-shaped PCL/PEG micelles for the delivery of doxorubicin in the treatment of colon cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 8(1), 971-982. <https://doi.org/10.2147/IJN.S39532>
- García, A. T., & Súa, S. (1997). *Evaluación de la actividad hipoglicemiante de algunas fracciones obtenidas de frutos de Physalis peruviana* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Garti, N. (1997). Double emulsions -scope, limitations and new achievements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 233-246.
- Garti, N., & Bisperink, C. (1998). Double emulsions: progress and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3(6), 657-667. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(98\)80096-4](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(98)80096-4)
- González, I., Cabrera, M., & Bermejo, M. (2015). *Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos*. Elche: Universidad Miguel Hernández.
- Grossen, P., Witzigmann, D., Sieber, S., & Huwyler, J. (2017). PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application. *Journal of Controlled Release*, 260, 46-60. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.028>
- Guirguis, O. W., & Moselhey, M. T. (2012). Thermal and structural studies of poly(vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends. *Natural Science*, 4(1), 57-67. <https://doi.org/10.4236/ns.2012.41009>
- Gumustas, M., Sengel-turk, C. T., & Gumustas, A. (2017). *Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5/00005-8>
- Hansawasdi, C., Kawabata, J., & Kasai, T. (2000).  $\alpha$ -amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) Tea. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(5), 1041-1043. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1041>
- Hassan, H. A., Serag, H. M., Qadir, M. S., & Ramadan, M. F. (2017). Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) juice as a modulator agent for hepatocellular carcinoma-linked apoptosis and cell cycle arrest. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 94, 1129-1137.

- <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.014>
- Hillery, A., Lloyd, A., & Swarbrick, J. (2001). Drug Delivery and Targeting; for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. *Drug Targeting*, 10(8), 637. <https://doi.org/10.1080/1061186021000040848>
- Holt, P. R., Atillasoy, E., Lindenbaum, J., Ho, S. B., Lupton, J. R., McMahon, D., & Moss, S. F. (1996). Effects of acarbose on fecal nutrients, colonic pH, and short-chain fatty acids and rectal proliferative indices. *Metabolism*, 45(9), 1179-1187. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(96\)90020-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0026-0495(96)90020-7)
- Hoyos, T. N., Arteaga, M. V., & Muñoz, M. (2011). Factores de no adherencia al tratamiento en personas con Diabetes Mellitus tipo 2 en el domicilio. La visión del cuidador familiar. *Investigación y Educación en Enfermería*, 29(2), 194-203.
- Huang, Y., Li, L., & Li, G. (2015). An enzyme-catalysed access to amphiphilic triblock copolymer of PCL-b-PEG-b-PCL: Synthesis, characterization and self-assembly properties. *Designed Monomers and Polymers*, 18(8), 799-806. <https://doi.org/10.1080/15685551.2015.1078113>
- Ibraheem, D., Iqbal, M., Agusti, G., Fessi, H., & Elaissari, A. (2014). Effects of process parameters on the colloidal properties of polycaprolactone microparticles prepared by double emulsion like process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445, 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.01.012>
- IDF (International Diabetes Federation) (2019). *IDF Diabetes Atlas 2019* (9th ed.). Bélgica: IDF. <https://doi.org/10.1289/image.ehp.v119.i03>
- Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 496, 173-190. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.057>
- Izunobi, J. U., & Higginbotham, C. L. (2011). Polymer molecular weight analysis by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Journal of Chemical Education*, 88(8), 1098-1104. <https://doi.org/10.1021/ed100461v>
- Jenkins, S. (2011). *Hansen solubility parameters (HSP)*. *Chemical Engineering* (118) (2<sup>a</sup> ed.). New York: Taylor & Francis Group.
- Jeong, Y. Il, Na, H. S., Seo, D. H., Kim, D. G., Lee, H. C., Jang, M. K., ... Nah, J. W. (2008). Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 352, 317-323.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.001>
- Kasali, F. M., Kadima, J. N., Mpiana, P. T., Ngbolua, K., & Tshibangu, D. S. (2013). Assessment of antidiabetic activity and acute toxicity of leaf extracts from *Physalis peruviana* L. in guinea-pig. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(11), 841-846. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60166-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60166-5)
- Kazeem, M. I., Adamson, J. O., & Ogunwande, I. A. (2013). Modes of Inhibition of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase by Aqueous Extract of *Morinda lucida* Benth Leaf. *BioMed Research International*, (3), 1-6.
- Khoe, S., & Yaghoobian, M. (2008). An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 2392-2399. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.09.045>
- Kidane, Y., Bokrezion, T., Mebrahtu, J., Mehari, M., Gebreab, Y. B., Fessehaye, N., & Achila, O. O. (2018). *In vitro* inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by extracts from *Psiadia punctulata* and *Meriandra bengalensis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2164345>
- Kim, Y., Sc, M., Jeong, Y., Sc, M., ... Wang, M. (2005). Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia, 21, 756-761. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.10.014>
- Krentz, A. J., & Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents: Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 65(3), 385-411. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565030-00005>
- Kwon, Y. I., Vattem, D. A., & Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1), 107-118. <https://doi.org/10.1210/er.19.5.583>
- Lamprecht, A., Ubrich, N., Hombreiro Pérez, M., Lehr, C.-M., Hoffman, M., & Maincent, P. (2000). Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(2), 17-182. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00422-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00422-6)
- Leung, L., Birtwhistle, R., Kotecha, J., Hannah, S., & Cuthbertson, S. (2009). Anti-diabetic and hypoglycaemic effects of *Momordica charantia* (bitter melon): A mini review. *British Journal of Nutrition*, 102(12), 1703-1708.

- <https://doi.org/10.1017/S0007114509992054>
- Li, R., Li, X., Xie, L., Ding, D., Hu, Y., Qian, X., ... Liu, B. (2009). Preparation and evaluation of PEG-PCL nanoparticles for local tetradrine delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 379(1-2), 158-166. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.06.007>
- Liang, Y., Peng, X., Chen, Y., Deng, X., Gao, W., Cao, J., ... He, B. (2015). Chain length effect on drug delivery of chrysin modified mPEG-PCL micelles. *RSC Advances*, 5(73), 59014-59021. <https://doi.org/10.1039/C5RA09650B>
- Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32, 711-726. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.006>
- Liu, Z., Jiang, M., Kang, T., Miao, D., Gu, G., Song, Q., ... Chen, J. (2013). Lactoferrin-modified PEG-co-PCL nanoparticles for enhanced brain delivery of NAP peptide following intranasal administration. *Biomaterials*, 34(15), 3870-3881. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.003>
- Lourenco, C., Teixeira, M., Simões, S., & Gaspar, R. (1996). Steric stabilization: size and surface properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 138(1), 1-2.
- Lu, Z., Bei, J., & Wang, S. (1999). A method for the preparation of polymeric nanocapsules without stabilizer. *Journal of Controlled Release*, 61(1-2), 107-112.
- Ma, J., Feng, P., Ye, C., Wang, Y., & Fan, Y. (2001). An improved interfacial coacervation technique to fabricate biodegradable nanocapsules of an aqueous peptide solution from polylactide and its block copolymers with poly(ethylene glycol). *Colloid and Polymer Science*, 279, 387-392. <https://doi.org/10.1007/s003960000467>
- MacLean, D. B., & Luo, L. G. (2004). Increased ATP content/production in the hypothalamus may be a signal for energy-sensing of satiety: Studies of the anorectic mechanism of a plant steroidal glycoside. *Brain Research*, 1020, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.04.041>
- Mahmoudi, R., Tajali Ardakani, M., Hajipour Verdom, B., Bagheri, A., Mohammad-Beigi, H., Aliakbari, F., Bardania, H. (2019). Chitosan nanoparticles containing *Physalis alkekengi* L. extract: preparation, optimization and their antioxidant activity. *Bulletin of Materials Science*, 42(3), 131. <https://doi.org/10.1007/s12034-019-1815-3>
- Maldonado, E., Torres, F. R., Martínez, M., & Perz-Castorena, A. L. (2006). Sucrose esters from the fruits of *Physalis nicandroides* var. *attenuata*. *Journal of Natural Products*,

- 69(19), 1511-1513.
- Mardiyanto, V. (2013). Investigation of Nanoparticulate Formulation Intended for Caffeine Delivery to Hair Follicles (Tesis de doctorado). Universidad de Sarres. Saarland. Alemania.
- Marques, T. A., Rampazo, É. M., Zilliani, R. R., Marques, P. A., & Benincasa, F. (2016). Automated sugar analysis. *Food Science and Technology*, 36(1). <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0012>
- Martinez, N. Y., Andrade, P. F., Durán, N., & Cavalitto, S. (2017). Development of double emulsion nanoparticles for the encapsulation of bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158, 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.033>
- Maruenda, H., Cabrera, R., Cañari-chumpitaz, C., Lopez, J. M., & Toubiana, D. (2018). NMR-based metabolic study of fruits of *Physalis peruviana* L. grown in eight different Peruvian ecosystems. *Food Chemistry*, 262, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.032>
- Medina, D. . (2012). *Implementación de una metodología para la obtención de metabolitos secundarios que pueden ser utilizados como marcadores a partir de los frutos de Physalis peruviana (solanaceae), y evaluación de actividad hipoglucemiante* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Melo, A., & Urrea, J. (2009). *Determinación de la influencia de las variables de extracción sobre el contenido de marcadores (witanolidos y glicoalcaloides) y el rendimiento en la obtención de un extracto de Physalis peruviana (uchuva)* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Méndez-Sánchez, N., & Chávez Tapia, N. (2010). *Gastroenterología* (2ª ed.). McGraw Hill. Recuperado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1480&sectionid=92819827>
- Ministerio de la protección social. (2008). *Vademécum colombiano de plantas medicinales*. Recuperado de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SA/vademecum-colombiano-plantas-medicinales.pdf>
- Ministerio de Salud y de Protección Social. (2015). *Diabetes mellitus tipo 1 mayores de 15*

- años. Bogotá: Ministerio de Salud y de Protección Social.
- Mohammed, Z. H., & Ibraheem, R. M. (2015). Anti-oxidant Activity of Methanol Extracts of *Arum maculatum* L. and *Physalis peruviana* L. Plants. *Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science*, 28(2), 1-7.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
- Mora, Á. C., Aragón, D. M., & Ospina, L. F. (2010). Effects of *Physalis peruviana* fruit extract on stress oxidative parameters in streptozotocin-diabetic rats. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(7), 1132-1136.
- Mu, J., Meng, X., Chen, L., Lu, Z., Mou, Q., Li, X., ... Yue, H. (2017). Highly stable and biocompatible W18O49@PEG-PCL hybrid nanospheres combining CT imaging and cancer photothermal therapy. *RSC Advances*, 7(18), 10692-10699. <https://doi.org/10.1039/c6ra28161c>
- Nair, S. S., Kavrekar, V., & Mishra, A. (2013). *In vitro* studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), 128-132.
- Narkhede, A., Nirmal, P., Tupe, R., Kulkarni, O., Harsulkar, A., & Jagtap, S. (2012). *In vitro* Antioxidant, Antiglycation and  $\alpha$  - amylase inhibitory potential of *Eulophia ochreatea* L. *Journal of Pharmacy Research*, 5(5), 2532-2537.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2017). Prediabetes & Insulin Resistance. Recuperado de [http://pacificschoolserver.org/content/\\_public/Health%20and%20Safety/Non-Communicable%20Diseases/Diabetes%2C%20Prediabetes%20\\_%20Insulin%20Resistance%20\\_%20NIDDK.pdf](http://pacificschoolserver.org/content/_public/Health%20and%20Safety/Non-Communicable%20Diseases/Diabetes%2C%20Prediabetes%20_%20Insulin%20Resistance%20_%20NIDDK.pdf)
- Nogueira de Assis, D., Mosqueira, V. C., Vilela, J. M., Andrade, M. S., & Cardoso, V. N. (2008). Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of <sup>99m</sup>Technetium-fluconazole nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1-2), 152-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.002>
- Noor, N., Shah, A., Gani, A., Gani, A., & Masoodi, F. A. (2018). Microencapsulation of caffeine loaded in polysaccharide based delivery systems. *Food Hydrocolloids*, 82,

- 312-321. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.001>
- Olivares, M. (2017). *Exploring the potential of an Andean fruit: An interdisciplinary study on the cape gooseberry (Physalis peruviana L.) value chain*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18174/393622>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Organización Mundial de la Salud. Recuperado de <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
- Ortiz, F. (2010). *Implementación de metodologías analíticas para la identificación y cuantificación de glicoalcaloides presentes en frutos de uchuva (Physalis peruviana L.)* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Oviedo, J. (2009). *Implementación aislamiento y purificación de glicoalcaloides a partir de frutos de Physalis peruviana L. (uchuva)* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Ozturk, A., Özdemir, Y., Albayrak, B., Simsek, M., & Yildirim, K. (2017). Some nutrient characteristics of goldenberry ( *Physalis peruviana* L.) cultivar candidate from turkey. *Scientific Papers, Series B, Horticulture*, 61, 293-298.
- Pancreatic cancer action network. (2018). *El Páncreas*. Recuperado de [https://www.pancan.org/section\\_en\\_espanol/learn\\_about\\_pan\\_cancer/what\\_is\\_the\\_pancreas.php](https://www.pancan.org/section_en_espanol/learn_about_pan_cancer/what_is_the_pancreas.php)
- Pérez, C., De Jesús, P., & Griebenow, K. (2002). Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method. *International Journal of Pharmaceutics*, 248, 193-206. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00435-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00435-0)
- Perez, C., Sanchez, A., Putnam, D., Ting, D., Langer, R., & Alonso, M. J. (2001). Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *Journal of Controlled Release*, 75, 211-224. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00397-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00397-2)
- Petitti, M., Barresi, A. A., & Vanni, M. (2009). Controlled release of vancomycin from PCL microcapsules for an ophthalmic application. *Chemical Engineering Research and Design*, 87, 859-866. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2008.12.008>
- Pisani, E., Fattal, E., Paris, J., Ringard, C., Rosilio, V., & Tsapis, N. (2008). Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide : Influence of



- polymer adsorption at the dichloromethane-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 326(1), 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.07.013>
- Prabakar, K., Sivalingam, P., Mohamed Rabeek, S. I., Muthuselvam, M., Devarajan, N., Arjunan, A., ... Wembonyama, J. P. (2013). Evaluation of antibacterial efficacy of phyto fabricated silver nanoparticles using *Mukia scabrella* (*Musumusukkai*) against drug resistance nosocomial gram negative bacterial pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.041>
- Puente, L. A., Pinto-Muñoz, C. A., Castro, E. S., & Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*, 44(7), 1733-1740. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.034>
- Ramadan, M. F. (2011). Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Research International*, 44(7), 1830–1836. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.042>
- Ramadan, M. F., Hassan, N. A., Elsanhoty, R. M., & Sitohy, M. Z. (2012). Goldenberry (*Physalis peruviana*) juice rich in health-beneficial compounds suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in Rats. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 708-722. doi: 10.1111/j.1745-4514.2012.00669.x
- Ramírez, M. E., Rodríguez, O. Y., Hernández, O. S., Chel-Guerrero, L., & Aguilar, M. (2016). Estudio de la actividad hipoglucemiante y antioxidante de tronadora, raíz de wereque y raíz de nopal. En M. E. Ramírez Ortiz (Ed.), *Propiedades funcionales de hoy* (pp. 143–180). Barcelona, España: OmniaScience.
- Ramírez, D. (2013). *Evaluación en pequeños roedores de laboratorio del efecto hipoglucemiante de micropartículas conteniendo un extracto vegetal* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Rather, M. A., Bhat, B. A., & Qurishi, M. A. (2013). Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the “one drug to fit all” model breaking down? *Phytomedicine*, 21(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.07.015>
- Rey, D. P. (2013). *Evaluación in vitro del efecto de un extracto de frutos de Physalis peruviana sobre algunas carbohidrasas intestinales* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/58053/1/1014182296.2014.pdf>
- Rey, D. P., Ospina, L. F., & Aragón, D. M. (2015). Inhibitory effects of an extract of fruits of

- Physalis peruviana* on some intestinal carbohydrases. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 44(1), 72-89.  
<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v44n1.54281>
- Rizkalla, N., Range, C., Lacasse, F. X., & Hildgen, P. (2006). Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method. *Journal of Microencapsulation*, 23(1), 39–57.  
<https://doi.org/10.1080/02652040500286185>
- Rodríguez Arévalo, A. L. (2019). *Establecimiento de las condiciones para la obtención de sistemas nanoestructurados empleando polietilenglicol-b-poli(ε-caprolactona) (PEG-b-PCL)* (Trabajo de grado). Universidad Nacional de Colombia.
- Rodriguez Bernal, C.-A., Linck, V., Castellanos, L., Ramos, F. A., & Baena, Y. (2019). Development of an oral control release system from *Physalis peruviana* L . fruits extract based on the co-spray-drying method, 354, 676-688.  
<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.06.024>
- Sahoo, S. K., Panyam, J., Prabha, S., & Labhasetwar, V. (2002). Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of Controlled Release*, 82, 105-114.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00127-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00127-X)
- Selvamani, V. (2019). *Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814031-4.00015-5>
- Sharma, N., Bano, A., Dhaliwal, H. S., & Sharma, V. (2015). Perspectives and possibilities of Indian species of genus *Physalis* (L.)-a comprehensive review. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 2(2), 326-353.
- Shen, C., Guo, S., & Lu, C. (2008). Degradation behaviors of monomethoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(ε-caprolactone) nanoparticles in aqueous solution. *Polymers for Advanced Technologies*, 19(1), 66–72. <https://doi.org/10.1002/pat.975>
- Shimada S, (inventor) (2008). 20080254126. United States,Patent.
- Shuai, X., Ai, H., Nasongkla, N., Kim, S., & Gao, J. (2004). Micellar carriers based on block copolymers of poly(ε-caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery. *Journal of Controlled Release*, 98, 415-426.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.06.003>

- Shuai, X., Merdan, T., Unger, F., Wittmar, M., & Kissel, T. (2003). Novel biodegradable ternary copolymers hy-PEI-g-PCL-b-PEG: Synthesis, characterization, and potential as efficient nonviral gene delivery vectors. *Macromolecules*, *36*(15), 5751-5759. <https://doi.org/10.1021/ma034390w>
- Silva Pinto, M., Galvez Ranilla, L., Apostolidis, E., Maria Lajolo, F., Genovese, M. I., & Shetty, K. (2009). Evaluation of Antihyperglycemia and Antihypertension Potential of Native Peruvian Fruits Using *In Vitro* Models. *Journal of Medicinal Food*, *12*(2). <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0113>
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, *70*(1-2), 1-20. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4)
- Steppan, C., Bailey, S., Bhat, S., Brown, E., Banerjee, R., Wright, C., ... Lazar, R. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, *409*, 307-312. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/35053000>
- Stewart, G. L. (2009). Diabetes mellitus: clasificación, fisiopatología y diagnóstico Diabetes mellitus: classification, pathophysiology, and diagnosis. *Medwave*, *9*(12). Recuperado de <http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/APS/4315?tab=metrica>
- Su, Y. L., Fu, Z. Y., Zhang, J. Y., Wang, W. M., Wang, H., Wang, Y. C., & Zhang, Q. J. (2008). Microencapsulation of Radix salvia miltiorrhiza nanoparticles by spray-drying. *Powder Technology*, *184*, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2007.08.014>
- Subramanian, R., Asmawi, M. Z., & Sadikun, A. (2008). *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide, *55*(2), 391-398.
- Tacx, J. C. J. F., Schoffeleers, H. M., Brands, A. G. M., & Teuwen, L. (2000). Dissolution behavior and solution properties of polyvinylalcohol as determined by viscometry and light scattering in DMSO, ethyleneglycol and water. *Polymer*, *41*(3), 947-957.
- The United States Pharmacopeial Convention (2015). *The United States pharmacopeia: the national formulary*. Maryland: United States Pharmacopeial Convention.
- Tolosa, L. I. (2016). *Super cuaderno FIRP SC280-R*.
- Tomar, P., Jain, N., & Dixit, V. K. (2013). Nanoparticulate delivery of LHRH analogue for the treatment of prostate cancer. *Pharmaceutical Development and Technology*, *18*(3), 645-652. <https://doi.org/10.3109/10837450.2012.663389>

- Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural Products as  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors and their Hypoglycaemic Potential in the Treatment of Diabetes: An Update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10, 315-331. <https://doi.org/10.2174/138955710791331007>
- Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 26(5), 1025-1058. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>
- Vila Jato, J. L. (2006). *Nanotecnología Farmacéutica: una Galénica emergente. Discurso*. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia.
- Villamil, J. C., Parra, C. M., & Pérez, L. D. (2019). Enhancing the performance of PEG-b-PCL copolymers as precursors of micellar vehicles for amphotericin B through its conjugation with cholesterol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 572, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.03.086>
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020-1037. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5)
- Yadav, A. K., Mishra, P., Jain, S., Mishra, P., Mishra, A. K., & Agrawal, G. P. (2008). Preparation and characterization of HA-PEG-PCL intelligent core corona nanoparticles for delivery of doxorubicin. *Journal of Drug Targeting*, 16(6), 464-478. <https://doi.org/10.1080/10611860802095494>
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchiida, A., Yokomizo, T., Kita, S., ... Kadowaki, T. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423(6941), 762-769. <https://doi.org/10.1038/nature01683.1>
- Yang, J., Hou, Y., Ji, G., Song, Z., Liu, Y., Dai, G., ... Chen, J. (2014). Targeted delivery of the RGD-labeled biodegradable polymersomes loaded with the hydrophilic drug oxymatrine on cultured hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(1), 180-190. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.11.017>
- Yen, F. L., Wu, T. H., Lin, L. T., Cham, T. M., & Lin, C. C. (2008). Nanoparticles formulation of *Cuscuta chinensis* prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1771-1777. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.021>
- Zakeri-Milani, P., Loveymi, B. D., Jelvehgari, M., & Valizadeh, H. (2013). The characteristics

- and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.021>
- Zamarioli, C. M., Martins, R. M., Carvalho, E. C., & Freitas, L. A. P. (2015). Nanoparticles containing curcuminoids (*Curcuma longa*): Development of topical delivery formulation. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25(1), 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.010>
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., Alonso, M. J., ... Vigneron, C. (1998). Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of Controlled Release*, 50(1-3), 31-40. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00106-5)
- Zamora, D., Chávez, N. C., & Méndez, N. (2004). Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina. *Gaceta Medica de México*, 11(13), 149-159. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2004/ms043b.pdf>
- Zhang, Y.-J., Deng, G.-F., Xu, X.-R., Wu, S., Li, S., & Li, H.-B. (2013). Chemical Components and Bioactivities of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana*). *International Journal of Food Nutrition and Safety*, 3(1), 15-24.