

**ULL**

Universidad  
de La Laguna



Facultad de Farmacia  
UNIVERSIDAD LA LAGUNA

## TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

CURSO 2017/2018

# “ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCÁPSULAS DE HIALURONATO SÓDICO Y DE PROTAMINA”

**Alumna:** Carmen Delia Hernández González

**Tutora:** Araceli Delgado Hernández

**Co-tutor:** Edgar Pérez Herrero

## ÍNDICE

ABSTRACT.....	3
RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. OBJETIVO.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1 Preparación de las nanocápsulas basadas en hialuronato sódico....	7
3.2 Preparación de las nanocápsulas basadas en protamina.....	9
3.3 Caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas.....	11
3.4 Ensayo de estabilidad.....	11
a) Elaboración de los medios de estabilidad.....	11
b) Metodología del ensayo de estabilidad.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1 Propiedades fisicoquímicas de las nanocápsulas.....	12
4.2 Ensayo de estabilidad.....	13
5. CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18
ANEXOS.....	20

## **ABSTRACT.**

Nanocapsules (NCs) are reservoir-type systems, where the substance of interest is located in the core or central cavity, covered by a polymeric membrane that controls the kinetic of release depending on its chemical nature.

The purpose of nanoencapsulation is to protect sensitive substances from the external environment, to mask organoleptic characteristics as the color, flavor, or smell, to obtain a controlled release of pharmacological substances, to safely handle toxic materials, to obtain the targeted release of the drug, or to avoid adverse effects.

In this work, we have been developed two types of formulations, nanocapsules based on sodium hyaluronate, and nanocapsules based on protamine. Both systems, were characterized in terms of size, polydispersity index (PDI), surface charge, and stability in simulated fluids.

The particle size for nanocapsules based on sodium hyaluronate was  $169,52 \pm 1,03$  nm, the PDI was  $0,147 \pm 0,004$ , and the zeta potential was negative ( $-11,05 \pm 0,87$  mV). The observed variability in the mean size and PDI of these particles during incubation in synovial fluid do not permit to conclude their stability in this media.

The nanocapsules based on protamine showed a size of  $266,70 \pm 2,07$  nm, a PDI of  $0,100 \pm 0,05$ , and a negative zeta potential ( $-3,84 \pm 0,18$  mV). The mean size of this formulation is maintained along all the period of the assay in simulated intestinal fluid, although the PDI increases progressively which can indicates possible erosion and aggregation phenomena.

**Keywords:** nanocapsules, sodium hyaluronate, protamine, stability

## **RESUMEN.**

Las nanocápsulas (NCs) son sistemas de tipo reservorio, en donde la sustancia de interés se encuentra en el núcleo o cavidad central, cubierta por una membrana polimérica que controla la cinética de liberación dependiendo de su naturaleza química.

La nanoencapsulación tiene como propósito proteger sustancias sensibles del entorno externo, enmascarar propiedades organolépticas, como el color, el sabor u olor, obtener una liberación controlada de sustancias farmacológicas, manejar de manera segura materiales tóxicos, obtener la liberación dirigida del principio activo o evitar efectos adversos.

En este trabajo se han desarrollado dos tipos de formulaciones, nanocápsulas basadas en hialuronato sódico y nanocápsulas basadas en protamina. Ambos sistemas fueron caracterizados en cuanto a tamaño, índice de polidispersidad (PDI), carga superficial y estabilidad en fluidos biológicos simulados en función de su potencial aplicación.

Las nanocápsulas basadas en hialuronato sódico tienen un tamaño de  $169,52 \pm 1,03$  nm, un PDI de  $0,147 \pm 0,004$ , y un potencial zeta negativo de  $-11,05 \pm 0,87$  mV. La variabilidad observada en el tamaño y PDI de estas partículas durante su incubación en fluido sinovial simulado no permite concluir su estabilidad en este medio.

Las nanocápsulas basadas en protamina tienen un tamaño de  $266,70 \pm 2,07$  nm, un PDI de  $0,100 \pm 0,05$ , y un potencial zeta negativo de  $-3,84 \pm 0,18$  mV. El tamaño medio de esta formulación se mantiene durante todo el ensayo de estabilidad en medio intestinal simulado, si bien el PDI aumenta de forma progresiva, indicando posibles procesos de erosión y agregación.

**Palabras claves:** nanocápsulas, hialuronato sódico, protamina, estabilidad

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las **nanocápsulas** (NCs) son sistemas nanométricos vesiculares formados por un reservorio interno, que puede estar constituido por agua o aceite, rodeado de una cubierta polimérica. El núcleo tiene la función de favorecer la encapsulación del fármaco, mientras que la cubierta polimérica, además de aportar estabilidad y protección al sistema dentro y fuera del organismo, puede tener distintas funciones como interaccionar con membranas celulares y favorecer el transporte del fármaco, su acceso a las células diana y/o controlar su liberación [1,2].

El proceso de generación de NCs se divide en dos etapas principalmente, la formación de la nanoemulsión y el posterior recubrimiento de las partículas por material polimérico, proteico o graso. En la literatura es posible encontrar numerosos métodos para la producción de **nanoemulsiones**, que se dividen en dos tipos según la energía aplicada en el proceso. La **emulsificación de alta energía** utiliza fuerzas disruptivas que entremezclan las fases para formar la nanoemulsión, donde destacan las técnicas de ultrasonidos, micro-fluidizadores y homogeneizadores de alta cizalla [3,4]. La **emulsificación de baja energía** se basa en la formación espontánea de la nanoemulsión de aceite dentro de sistemas tensioactivo-aceite-agua mediante la alteración intencional de las condiciones del entorno o la composición del sistema, donde destacan técnicas como la emulsificación espontánea, la emulsificación por inversión de fases o la generación de emulsiones por desplazamiento del solvente, entre otras [4,5]. En este trabajo se ha utilizado la técnica de emulsificación espontánea y el método del desplazamiento del solvente, debido a la fácil reproducibilidad y la posibilidad de encapsular una amplia variedad de compuestos, incluso termolábiles, debido a las bajas condiciones energéticas empleadas.

En cuanto a los materiales de recubrimiento, existen numerosos; sin embargo, se va a describir los dos utilizados en este trabajo, el hialuronato sódico y la protamina.

El **hialuronato sódico** (HA) es un polímero aniónico de alto peso molecular que se encuentra en el cartílago y en el líquido sinovial, entre otras partes del organismo. Se compone de residuos de n-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico alternados y unidos por enlaces  $\beta$ -(1-4) y  $\beta$ -(1-3), con una masa molecular entre 6.500 a 10.900 kDa, que se despolimeriza a pesos moleculares más bajos, 2.700-4.500 kDa, en enfermedades como la osteoartritis. Sus funciones incluyen lubricación de la articulación y la regulación de actividades celulares como la unión de proteínas <sup>[6]</sup>. Es por ello, que las **nanocápsulas recubiertas de hialuronato sódico** se pueden emplear para aumentar el tiempo de residencia en el líquido sinovial de diferentes principios activos, por ejemplo, infiltraciones de corticoides, utilizadas en el tratamiento de la osteoartritis, disminuyendo así la frecuencia de administración debido a la liberación del fármaco de modo sostenido y controlado y, con ello, el dolor y los riesgos asociados a esta práctica en los pacientes <sup>[7]</sup>. La **protamina** es un conjunto de péptidos ricos en arginina, de peso molecular aproximado entre 4-10 kDa, que contribuye a la capacidad de translocación a través de las membranas celulares por endocitosis. De forma natural es sintetizada en la última etapa de la espermátide de muchos animales y plantas, donde se asocia al ADN aumentando su grado de compactación. Las **nanocápsulas con recubrimiento de protamina** pueden ser útiles para transportar moléculas de gran tamaño, además de protegerlas de la degradación, facilitar su llegada al lugar de acción y controlar su liberación <sup>[8]</sup>.

En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de fármacos antineoplásicos incorporados en nanopartículas, que en la actualidad es uno de los campos científicos que más desarrollo posee en investigación.

**Tabla 1.** Ejemplos de nanoemulsiones (NE) orales y parenterales.

Nanoemulsiones orales		
Fármaco	Finalidad	Tamaño (nm)
Paclitaxel <sup>[9]</sup>	Mejorar la biodisponibilidad de fármacos hidrofóbicos	90-120
Docetaxel <sup>[10]</sup>	Aumentar la captación celular	233,33
Nanoemulsiones parenterales		
Fármaco	Finalidad	Tamaño (nm)
Clorambucilo con PEG <sup>[11]</sup>	Mejorar la farmacocinética y distribución en tejido	< 200
Paclitaxel-sulforodamina B <sup>[12]</sup>	Aumentar el tiempo de circulación, eficacia terapéutica y de imagen (uso diagnóstico)	100

## 2. OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo es la preparación y caracterización, en cuanto a tamaño, distribución de tamaño y potencial zeta, de dos tipos de nanocápsulas, unas a base de hialuronato sódico y otras de protamina, así como evaluar su estabilidad en fluidos simulados sinovial e intestinal respectivamente, de acuerdo a su posible vía de administración.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

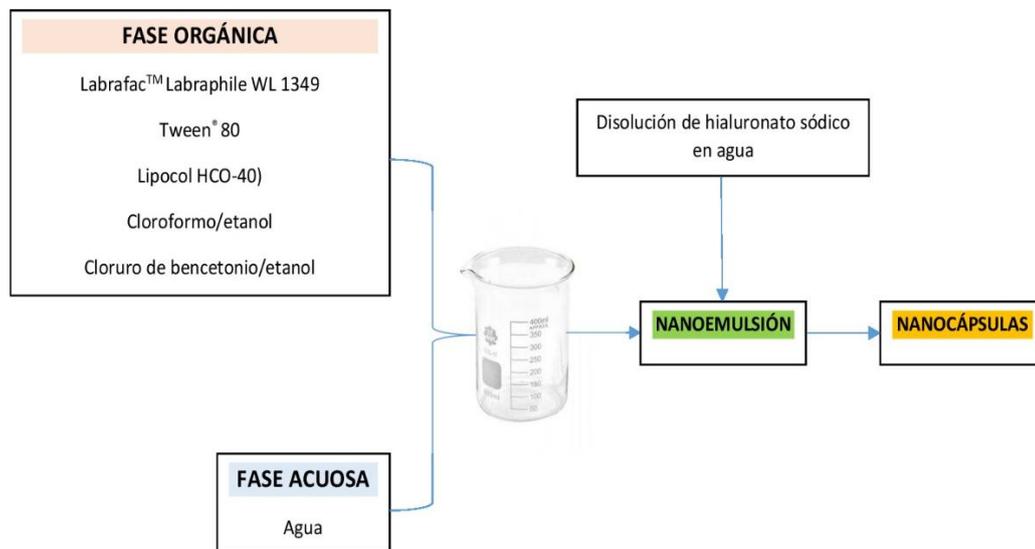
### 3.1 Preparación de las nanocápsulas basadas en hialuronato sódico.

Se prepararon **nanocápsulas recubiertas de hialuronato sódico** mediante la técnica de emulsificación espontánea a partir de los componentes que aparecen en la Tabla 2 <sup>[7,13]</sup>.

Brevemente, la fase orgánica consistió en 300 mg de un aceite (Labrafac™ Labraphile WL 1349), 600 mg de un tensioactivo lipófilo (Tween® 80), 300 mg de un estabilizante (Lipocol HCO-40) y 500 µL de disolución de 6 mg/mL de un conservante (cloruro de bencetonio) en cloroformo/etanol 1:22 v/v. La fase acuosa consistió en agua desionizada. Bajo agitación magnética continua (1500 rpm, Velp® Scientifica ARE), se adicionaron 1050 µL de la fase acuosa en la fase orgánica para formar una emulsión O/W, en un vaso de precipitados de 50 mL. Finalmente, se realizó el recubrimiento de las nanocápsulas generadas mediante la adición de 327 µL de una disolución de 22,9 mg/mL de hialuronato sódico aniónico que interactuó con la nanoemulsión catiónica para formar la formulación final. Un esquema del proceso de generación de las nanocápsulas se muestra en la Figura 1.

**Tabla 2.** Componentes de las NCs basadas en hialuronato sódico.

Componentes	Proveedor	Función
Tween® 80	Acofarma	Tensioactivo lipófilo
Labrafac™ Labraphile WL 1349	Gattefosse España, S.A.	Aceite
Lipocol HCO-40	Gattefosse España, S.A.	Emoliente y estabilizante
Cloruro de bencetonio (BZT) en etanol	Gattefosse España, S.A.	Conservante
Hialuronato sódico (HA) 40 kDa en agua	Inquiaroma, S.A.	Cubierta polimérica
Cloroformo/etanol	Acofarma	Disolvente



**Figura 1.** Proceso de elaboración de NCs basadas en hialuronato sódico.

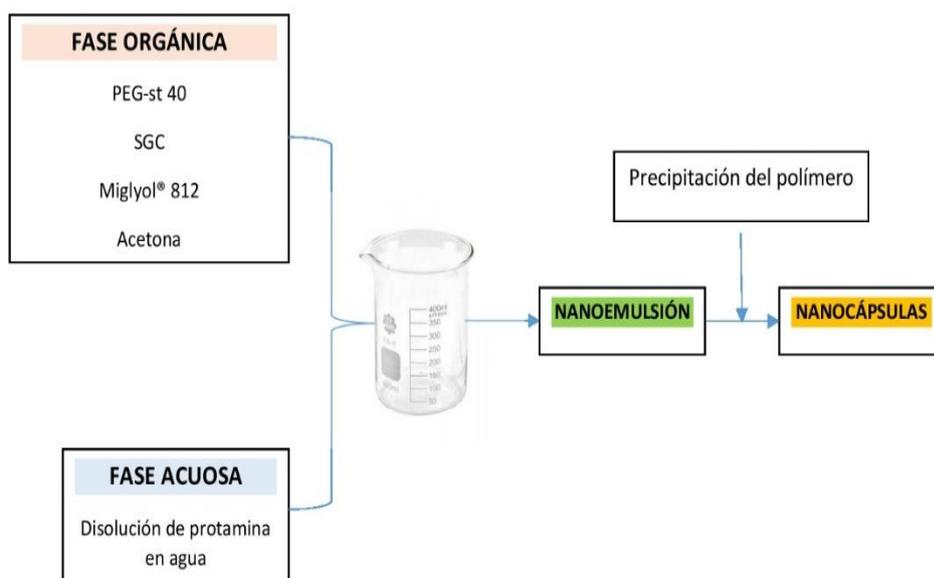
### 3.2 Preparación de las nanocápsulas basadas en protamina.

Se prepararon **nanocápsulas basadas en protamina** mediante la técnica de desplazamiento del solvente, a partir de los componentes que aparecen en la Tabla 3 [8].

Brevemente, como fase orgánica se utilizó una mezcla de 200  $\mu\text{L}$  de etanol/cloroformo (65/35 %v/v), 3 mL de una solución etanólica de PEG-estearato 40 (5,34 mg/mL), 20  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa de glicolato de sodio (250 mg/mL) y 62,5  $\mu\text{L}$  Miglyol® 812, a la que se le añadieron 2 mL de acetona. La fase acuosa consistió en 10 mL de una solución acuosa de protamina (1,8 mg/mL). La fase orgánica se vertió sobre la fase acuosa bajo agitación magnética suave (500 rpm, Velp® Scientifica ARE) durante 10 min para formar una emulsión O/W, donde la acetona difundió hacia la fase acuosa para formar las nanocápsulas por precipitación del polímero. Por último, se realizó la eliminación de los disolventes orgánicos mediante evaporación al vacío (Rotavapor Heidolph, Alemania), hasta obtener un volumen final de 5 mL. Un esquema del proceso de generación de las nanocápsulas se muestra en la Figura 2.

**Tabla 3.** Componentes de las nanocápsulas (NCs) basadas en protamina.

Componentes	Proveedor	Función
Polietilenglicol (PEG-st 40)	Cremer, Oleo Division	Tensioactivo estabilizante que facilita el transporte de las NCs a través de la mucosa intestinal
Glicolato sódico (SGC)	Croda Europe, Ltd	Potenciador de la penetración de las NCs en la mucosa intestinal
Protamina	Yuki Gosei Kogyo, Ltd	Cubierta polimérica de las NCs que facilita la interacción con el epitelio intestinal
Miglyol®	Cremer, Oleo Division	Núcleo oleoso de las NCs
Cloroformo/metanol	Acofarma	Disolvente
Acetona	Acofarma	Disolvente



**Figura 2.** Proceso de elaboración de NCs basadas en protamina.

### 3.3 Caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas.

La distribución de **tamaño** de las nanocápsulas, que indica el tamaño de gota de la nanoemulsión, y el **índice de polidispersidad** (PDI), que indica la uniformidad del tamaño de partículas en la nanoemulsión, fueron medidos, previa homogeneización en baño de ultrasonidos (J&G AS2060B®), mediante dispersión de luz dinámica, utilizando el equipo Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments, UK) a 25°C, con un ángulo de detección de 90°. Nótese que cuanto mayor sea el valor de polidispersidad, menor será la uniformidad de tamaño de partículas, ya que se define como la relación entre la desviación estándar y el tamaño medio de partícula. El **potencial zeta**, que indica la carga superficial de las cápsulas, se determinó mediante microelectroforesis de laser Doppler, utilizando el mismo equipo que para la medición del tamaño [14].

### 3.4 Ensayos de estabilidad.

#### a) Elaboración de los medios de estabilidad.

El ensayo de estabilidad de las nanocápsulas basadas en hialuronato sódico se realizó en fluido sinovial simulado para evaluar su posible aplicación para inyección intra-articular. Por el contrario, las basadas en protamina fueron evaluadas en fluido intestinal simulado para su potencial aplicación por vía oral. La composición de los fluidos está referida en las Tablas 4 y 5.

**Tabla 4.** Composición del fluido sinovial simulado [15].

Componentes	Concentración (g/L)
Cloruro de sodio (NaCl)	8
Cloruro de potasio (KCl)	0,20
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,44
Fosfato de sodio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,24
Hialuronato sódico 1,50 MDa	3
pH = 7,40	

**Tabla 5.** Composición del fluido intestinal simulado <sup>[16]</sup>.

Componentes	Concentración (g/L)
Hidróxido de sodio (NaOH)	0,60
Fosfato de sodio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	6,80
pH = 6,80	

### **b) Metodología del ensayo de estabilidad.**

El ensayo de estabilidad se realizó en un incubador a 37°C, que simula la temperatura corporal, y 120 rpm en un agitador orbital (Grant Bio-POS 300). Las relaciones partículas/medio utilizadas en el ensayo fueron, en el caso de las nanocápsulas de hialuronato sódico de 1 mL de la suspensión de nanocápsulas en 4 mL de fluido sinovial simulado, y 0,50 mL de nanocápsulas en 10 mL de fluido intestinal simulado, en el caso de las nanocápsulas de protamina. A determinados tiempos (0 h, 0,50 h, 1 h, 2 h, 24 h y 72 h) se tomaron muestras de 1000 µL, se homogeneizaron por ultrasonidos y se midió el tamaño y el índice de polidispersidad. El ensayo se realizó por triplicado.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSION.**

### **4.1 Propiedades fisicoquímicas de las nanocápsulas.**

La distribución de tamaño, el índice de polidispersidad (PDI), y el potencial zeta de las nanocápsulas se resumen en la Tabla 6 a partir de los datos del Anexo 7.

Las nanocápsulas basadas en hialuronato sódico presentaron un tamaño medio en intensidad de  $169,52 \pm 1,03$  nm con un PDI de  $0,147 \pm 0,004$  y un potencial zeta negativo de  $- 11,05 \pm 0,87$  mV.

Por otro lado, las nanocápsulas basadas en protamina mostraron un tamaño medio en intensidad de  $266,70 \pm 2,07$  nm, un PDI de  $0,100 \pm 0,05$  y un potencial zeta negativo de  $- 3,84 \pm 0,18$  mV.

Nótese que el tamaño de las nanocápsulas de hialuronato sódico es mayor con respecto a las de protamina, pero ambas con distribuciones unimodales y estrechas y con valores cercanos a los reportados en la literatura <sup>[5,6]</sup>. El potencial zeta es negativo debido la presencia en la superficie de grupos aniónicos aportados por la cubierta polimérica.

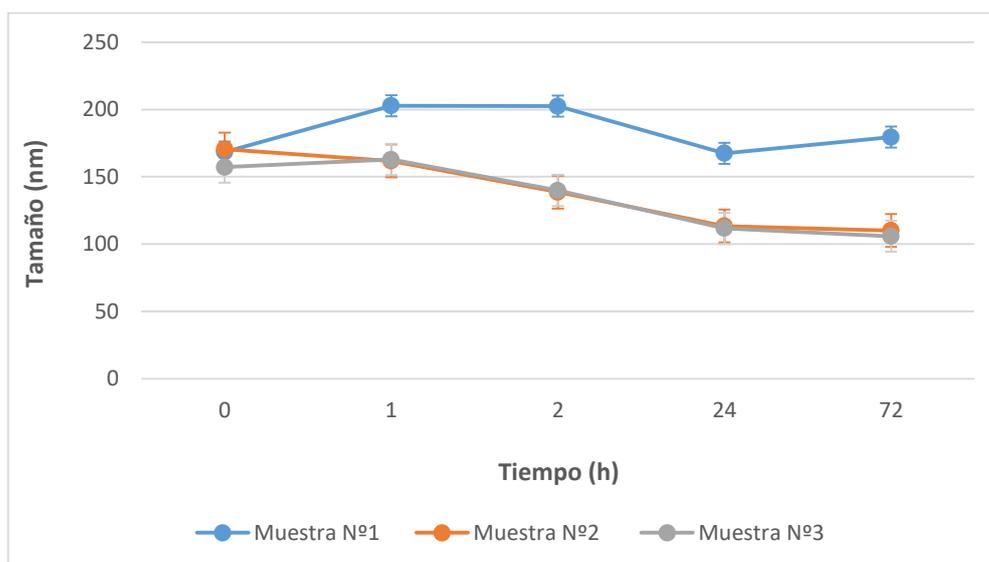
**Tabla 6.** Características de las nanocápsulas (NCs) de las formulaciones basadas en hialuronato sódico y protamina (media  $\pm$  SD, n = 2).

	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
<b>NCs basadas en hialuronato sódico</b>	$169,52 \pm 1,03$	$0,147 \pm 0,004$	$- 11,05 \pm 0,87$
<b>NCs basadas en protamina</b>	$266,70 \pm 2,07$	$0,100 \pm 0,05$	$- 3,84 \pm 0,18$

## 4.2 Ensayos de estabilidad.

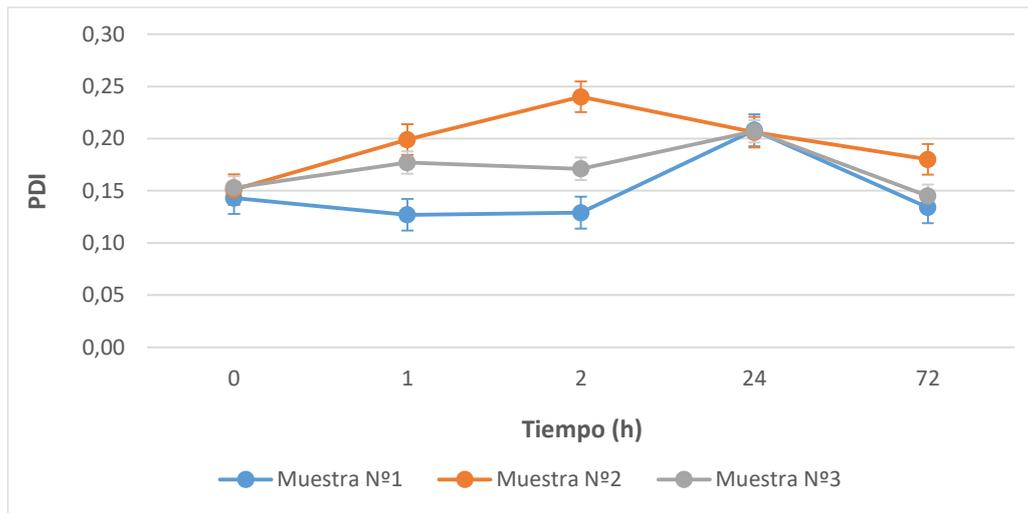
La estabilidad in vitro se evaluó en términos de tamaño y PDI, ya que debido a la naturaleza coloidal de ambas formulaciones puede producirse una agregación o desintegración de las cápsulas, reflejada en la variación del tamaño, o en la dispersión de la distribución de tamaños, mostrada en la variación del PDI. Estas variaciones pueden afectar a la eficacia de las aplicaciones biomédicas que puedan tener las nanocápsulas. Los datos se representan en las Figuras 3-7, a partir de los resultados mostrados en los Anexos 2-5.

Con respecto al **tamaño de las nanocápsulas basadas en hialuronato sódico** (Figura 3), se observó que durante la primera hora no se produjo variación del tamaño inicial, existiendo una reducción del 33% en las 24 h posteriores para dos de las muestras, que podría reflejar la desintegración de las nanocápsulas en el tiempo, para mantenerse en este último tamaño sin apenas variaciones hasta las 72 h finales. Este comportamiento no concuerda con los datos disponibles en la bibliografía sobre nanocápsulas basadas en hialuronato sódico [7,13]. No obstante, es de destacar que una de las muestras sí mantuvo la estabilidad del tamaño durante todo el ensayo, con apenas un aumento de tamaño de 6,6% con respecto al inicial. Estas diferencias en comportamiento observadas entre las diferentes muestras no permiten poder concluir de forma clara la estabilidad de estas partículas, por lo que sería conveniente aumentar el número de muestras a analizar.



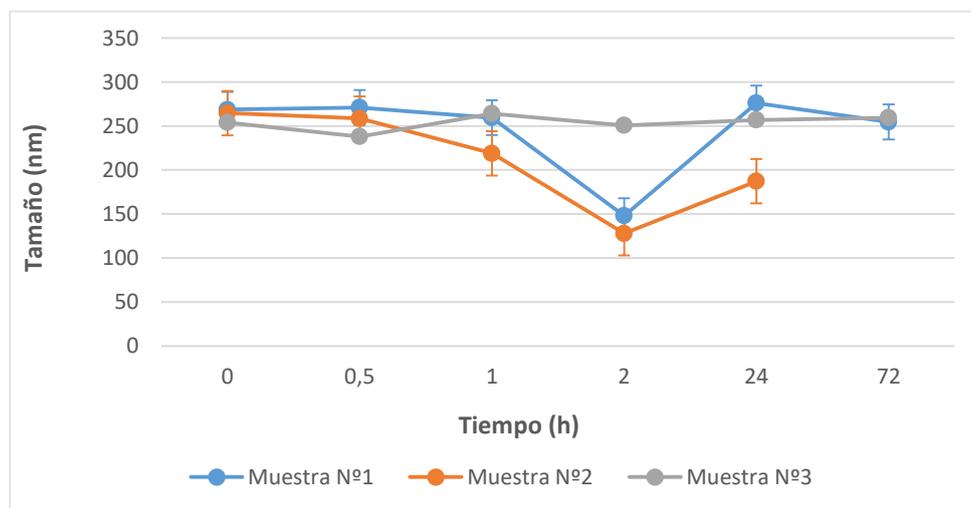
**Figura 3.** Evolución del tamaño (nm) de las nanocápsulas basadas en hialuronato sódico en fluido sinovial simulado (n = 3).

El **índice de polidispersidad (PDI) de las nanocápsulas de hialuronato sódico** (Figura 4) tendió a aumentar en todas las muestras con respecto a su valor inicial en un 20,80% durante las primeras 24 h, aunque manteniéndose dentro de un intervalo de homogeneidad de tamaños aceptable, es decir, menos de 0,300, para igualarse al PDI inicial a las 72 h.



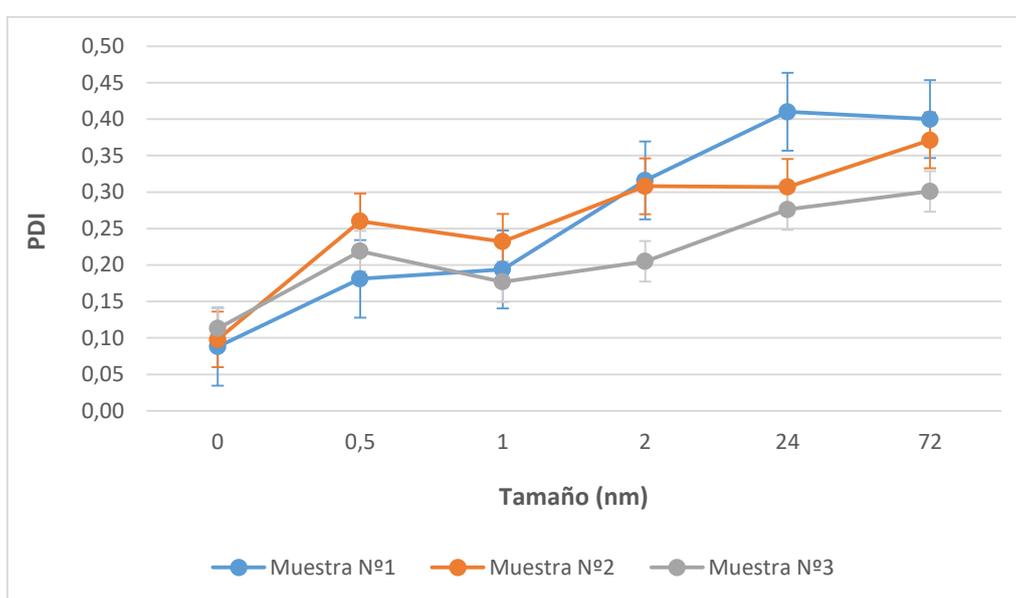
**Figura 4.** Evolución del índice de polidispersidad (PDI) de las nanocápsulas basadas en hialuronato sódico en fluido sinovial simulado (n = 3).

En cuanto al **tamaño de las nanocápsulas basadas en protamina** (Figura 5), todas las muestras mantuvieron su tamaño inicial durante todo el ensayo, corroborando los resultados de la literatura consultada [8]. Sin embargo, a las 2 h, en dos de las muestras, se produjo una disminución significativa (48,26%) del tamaño medio, para la que no se encuentra una explicación, salvo errores cometidos en el muestro o manipulación de la muestra.



**Figura 5.** Evolución del tamaño (nm) de las nanocápsulas basadas en protamina en fluido intestinal simulado (n = 3).

El índice de polidispersidad (PDI) de las nanocápsulas basadas en protamina (Figura 6) aumentó progresivamente en todas las muestras durante las 72 h de ensayo un 258,44% con respecto al inicial, siendo el valor más alto (0,400) solo un 25% superior al aceptable (0,300). Teniendo en cuenta que el tamaño de estas partículas se mantiene constante a lo largo del tiempo, esta variación en el PDI indica que podrían existir fenómenos de erosión y agregación de las partículas, hecho que también podría explicar el comportamiento anómalo detectado en el valor de tamaño determinado a las 2 h.



**Figura 6.** Evolución del índice de polidispersidad (PDI) de las nanocápsulas basadas en protamina en medio intra-duodenal simulado (n = 3).

## 5. CONCLUSIONES.

- Los métodos de elaboración utilizados permiten obtener NCs con una distribución de tamaño de partícula adecuado para su posible administración vía intra-articular u oral según su futura aplicación.
- Las nanocápsulas basadas en hialuronato sódico incubadas en fluido sinovial simulado mostraron una importante variabilidad en cuanto al tamaño medio y el PDI, lo cual no permite concluir de forma clara su estabilidad en dicho fluido.
- Las nanocápsulas basadas en protamina mantuvieron su tamaño inicial durante todo el ensayo de estabilidad en fluido intestinal simulado, aunque con un progresivo aumento del PDI, lo que podría indicar procesos de erosión y agregación de las partículas en dicho medio.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Mora-Huertas, C.E., Fessi H., Elaissari A., Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* (2010) **385**, 113-142.
2. Legrand, P., Barratt G., Mosqueira V., Fessi H., Devissaguet J.P., Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. *S.T.P. Pharma Sciences*, (1999), **9**, 411-418.
3. McClements D.J., Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *The Royal Society of Chemistry* (2012), **8**, 1719-1729.
4. Dizaj S.M., Yaqoubi S., Adibkia K., Lotfipour F., Nanoemulsion-based delivery systems: preparation and application in the food industry, in: Frans Kampers, Arnout Fischer, Willem Norde (Ed.), *Nanotechnology in the Agri-Food Sector: Implications for the Future*, 2011, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 293-328.
5. Singh Y., Meher J.G., Kavita Raval K., Khan F.A., Chaurasia M., Jain N.K., Chourasia M.K., Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release* (2017), **252**, 28-49.
6. Bowman S., Awad M.E., Hamrick M.W., Hunter M., Fulzele S., Recent advances in hyaluronic acid based therapy for osteoarthritis. *Clinical and Translational Medicine*, (2018), **7**, 7-6.
7. Teja Surikutchi B., Fernández-Rodríguez J.A., Ramil-Gómez O., Storozhylova N., Marlow M., López-Armada M.J., Crecente-Campo J., Alonso M.J., Intra-articular delivery of nanocapsules - loaded hydrogels for the treatment of osteoarthritis. UKICRS Symposium 2018, Belfast, UK.

8. Thwala L.N., Beloqui A., Csaba N.S., González-Touceda D., Tovar S., Dieguez C., Alonso M.J., Pr at V., The interaction of protamine nanocapsules with the intestinal epithelium: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, (2016), **243**, 109-120.
9. Tiwari S.B., Amiji M.M., Improved oral delivery of paclitaxel following administration in nanoemulsion formulations. *J Nanosci Nanotechnol* (2006), **6**, 3215-3221.
10. Verma P., Meher J.G., Asthana S., Pawar V.K., Chaurasia M., Chourasia M.K., Perspectives of nanoemulsion assisted oral delivery of docetaxel for improved chemotherapy of cancer. *Drug deliv* (2016), **23**, 479-488.
11. Patil K.C., Yakhmi J.V., Nanotechnology for cancer therapy: Invading the mechanics of cancer. *Nanobiomaterials in Cancer Therapy*, (2016), **7**, 395-470.
12. Yang X., Wang D., Zhao Q., Fallon J.K., Liu D., Xu X.E., Wang Y., He Y., Liu Y., Theranostic nanoemulsions: codelivery of hydrophobic drug and hydrophilic imaging probe for cancer therapy and imaging. *Nanomedicine* (2014), **9**, 2773-2785.
13. Oyarzun-Ampuero F., Rivera-Rodr guez G., Alonso M.J., Torres D., Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2013), **49**, 483-490.
14. Zetasizer Nano User Manual. Malvern Instruments Ltd.: Worcestershire, United Kingdom., 2007.
15. Marquez M., L benberg R., Almukainzi M., Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technologies*, (2011), **18**, 15-28.
16. Farmacopea Europea, 9<sup>a</sup> Edici n, 2016.

## ANEXOS.

	Tamaño (nm)		PDI		Potencial zeta (mV)	
	Lote N°1	Lote N°2	Lote N°1	Lote N°2	Lote N°1	Lote N°2
Formulación de NCs basadas en hialuronato sódico	168,2	171,2	0,143	0,153	- 11,6	- 10,5
	169,1	169,4	0,142	0,148	- 12,1	- 10,2
	168,7	170,5	0,145	0,151	- 12	- 9,92
Media ± SD	169,52 ± 1,03		0,147 ± 0,004		-11,05 ± 0,87	
Formulación de NCs basadas en protamina	266,5	264,8	0,110	0,102	- 4,06	- 3,55
	267,6	265,6	0,093	0,099	- 4,04	- 3,73
	270,8	264,9	0,101	0,095	- 3,87	- 3,80
Media ± SD	266,70 ± 2,07		0,100 ± 0,005		-3,84 ± 0,18	

**Anexo 1.** Tamaño (nm), índice de polidispersidad (PDI) y potencial zeta, n = 2, de las formulaciones de NCs basadas en hialuronato sódico y protamina a partir del promedio de 3 medidas de 13 barridos cada una realizado por el Zetasizer® Nano ZS.

	Tamaño (nm)				
	0 h	1 h	2 h	24 h	72 h
Muestra N°1	169	206	205,9	174,8	171,8
	167,7	202,7	201,8	166,4	182,1
	168,4	199,8	199,6	161,2	184,5
Media ± SD	168,36 ± 0,53	202,83 ± 2,53	202,43 ± 2,61	167,47 ± 5,60	179,47 ± 5,51
Muestra N°2	172,1	161,2	135,1	118,2	108,1
	169,3	163,7	139,7	112,6	110,9
	170,2	160,4	141,2	109,5	111,4
Media ± SD	170,53 ± 0,01	161,76 ± 1,41	138,66 ± 2,59	113,43 ± 3,60	110,13 ± 1,45
Muestra N°3	165,2	164,6	134,8	116,2	106,9
	154,1	164,4	140,9	110	104,7
	152,2	159,5	144	108,9	106
Media ± SD	157,17 ± 5,73	162,83 ± 2,36	139,90 ± 3,82	111,70 ± 3,21	105,87 ± 0,90

**Anexo 2.** Tamaño medio (nm) ± SD, n = 3, de las NCs basadas en hialuronato sódico durante el ensayo de estabilidad a partir del promedio de 3 medidas de 13 barridos cada una realizado por el Zetasizer® Nano ZS.

	PDI				
	0 h	1 h	2 h	24 h	72 h
Muestra N°1	0,145	0,143	0,142	0,215	0,125
	0,141	0,127	0,116	0,203	0,137
	0,142	0,111	0,130	0,206	0,139
Media ± SD	0,143 ± 0,001	0,127 ± 0,01	0,129 ± 0,01	0,208 ± 0,005	0,134 ± 0,006
Muestra N°2	0,155	0,224	0,229	0,213	0,188
	0,147	0,189	0,25	0,199	0,175
	0,152	0,185	0,242	0,208	0,177
Media ± SD	0,151 ± 0,003	0,199 ± 0,01	0,240 ± 0,008	0,206 ± 0,005	0,180 ± 0,005
Muestra N°3	0,148	0,165	0,170	0,203	0,136
	0,153	0,177	0,151	0,206	0,147
	0,159	0,19	0,192	0,212	0,154
Media ± SD	0,153 ± 0,004	0,177 ± 0,01	0,171 ± 0,01	0,207 ± 0,003	0,145 ± 0,007

**Anexo 3.** Índice de polidispersidad medio (PDI) ± SD, n = 3, de las NCs basadas en hialuronato sódico durante el ensayo de estabilidad a partir del promedio de 3 medidas de 13 barridos cada una realizado por el Zetasizer® Nano ZS.

	Tamaño (nm)					
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	24 h	72 h
Muestra N°1	267,8	275,6	264,3	146,7	255,3	263,9
	266,4	272,7	255,6	150,1	389,6	244
	271,9	264,8	258,5	147,3	183,2	255,7
Media ± SD	268,70 ± 2,33	271,03 ± 4,56	259,46 ± 3,62	148,03 ± 1,48	276,03 ± 85,52	254,53 ± 8,17
Muestra N°2	264,1	258,1	226,1	129	194,8	-
	265,4	257,9	219,1	133,3	184,2	-
	264,3	259,2	211,6	121,4	182,7	-
Media ± SD	264,60 ± 0,57	258,40 ± 0,57	218,93 ± 5,92	127,90 ± 4,92	187,23 ± 5,38	-
Muestra N°3	253,8	242,8	274,7	258	260,2	261,3
	252,2	238,9	259,2	250,9	254,3	259,5
	255,9	232,2	258,7	243,3	255,8	257,2
Media ± SD	253,97 ± 1,51	237,97 ± 4,38	264,20 ± 7,43	250,73 ± 6,00	256,80 ± 2,50	259,33 ± 1,67

**Anexo 4.** Tamaño medio (nm) ± SD, n = 3, de las NCs basadas en protamina durante el ensayo de estabilidad a partir del promedio de 3 medidas de 13 barridos cada una realizado por el Zetasizer® Nano ZS.

	PDI					
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	24 h	72 h
<b>Muestra N°1</b>	0,116	0,178	0,162	0,302	0,356	0,437
	0,092	0,194	0,209	0,345	0,528	0,400
	0,058	0,173	0,212	0,303	0,347	0,365
<b>Media ± SD</b>	<b>0,088 ± 0,02</b>	<b>0,181 ± 0,01</b>	<b>0,194 ± 0,02</b>	<b>0,316 ± 0,02</b>	<b>0,410 ± 85,52</b>	<b>0,400 ± 0,03</b>
<b>Muestra N°2</b>	0,086	0,246	0,215	0,281	0,343	0,427
	0,123	0,280	0,247	0,359	0,281	0,316
	0,086	0,256	0,235	0,285	0,298	0,314
<b>Media ± SD</b>	<b>0,098 ± 0,02</b>	<b>0,260 ± 0,01</b>	<b>0,232 ± 0,01</b>	<b>0,308 ± 0,03</b>	<b>0,307 ± 0,02</b>	<b>0,371 ± 0,05</b>
<b>Muestra N°3</b>	0,149	0,208	0,165	0,210	0,255	0,281
	0,094	0,217	0,170	0,203	0,298	0,303
	0,098	0,233	0,197	0,202	0,262	0,321
<b>Media ± SD</b>	<b>0,113 ± 0,02</b>	<b>0,219 ± 0,01</b>	<b>0,177 ± 0,01</b>	<b>0,205 ± 0,003</b>	<b>0,276 ± 0,01</b>	<b>0,301 ± 0,01</b>

**Anexo 5.** Índice de polidispersidad medio (PDI) ± SD, n = 3, de las NCs basadas en protamina durante el ensayo de estabilidad a partir del promedio de 3 medidas de 13 barridos cada una realizado por el Zetasizer® Nano ZS.