

# Synthesis, characterization and release kinetic evaluation of starch nanoparticles loaded with enrofloxacin

Eduardo Yupanqui<sup>1</sup>, Sol Angel Rodriguez<sup>1</sup>, and Marly P. Alvites<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento Académico de Ciencias, Universidad Privada del Norte, Perú, [sol.rodriguez@upn.edu.pe](mailto:sol.rodriguez@upn.edu.pe)

<sup>1</sup> Departamento Académico de Ciencias, Universidad Privada del Norte, Perú, [eduardo.yupanqui@upn.edu.pe](mailto:eduardo.yupanqui@upn.edu.pe)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú, [marly.puente@upch.pe](mailto:marly.puente@upch.pe)

*Abstract- Starch is a natural polysaccharide, versatile and widely available thanks to various native products of Peru, which can be used for the development of new engineering materials. In recent years, starch nanoparticles have been proposed as promising materials for the development of new pharmaceuticals, nutraceuticals or reinforcements (fillers). Hence, the objective of this research is to produce starch nanoparticles from Peruvian potato starches for transport and drug delivery, using enrofloxacin (ENX) as a model drug. Starch nanoparticles were obtained using a flash-nanoprecipitation. Tween®80 was used as a surfactant and sodium tripolyphosphate (STPP) as a crosslinking agent. After the elaboration, all the systems were characterized with various morphological, structural and thermal tests, as well as the encapsulation capacity and drug release of the systems were studied. As a result, the size of the starch nanoparticles was in the range of 10 to 150 nm in diameter, while the sizes of ENX-loaded starch nanoparticles range between 60 and 240 nm. However, no relationship was observed between the variants of potato starch and the characteristics of the starch nanoparticles systems. In all cases, it was shown that the release of ENX is dominated by Fickian diffusive phenomena. In conclusion, the results indicate that starch particles could be considered good alternatives for the preparation of excipients due to the ease of preparation and the possibility of controlling the release kinetics of drugs and active substances.*

*Keywords—Native starch, starch nanoparticles, nanoprecipitation, enrofloxacin, drug-delivery system.*

**Digital Object Identifier:** (only for full papers, inserted by LACCEI).

**ISSN, ISBN:** (to be inserted by LACCEI).

**DO NOT REMOVE**

# Síntesis, caracterización y estudio cinético de liberación de nanopartículas de almidón cargadas con enrofloxacin

Eduardo Yupanqui<sup>1</sup>, Sol Angel Rodriguez<sup>1</sup>, and Marly P. Alvites<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento Académico de Ciencias, Universidad Privada del Norte, Perú, [sol.rodriguez@upn.edu.pe](mailto:sol.rodriguez@upn.edu.pe)

<sup>1</sup> Departamento Académico de Ciencias, Universidad Privada del Norte, Perú, [eduardo.yupanqui@upn.edu.pe](mailto:eduardo.yupanqui@upn.edu.pe)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú, [marly.puente@upch.pe](mailto:marly.puente@upch.pe)

**Resumen**– El almidón es un polisacárido natural, versátil y ampliamente disponible en cultivos peruanos, los cuales pueden ser utilizados como materias primas para el desarrollo de nuevos materiales de ingeniería. En los últimos años, las nanopartículas de almidón se han propuesto como materiales prometedores para muchas aplicaciones, por ejemplo, para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos, nutraceuticos o refuerzos (rellenos). En base a ello, el objetivo de esta investigación es desarrollar nanopartículas de almidón a partir de almidones de papas peruanas para transporte y liberación de fármacos, empleando enrofloxacin (ENX) como fármaco modelo. Las nanopartículas de almidón se obtuvieron mediante una técnica de nanoprecipitación flash (rápida). Para esta técnica se utilizó Tween®80 como surfactante y tripolifosfato de sodio (STPP) como agente de entrecruzamiento. Tras la elaboración, todos los sistemas se caracterizaron mediante pruebas morfológicas, estructurales y térmicas; asimismo se estudió la capacidad de encapsulamiento y liberación de fármaco en los sistemas. Como resultado, el tamaño de las nanopartículas de almidón estuvo en el rango de 10 a 150 nm de diámetro, mientras que las nanopartículas de almidón cargadas con ENX obtuvieron tamaños entre 60 y 240 nm. Sin embargo, no se observó relación entre las variantes del almidón de papa y las características de los sistemas elaborados. Para todos los sistemas, se evidenció que la liberación de ENX se encuentra dominada por fenómenos difusivos fickianos. En conclusión, los resultados indican que las partículas de almidón podrían ser consideradas buenas alternativas para la elaboración de excipientes por la facilidad de preparación y la posibilidad de controlar la cinética de liberación de fármacos y sustancias activas.

- Permeabilidad y movilidad en membranas.
- Capacidad de absorción y adsorción de sustancias activas.
- Disminución considerable de toxicidad en sistemas soportados en nanopartículas.
- Liberación controlada de sustancias activas durante el transporte, localización y distribución del fármaco en un tejido, organismo y/o membrana.
- Mejor eficiencia de encapsulamiento/absorción de fármacos (hidrofilicos y lipofílicos).
- Estabilidad en suspensión gracias a la carga superficial.

Sin embargo, diversos autores también describen ciertas limitaciones como las posibles agregaciones entre partículas [7] o que se desconocen las tasas de toxicidad a largo plazo [2]. Particularmente, se ha investigado ampliamente el desarrollo de nanopartículas de carácter polimérico debido a diversos factores. Los polímeros empleados (p.e. poliácridatos, PVA, policaprolactona, etc.) han demostrado ser biodegradables, biocompatibles, sencillos de sintetizar y modificar, solubles y/o dispersables en agua y no citotóxicos [8]. De la misma manera, ciertos biopolímeros (p.e. quitosano, colágeno, almidón, alginato, etc.) han demostrado tener mejor biocompatibilidad y gran disponibilidad; a contramano, son bastante heterogéneos y dependen de las características de la fuente biológica [9].

Uno de los biopolímeros más importantes, y que han gozado de gran aceptación, es el almidón. El almidón es un carbohidrato empleado en las industrias de alimentos, de aditivos y de medicamentos debido a su gran versatilidad y funcionalidad, sirviendo como ingrediente base para la elaboración de pastas y suspensiones estables, principalmente [10]. En la naturaleza, el almidón representa la reserva energética más importante para las plantas y se forma en el citoplasma de las células vegetales, pudiendo presentar diferencias en base a la fuente biológica [11]. Estructuralmente, el almidón es una macromolécula semicristalina que se encuentra en forma de gránulos compuestos por dos carbohidratos derivados de la glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa es una cadena polimérica lineal formada por unidades de glucosa que forman enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídico y representan entre el 20 y 30% en masa del almidón [12]. La amilopectina, por otro lado, es una cadena polimérica de glucosa con un alto peso molecular con una estructura similar a la amilosa, salvo por la presencia de

## I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha revolucionado distintos campos en la disciplina de la ingeniería y ciencia de materiales, logrando el diseño de “nanomateriales”, materiales que, dependiendo de la fuente de origen, se pueden elaborar a partir de materiales orgánicos e inorgánicos [1]. Específicamente, para estos materiales se considera que alcanzan la escala nanométrica cuando, al menos una de sus dimensiones, tiene un tamaño menor a 100 nm [2], aunque otros autores consideran nanopartículas a partículas con diámetros menores a 500 nm [3,4] o, incluso, diámetros menores a 1000 nm [5]. Específicamente, en la medicina y farmacia, se han desarrollado partículas novedosas tales como nanocápsulas, nanoesferas, nanogeles, nanopartículas metálicas, entre otras [6], las cuales ofrecen propiedades muy interesantes tales como como:

ramificaciones con enlaces tipo  $\alpha$ -1,6-glicosídicos y representan entre el 70-80% de masa restante [13]. Ambas moléculas se encuentran empaquetadas en los gránulos y la proporción de ambas puede diferir según la fuente [14]. Por ejemplo, en las papas, el almidón representa entre el 15 y 20% de la masa y se encuentra formando gránulos elípticos en un rango de 10-100  $\mu$ m de diámetro promedio [15].

Por otro lado, las nanopartículas a base de almidón han demostrado ser una opción favorable para fabricar materiales y sistemas de transporte en el campo de la biomedicina [14] y en la industria farmacéutica [16], siendo muy útiles para la fabricación de excipientes. Dentro de las propiedades de las nanopartículas de almidón, reportadas en la literatura, encontramos características como la biocompatibilidad, citotoxicidad y comestibilidad [17]. Adicionalmente, se han reportado estudios donde estas partículas se emplean como sustratos para la elaboración de nuevos medicamentos para tratar enfermedades dermatológicas, gastrointestinales, respiratorias, oculares y ginecológicas. [18]. Por otro lado, diversas técnicas se han reportado para obtener nanopartículas de almidón tales como la emulsificación simple [19], doble emulsificación [20], recristalización [21], electrospray [9] e hidrólisis [22]. Sin embargo, múltiples estudios indican que una manera eficaz y sencilla de para obtener nanopartículas de almidón es por el método de desplazamiento de solvente, también conocido como nanoprecipitación. El método fue elaborado por Fessi et al. [23] y se basa en la deposición interfacial de cadenas poliméricas seguido de un desplazamiento de un solvente semipolar soluble en agua. Entre las ventajas que ofrece la nanoprecipitación se encuentra la baja complejidad y el bajo consumo energético, además es aplicable en a diversos polímeros como PLGA, PLA, poli- $\epsilon$ -caprolactona proteínas y polisacáridos como el almidón [24]. Estudios previos desarrollados por Hebeish et al. [25] y Naggar et al. [26] demuestran que es posible desarrollar nanopartículas de almidón por este método, aprovechando que el almidón se puede retrogradar en presencia de medios alcalinos y conglomerar en partículas en presencia de medios no solventes. No obstante, se podría explorar la aplicación de esta tecnología hacia variantes no comerciales de almidón, como lo son las papas nativas, que son un recurso abundante a nivel Sudamérica.

En base a lo mencionado, el objetivo de la presente investigación es desarrollar nanopartículas de almidón a partir de almidones de papas nativas usando el método de nanoprecipitación para el transporte de medicamentos. Para este fin se usará enrofloxacin (ENX) como medicamento modelo. La pregunta de investigación que se plantea es ¿Cuál es el potencial del almidón de papas nativas para la elaboración de sistemas de transporte y liberación de medicamentos? Las nanopartículas de almidón fueron caracterizadas morfológica y estructuralmente a fin de conocer las propiedades y predecir sus potenciales aplicaciones. Las cinéticas de liberación se determinaron por diálisis y se analizaron los perfiles de liberación en base a diversos modelos. Con este estudio se contribuirá al desarrollo de

nuevos sistemas de transporte y liberación de medicamentos utilizando biopolímeros de origen natural como excipientes.

## II. METODOLOGÍA

### 1) ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

#### A. Extracción de almidón

El almidón se extrajo de tres variantes diferentes de papa (*Solanum tuberosum*) variantes “negra” (PN), “blanca” (PB) y “Huamantanga” (PH) siguiendo el método de extracción sugerido por Fernando G. Torres et al. [14] y F. G. Torres et al. [27]. Se tomó 1 kg de cada especie de papa y se procedió al lavado, pelado, cortado y triturado en agua destilada. Posteriormente, se dispuso la mezcla a sedimentación durante 4 horas y se separó el sedimento del sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en una solución acuosa de metanol (1:1 en volumen) y colocado en reposo durante 1 hora. Finalmente, el precipitado se retira y se somete a secado en estufa a 40°C durante 48 horas. Un esquema de extracción se puede apreciar en la Fig. 1.

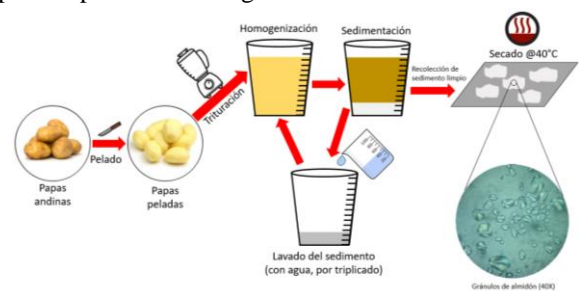


Fig. 1. Esquema de extracción de almidón (elaboración propia).

#### B. Elaboración de nanopartículas de almidón

Las nanopartículas de almidón fueron elaboradas por la técnica de nanoprecipitación, basado en los estudios de El-Naggar et al. [26] y Hebeish et al. [25], con ciertas modificaciones. Se empleó Tween®80 (Sigma-Aldrich) como agente surfactante y tripolifosfato de sodio o STPP ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ , grado analítico) como agente de entrecruzamiento. Para la elaboración, 1 gramo de almidón de papa se dispersó en 70 ml de una solución acuosa con 0,3g de NaOH y se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente hasta la homogeneización. Seguidamente, se añade una solución de agente dispersante (0,2g de Tween®80 en 20 ml de agua) por goteo (1 ml por minuto) mientras la solución de almidón se mantiene en agitación constante durante 1 hora. Posteriormente, 10 ml de una solución acuosa con 0,4 g de tripolifosfato de sodio ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ , agente entrecruzante) se añaden por goteo a la solución a un flujo de 1 ml por minuto y se mantiene en agitación por 4 horas para asegurar la reacción de entrecruzamiento, obteniendo al final un volumen total de 100 ml. Finalmente, se precipitan las partículas de almidón añadiendo 100 ml de etanol en agitación constante hasta la formación de un precipitado blanco. Para recuperar las partículas, la suspensión se centrifuga a 4500 RPM durante

una hora, descartando el sobrenadante. Las partículas se resuspenden en etanol y se centrifugan por 30 min, realizando esto por triplicado para después disponer. Para la elaboración de partículas de almidón cargadas con enrofloxacin – ENX (> 99.3%, Zhejiang Goubang Pharmaceutical Co., LTD.) se disolvió enrofloxacin (20 mg y 50 mg) en las soluciones de Tween@80 y se añadieron por goteo sin modificar los pasos posteriores a la formación de partículas de almidón. En la Fig. 2 se puede apreciar un esquema representativo y en la Tabla I se muestra un resumen de las muestras cargadas con ENX.

Tabla I: Muestras elaboradas sobre las nanopartículas de almidón.

Muestra	Detalle de elaboración
NP-PN	1g de papa negra, 0,2 g de Tween@80, 0,4 g STPP
NP-PB	1g de papa negra, 0,2 g de Tween@80, 0,4 g STPP
NP-PH	1g de papa blanca, 0,2 g de Tween@80, 0,4 g STPP
NP-PN 20 mg	1g de papa negra, 0,2 g de Tween@80, 0,4 g STPP, 20 mg de ENX.
NP-PN 50 mg	1g de papa negra, 0,2 g de Tween@80, 0,4 g STPP, 50 mg de ENX
NP-PB 20 mg	1g de papa blanca, 0,2 g de Tween@80, 0,4 g STPP, 20 mg de ENX
NP-PB 50 mg	1g de papa blanca, 0,2 g de Tween@80, 0,4 g STPP, 50 mg de ENX
NP-PH 20 mg	1g de papa huamantanga, 0,2 g de Tween@80, 0,4 g STPP, 20 mg de ENX
NP-PH 50 mg	1g de papa huamantanga, 0,2 g de Tween@80, 0,4 g STPP, 50 mg de ENX

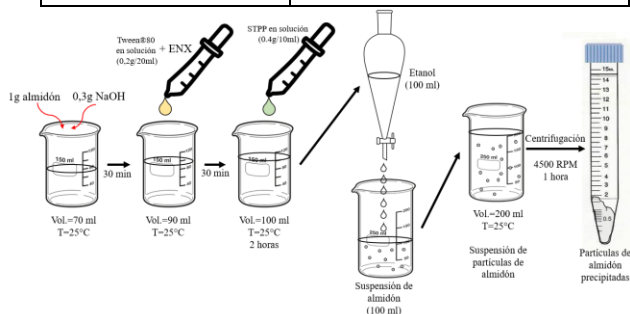


Fig. 2. Esquema de elaboración de partículas de almidón (elaboración propia).

## 2) TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

### A. Caracterización morfológica

La morfología de las nanopartículas de almidón se evaluó usando un microscopio de fuerza atómica (AFM) Easyscan 2 (NANOSURF) acoplado con una viga (cantiléver) con una punta de <10 nm de radio, una constante nominal de 42 N/m a una frecuencia de 179 Hz. Previamente, las muestras de partículas obtenidas fueron resuspendidas en agua destilada y sonicadas durante un minuto. Una gota de la suspensión se coloca en una mica y se deja secar a temperatura ambiente. La forma y diámetro de las partículas se analizaron con el software de análisis NANOSURF.

El tamaño de las partículas en suspensión acuosa fue medido según la técnica de dispersión dinámica de luz (Dynamic light scattering – DLS) empleando un equipo NanoS90 Particle Size Analyzer (MALVERN). 1 mg de muestra de partícula fue resuspendida en 1ml de agua y se dejó en reposo por 5 min a 25°C, momento en el que se alcanzó la homogeneización. Por cada muestra se realizaron 3 medidas de 30 barridos por medida. Los valores de los índices de refracción y de viscosidad utilizados fueron 0,8872 y 13330 respectivamente. El potencial Zeta se midió empleando un analizador NANO ZS Zeta Potential Analyzer (MALVERN). 1 mg de muestra de partículas se resuspendió en 1 ml de agua y se dispersó con sonicación (30 min a 120W) con un posterior reposo hasta homogeneización. El analizador emplea un láser (Laser Doppler Velocimetry) para determinar la movilidad electroforética, obteniendo el valor de potencial zeta con la ecuación de Smoluchowski [28].

$$v_E = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r \frac{\zeta}{6\pi\mu} (1 + \kappa r) \dots\dots(1)$$

Donde  $\epsilon_0$  es la constante dieléctrica relativa y  $\epsilon_r$  es la permitividad dieléctrica del vacío,  $\mu$  es la viscosidad de la solución,  $r$  es el radio de la partícula y  $\kappa$  es el parámetro de Debye-Hückel.

### B. Análisis estructural

La espectroscopía infrarroja (FTIR) se realizó empleando un equipo FTIR-7600 Spectrometer (LAMBDA SCIENTIFIC). Las muestras secas se mezclaron y prensaron con KBr para poder formar “pellets” para los ensayos. Para cada muestra, se realizaron 32 barridos a una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> en un rango de número de onda de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>.

La difracción de rayo X (XRD) fue realizada en un equipo Bruker D8 Advance acoplado con un espejo paralelo Göbel y un detector VANTEC PSD. El voltaje aplicado fue de 40kV, la intensidad de corriente de 40 mA y se empleó una fuente Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=0.15418$  nm). La velocidad de barrido fue de 0,2s con un intervalo de 0,023° y el rango de barrido fue de 5 a 70° (2 $\theta$ ).

### C. Estudios de absorción y liberación de fármaco

El estudio para medir la absorción de ENX en las partículas consistió en emplear 10 mg de muestra seca de partículas para resuspendirlas en 5 ml de PBS (solución buffer de fosfato, pH=7,4). Las suspensiones se mantuvieron en agitación por 24h y, posteriormente, se centrifugaron y se resuspendieron sobre el mismo sobrenadante por triplicado. Finalmente, el sobrenadante se recupera para medir la

absorción de fármaco. La presencia de ENX se midió empleando espectrofotometría UV en un equipo UV-VIS Lambda 950 Perkin Elmer a 271 nm [29]. Para medir la cantidad absorbida (EA) en las partículas se empleó la siguiente ecuación:

$$EA = \frac{\text{Cantidad de ENX (mg)}}{\text{Masa de la muestra (g)}} \dots\dots(2)$$

Para evaluar la tasa de liberación de fármaco se realizaron ensayos in-vitro. Aproximadamente 10 mg de muestra de partículas se suspendieron en 1 ml de medio buffer (0,1M PBS, pH 7,4) a 37°C y se colocaron en una membrana de diálisis (float-a-lyzer). La membrana de diálisis con la suspensión se introdujo a un vaso con 10 ml de medio buffer a 37°C en agitación constante. Durante diversos periodos de tiempo (entre 30 y 480 minutos) se tomaron muestras de 1 ml y se reemplazaron con solución buffer fresca para mantener volumen constante (10 ml). Para cada muestra tomada se midió la cantidad de ENX empleando el equipo UV-VIS descrito en la sección anterior. Finalmente, todos los datos se plotearon en curvas de “Liberación acumulada (%) vs. Tiempo (h)” y se realizaron análisis de cinéticas de liberación empleando diversos modelos.

### 3) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados y expresados como Promedio±Desviación Estándar. Los estudios de cinéticos y de liberación se analizaron empleando ANOVA en una plantilla Excel (Microsoft Office 2010) El nivel de significancia empleado fue  $p < 0.05$ .

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las nanopartículas de almidón se elaboraron por el método de nanoprecipitación-flash empleando Tween®80 como agente surfactante y Tripolifosfato de sodio-STPP ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ) como agente entrecruzante. El término “flash” hace referencia a la velocidad de precipitación de las nanopartículas. Estas nanopartículas nuclean rápidamente en presencia de un medio no solvente (etanol anhidro) que brinda condiciones de supersaturación [30]. La técnica de nanoprecipitación contempla que la separación de las nanopartículas de almidón se debe realizar en medios orgánicos debido a que el cambio de polaridad permite la precipitación (desplazamiento en medio no solvente) [24]. Otros solventes empleados son la acetona, el hexano, cloruro de metileno, dioxano y etanol [28-29], que tienen la capacidad de disolver sustancias hidrofóbicas, como diversos fármacos, por lo que este método es muy empleado para la elaboración de sistema de encapsulamiento y transporte de sustancias activas [30, 31]. El almidón fue disuelto en una solución de NaOH, lo que permitió la disrupción de las cadenas de polisacárido dentro de los gránulos. En solución alcalina, los gránulos de almidón se hinchan, permitiendo la hidratación de cadenas con un debilitamiento de las interacciones de enlaces puente hidrógeno y disrupción de dominios cristalinos [21,

29]. Por otro lado, las cadenas de polisacárido cuentan con grupos hidroxilos en los anillos de glucosa, los cuales pueden interactuar con grupos fosfato del STPP ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), formando nuevos enlaces covalentes y creando entrecruzamientos de carácter químico. Este fenómeno químico sucede dentro de las gotas formadas por la acción del surfactante [35]. El-Naggar et al. [26] proponen un modelo en el cual los entrecruzamientos se darían entre carbonos C6-C6, C3-C3, C6-C2 o C6-C3 de los anillos de glucosa, el cual se puede apreciar en la Fig. 3.

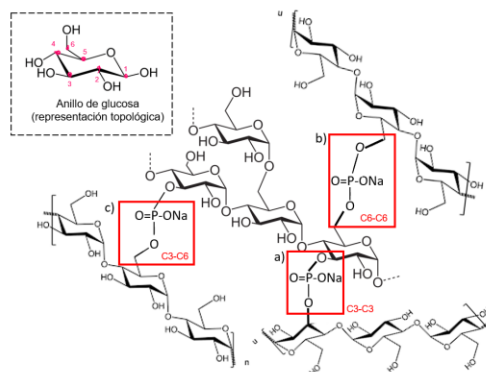


Fig. 3. Estructura propuesta para el entrecruzamiento de almidón con STPP. a) entrecruzamiento entre carbonos C3-C3, b) entrecruzamiento entre carbonos C6-C6 y c) entrecruzamiento entre carbonos C3-C6. Inserto: Representación de un anillo de glucosa. (Elaboración en base al modelo descrito por Ref. [26]).

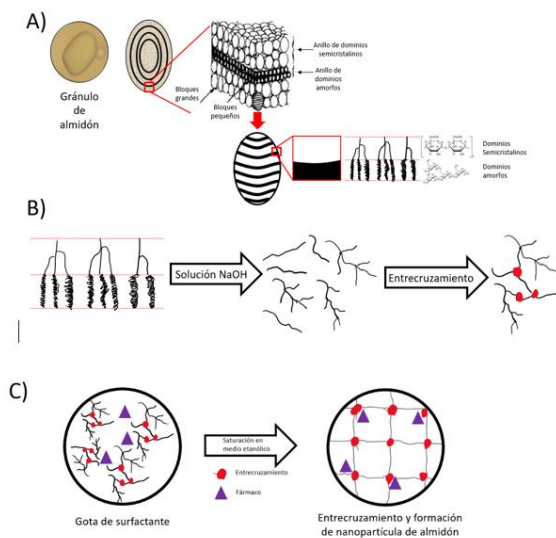


Fig. 4. Representación esquemática de un mecanismo propuesto de formación de nanopartículas de almidón cargadas con medicamento. Elaboración propia. A) Estructura de los gránulos de almidón (según lo descrito por [36]). B) Etapas de gelatinización y entrecruzamiento de las moléculas de polisacárido. C) mecanismo de formación de las nanopartículas de almidón.

Para la elaboración de nanopartículas de almidón, una de las primeras variables a evaluar fue la proporción de almidón de papa sobre la cantidad de solución de NaOH. Para esta primera parte, se mantuvo constante la concentración de NaOH a 0.3%*m/v* y se mantuvo una proporción constante de



Tween®80 (0.2g Tween®80 : 1g almidón) y de STPP (0.4g STPP : 1g almidón) en base a lo reportado en numerosos estudios para nanopartículas de otros almidones [18, 33–36]. Por otro lado, se trabajó con soluciones de almidón al 1%, 5% y 10% m/v basado en las proporciones reportadas por estudios previos para otros almidones [21, 22, 37, 38]. Sin embargo, al emplear suspensiones de almidón por encima del 5% m/v se aprecia la aparición de un precipitado de gran tamaño el cual correspondería a almidón gelatinizado producido por la agregación de cadenas de amilosa y amilopectina. Cabe mencionar que el almidón de papa es un almidón que presenta una densidad mayor y una estructura más compacta en comparación a almidones de cereales [11], por lo que este almidón tiene resistencia a la hidrólisis enzimática y forma suspensiones de viscosidad media y alta [40, 41]. Al finalizar el proceso de disolución de almidón, el desplazamiento se realiza empleando etanol en proporción 1:1 en relación a la suspensión de almidón, el cual se añade por goteo. Si bien existen estudios previos que exploran el empleo de hasta 20 veces de volumen de etanol, [44], se optó por emplear la proporción 1:1 pues es la que ofreció una precipitación rápida y adecuada.

La formación de nanopartículas de almidón se puede explicar en base a la modificación de la estructura interna del almidón. Las cadenas de polisacáridos presentan grupos funcionales •OH que pueden interactuar con otros grupos funcionales, generando un entrecruzamiento químico (cross-linking). Este fenómeno permite generar puntos activos donde podrían enlazarse compuestos activos (fármacos). Por ejemplo, Shi et al. [45] propusieron que las sales fosfato podrían servir para generar partículas de almidón con un grado de entrecruzamiento tal que permita obtener partículas esféricas y de tamaños homogéneos. Similarmente, El-Naggar et al. [26] entrecruzaron nanopartículas de almidón con STPP y los grupos funcionales fosfato presentaron interacciones, aunque débiles, con los grupos amino e hidroxilo de la molécula de diclofenaco. Tan et al. [46] realizaron una modificación de las cadenas de almidón con grupos acetatos para controlar el tamaño de las nanopartículas en función del agente entrecruzante y, posteriormente, Minimol et al. [47] sugirieron que los grupos acetato pueden interactuar con moléculas como la insulina. Otros estudios sugieren que el almidón podría mezclarse con otro polisacárido como el quitosano para mejorar la resistencia a medios acuosos y transferir sustancias como ácido aminosalicílico [48] o albúmina [49]. En todos los casos, se demostró que existe una interacción entre los grupos funcionales de las moléculas de fármaco y los grupos funcionales de los excipientes. Por otro lado, el empleo de surfactante Tween®80 es indispensable debido a que varios fármacos son liposolubles. Ello brinda un medio para disolver el medicamento y generar un medio de contacto entre grupos funcionales [50]. Un modelo del mecanismo de formación de nanopartículas de almidón se puede apreciar en la Fig. 4.

Para evaluar la morfología de las nanopartículas de almidón se empleó la microscopía de fuerza atómica (AFM) junto con la dispersión dinámica de luz (DLS). Se tomaron como referencias ciertas imágenes para realizar un cálculo del diámetro aproximado. Como se puede apreciar en las imágenes de la Fig. 5, las nanopartículas presentan formas redondeadas, aunque es posible encontrar aglomeraciones. Por otro lado, se puede apreciar que existe una tendencia en cuanto a los tamaños de las nanopartículas. Por ejemplo, las nanopartículas cargadas elaboradas junto con 20 mg de ENX presentan tamaños entre 60 y 170 nm; mientras que las nanopartículas elaboradas con 50 mg de ENX presentan tamaños entre 120 y 240 nm. Adicionalmente, las imágenes muestran que los tamaños pueden llegar a ser bastante heterogéneos, aun cuando se mantuvo la cantidad constante de surfactante. Posiblemente se deba a la presencia de aglomeraciones debido a las interacciones entre las nanopartículas, especialmente los grupos fosfato. De manera complementaria, los análisis por DLS (Tabla II) demuestran que las nanopartículas presentan tamaños de diámetro hidrodinámico entre 171 y 224 nm. De los valores de diámetros obtenidos, no se aprecia que las NP presenten el fenómeno de hinchamiento, en comparación a otras nanopartículas de biopolímeros [51, 52]. Los valores de polidispersión están cercanos a 0.5, por lo que las nanopartículas presentan tamaños heterogéneos. Ello se puede comprobar con las imágenes AFM. Finalmente, es importante mencionar que los valores de potencial zeta suelen estar entre -4 y -11 mV, lo cual está dentro del rango [-30 mV ; +30mV], lo que indica que las nanopartículas forman suspensiones coloidales inestables, probablemente debido a la posibilidad de formar agregados por atracciones de Van der Waals [53, 54]. Estudios previos indican que el diámetro para nanopartículas de almidón, elaboradas por nanoprecipitación, puede oscilar entre 20 y 200 nm. El-Naggar et al. [26] obtuvieron nanopartículas entre 20 y 80 nm empleando almidón de maíz; mientras que Simi et al. [55] obtuvieron nanopartículas de hasta 75 nm empleando almidón de yuca. Empleando el mismo método, Hebeish et al. [25] obtuvieron nanopartículas de hasta 400 nm a partir de almidón de maíz nativo, concluyendo que este tamaño se puede controlar con el contenido de surfactante. Para este estudio, la proporción de surfactante se mantuvo constante y se deduce que los tamaños suelen ser heterogéneos y no se aprecia una relación entre la variedad del almidón de papa y el tamaño de las nanopartículas. Por otro lado, las nanopartículas no demostrarían cambios significativos en su tamaño cuando se encuentran en suspensión acuosa. Los valores de potencial Zeta se encuentra entre 0 mV y -10 mV (dentro del rango -30 mV a +30mV), lo que indica que estas partículas no presentarían estabilidad coloidal [42, 43]. Además, se observa que el diámetro hidrodinámico no varía significativamente en comparación a los diámetros obtenidos por microscopía AFM.

El espectro FTIR de nanopartículas de almidón (Fig. 6) muestra un pico a  $1211\text{ cm}^{-1}$  y  $1213\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a

vibraciones de estiramiento antisimétricas de los grupos  $\text{PO}_2$ , y una señal a  $1159\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la presencia de formas  $\text{P=O}$  [26]. Adicionalmente, la banda entre  $3300\text{ cm}^{-1}$  y  $3200\text{ cm}^{-1}$  se vuelve más ancho evidenciando, probablemente, una reducción de grupos OH, propio del entrecruzamiento. En el caso de las nanopartículas de almidón cargados con ENX (muestras NP-PN 20 mg y NP-PN 50 mg), se aprecia la aparición de bandas características de ENX a  $717\text{ cm}^{-1}$  y  $770\text{ cm}^{-1}$  (flúor enlazado) [56], así como las bandas entre un traslape en los picos característicos de ENX a  $1120\text{ cm}^{-1}$  y  $1155\text{ cm}^{-1}$  hacen referencia al enlace F-C de ENX [57]. Adicionalmente, otras bandas características de ENX se dan entre  $1635\text{ cm}^{-1}$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a contracciones de enlaces C=O [58]. No obstante, no se aprecian ciertos picos característicos de ENX en  $1335\text{ cm}^{-1}$  (vibración C-N),  $1252\text{ cm}^{-1}$  (vibración C-F), y señales en  $1464\text{ cm}^{-1}$  y  $1510\text{ cm}^{-1}$  (C=C) [59, 60] debido a traslapes con las bandas de las nanopartículas de almidón. Según lo reportado, se evidencia la absorción de ENX en las nanopartículas de almidón, especialmente en la muestra NP-PN 50 mg, la cual presenta una mayor cantidad de ENX absorbida. No obstante, no se evidencia la aparición de picos extraños, lo que indica que no se han formado nuevos enlaces químicos entre ENX y cadenas de almidón.

La Fig. 7 muestra la difracción de rayos X para las nanopartículas de almidón. Para las nanopartículas de almidón se aprecian los picos característico de las nanopartículas de almidón a  $8,6^\circ$ ,  $14^\circ$  y  $20^\circ$ , relacionados con el exceso de STTP [61], y los picos a  $15^\circ$  y  $17^\circ$  relacionados con las nanopartículas de almidón. Por otro lado, el difractograma de ENX muestra picos característicos en  $2\theta = 7.3^\circ$ ,  $2\theta = 9.8^\circ$  y  $2\theta = 15^\circ$  [62], los cuales no aparecen para las muestras NP-PN 20 mg y NP-PN 50 mg. Este comportamiento demuestra que ENX se presenta en un estado amorfo y/o disperso en las nanopartículas [25, 26], y los estudios de FTIR demostrarían que se ha logrado absorción en las partículas. Ello es posible debido a que ENX es soluble en soluciones de Tween®80 [63], la cual reduce las zonas cristalinas e incrementa la capacidad de interacción entre las moléculas de ENX y las nanopartículas de almidón.

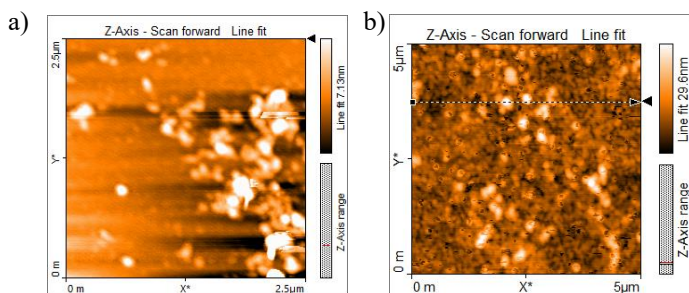


Fig. 5. Imágenes representativas de microscopía AFM para las muestras a) NP-PB, b) NP-PB 50 mg.

Tabla II. Resumen de diámetros de las nanopartículas de almidón medidos por microscopía de fuerza atómica (AFM) y dispersión dinámica de luz (DLS) a  $25^\circ\text{C}$ ; y de valores de potencial Zeta (mV). [Promedio  $\pm$  DS]

Muestra	Diámetro promedio medido por AFM (nm)	Diámetro hidrodinámico (nm)	Zeta Potential (mV)
NP-PN	10 - 100	$38.48 \pm 25.41$ (PdI=0.240)	-10.60
NP-PB	50 - 130	$64.47 \pm 16.85$ (PdI=0.430)	-4.50
NP-PH	80 - 120	$50.21 \pm 20.15$ (PdI=0.267)	-5.92
NP-PN 20 mg	60 - 130 nm	$171.9 \pm 11.87$ nm (PdI = 0.514)	-9.45
NP-PN 50 mg	130 - 210 nm	$265.2 \pm 39.74$ nm (PdI = 0.491)	-8.41
NP-PB 20 mg	70 - 150 nm	$163.1 \pm 29.84$ nm (PdI = 0.452)	-10.81
NP-PB 50 mg	120 - 240 nm	$205.0 \pm 40.25$ nm (PdI = 0.414)	-4.02
NP-PH 20 mg	80 - 170 nm	$173.1 \pm 21.62$ nm (PdI = 0.565)	-11.68
NP-PH 50 mg	150 - 240 nm	$224.3 \pm 33.04$ nm (PdI = 0.578)	-9.30

La eficiencia de absorción de ENX en las nanopartículas de almidón se determinó por espectroscopía UV y se registró en la Tabla N°III. El atrapamiento de enrofloxacin para las muestras NP-PN 20mg, NP-PB 20mg y NP-PH 20mg oscila ente 11 y 13 mg de ENX por gramo de muestra, lo que indica una eficacia de atrapamiento de oscila entre 42.7% y 45.2%. Por otro lado, el atrapamiento de enrofloxacin para las muestras NP-PN 50mg, NP-PB 50mg y NP-PH 50mg oscila entre 21.3 y 23.8 mg de ENX por gramo de muestra, lo que indica una eficacia de atrapamiento de oscila entre 59.7% y 65.4%. La absorción de enrofloxacin depende del contenido de surfactante (Tween®80) y la ENX es una fluoroquinona soluble en polisorbatos [63]. En este caso, no se aprecia una influencia según el tipo de almidón y la capacidad de absorción de ENX; sin embargo, si se aprecia que existe una mayor masa de ENX absorbida en cuanto exista mayor disponibilidad de fármaco en la solución. Por otro lado, los valores más altos de eficiencia se logran para la muestra NP-PN 20 mg, mientras que la mayor cantidad de ENX se absorbe en la muestra de NP-PB 50 mg. Existen reportes que mencionan que la eficiencia de atrapamiento y/o encapsulamiento es mayor en cuánto las nanopartículas son más pequeñas o tienen valores altos de potencial zeta [25], [64]; sin embargo, eso no queda evidenciado en el presente estudio, por lo que se necesitaría mayor investigación para nanopartículas de almidón de papa.

Para evaluar la tasa de liberación de ENX absorbido en nanopartículas de almidón, se llevaron a cabo una prueba de liberación in vitro en PBS (pH=7,4) a  $37^\circ\text{C}$  a modo de simular un fluido corporal. Para En la Fig. 8 se muestra la liberación

acumulada de ENX ( $M_t/M_\infty$ ) de las diferentes formulaciones en un periodo de 24 horas. Para todas las muestras, al inicio se presencia una liberación rápida de fármacos (burst release) en los primeros 30 minutos y se asocia a la desorción de ENX depositado superficialmente; y, en cuanto a la tasa de liberación, esta varía entre 44% y 65%. Adicionalmente, se observa que la tasa de liberación rápida es menor para las muestras elaboradas con 50 mg de ENX. Esto podría deberse a que al tener mayor concentración de ENX, se logra una mejor interacción entre fármaco y el área superficial de las nanopartículas, tal como mencionan las teorías de El-Naggar et al. [26] y Qin et al. [37].

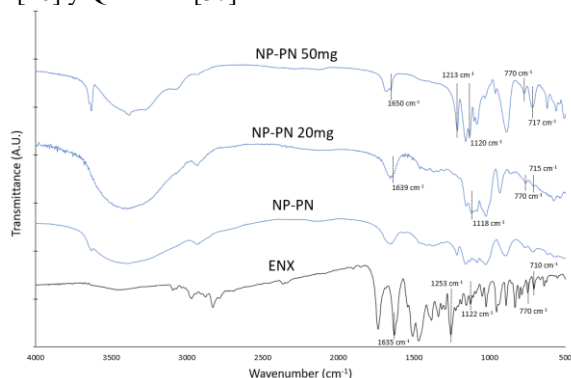


Fig. 6. Espectro FTIR de las nanopartículas de almidón.

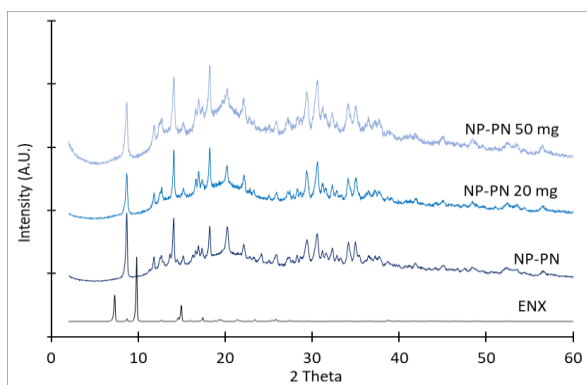


Fig. 7. Difractograma XRD de la muestra de nanopartículas de almidón sin carga y cargadas con ENX.

Tabla III. Eficiencia de encapsulamiento de ENX en nanopartículas de almidón.

Muestra	Encapsulamiento de ENX por gramo de nanopartículas de almidón (mg/g)	% Eficiencia de encapsulamiento
NP-PN 20 mg	13.086 ± 1.03	65.43 ± 7.85
NP-PN 50 mg	22.627 ± 2.14	45.24 ± 9.44
NP-PB 20 mg	12.769 ± 0.72	63.85 ± 5.61
NP-PB 50 mg	23.832 ± 1.38	47.67 ± 5.77
NP-PH 20 mg	11.96 ± 0.81	59.78 ± 6.79
NP-PH 50 mg	21.36 ± 1.85	42.72 ± 8.66

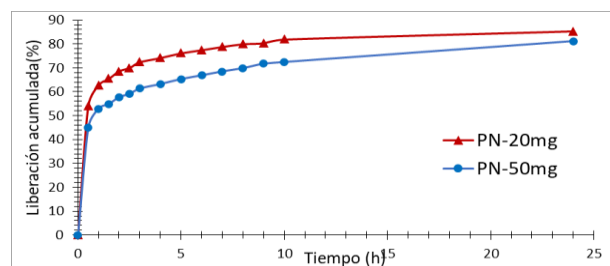


Fig. 8. Perfil de liberación *in vitro* representativo (pH=7,4) a 37°C para nanopartículas de papa "negra" (NP-PN 20 mg y NP-PN 50 mg)

La segunda fase de liberación, que corresponde a las 23 horas posteriores, se le atribuye a la difusión de ENX a través de la red de entrecruzamiento de las nanopartículas. En todos los casos, los perfiles de liberación son similares. La liberación se vuelve lenta y prolongada, sin verse influenciada por el tipo de almidón o el tamaño de las nanopartículas. En cuanto a las muestras elaboradas con 50 mg de ENX, las tasas de liberación son menores debido a que las moléculas de ENX deben difundir por las nanopartículas. En conclusión, se aprecia que la cantidad de ENX empleada en la formulación influye en la eficiencia de encapsulamiento y en la tasa de liberación. Se logran mayores cantidades de absorción de ENX y velocidades de liberación controladas con mayores cantidades de ENX empleadas en la formulación. No obstante, se podría investigar el efecto de otros tipos de almidones para conocer si existe una influencia en cuanto a capacidad de encapsulamiento y/o liberación.

Por último, se realizó un estudio de liberación de ENX con cuatro modelos matemáticos, los cuales se detallan en la Tabla IV. De acuerdo al modelo señalado por Korsmeyer-Peppas, el exponente difusional presenta valores menores a 0.15 ( $R^2 > 0.9$ ) para todos los casos, lo que indicaría que la liberación de ENX está controlada por la difusión fickiana o difusión molecular [65]. Resultados previos para nanopartículas de almidón concluyen que el mecanismo de liberación se encuentra dominado por mecanismos fickianos debido, principalmente, a las interacciones moleculares entre ENX y cadenas de almidón (interacciones de Van de Waals y/o enlaces de puente hidrógeno tipo F-H y O-H) [26], [37], [66]. Sin embargo, nanopartículas de almidón funcionalizadas con otros biopolímeros como quitosano [67] o alginato [68] han reportado que, además de presentar fenómenos de difusión fickiana, también se logra apreciar fenómenos de relajación de la red polimérica, lo que podría servir para mejorar y/o controlar el efecto de liberación. Debido a que las nanopartículas de almidón presentaron una gran liberación de ENX al inicio (burst release), se optó por evaluar el modelo de Korsmeyer y Peppas considerando el efecto de burst release. Al aplicar este modelo, se aprecia que aplica muy bien para las muestras NP-PX 50mg ( $R^2 > 0.9$ ), pero sucede lo contrario para las muestras NP-PX 20mg. En todos los casos, el ajuste es mejor si no se considera el término " $\alpha$ ".

Adicionalmente, se utilizaron otros dos modelos para describir el comportamiento de liberación de ENX: el modelo



de Higuchi y el modelo cinético de primer orden. El modelo de Higuchi describe el fenómeno de liberación considerando un estado pseudo-estacionario y empleando el término de tiempo  $t^{1/2}$  [69], mientras que el modelo de cinética de primer orden se puede emplear para evaluar la disolución absorción de medicamentos solubles en agua (Dash et al., 2010). El modelo de Higuchi presentó resultados de  $R^2 (>0.95)$  más altos para los sistemas NP-PX 50mg, mientras el modelo cinético de primer orden no se ajusta adecuadamente a ningún sistema ( $R^2 < 0.95$ ).

Como se ha detallado anteriormente, la capacidad de absorción y liberación de fármaco ENX, para el caso de nanopartículas de almidón, ha dependido de la cantidad de ENX empleada en la formulación (considerando la concentración de Tween®80 constante). A cantidad mayor de ENX se producen interacciones moleculares que incrementan la capacidad de absorción; y esto explicaría el comportamiento controlado de liberación [67]. En base a la Fig. 8, se aprecia que a menor presencia de ENX, la liberación es rápida, posiblemente debido a que el fármaco se deposita solo superficialmente. Eso se debe posiblemente a que las nanopartículas nucleon primero ante la poca disponibilidad de ENX, logrando que la poca cantidad de ENX se deposita en la

superficie. Ello podría resultar en sistemas con liberaciones bastante rápidas de ENX [60]. En todos los casos, la liberación de fármaco ENX en las nanopartículas de almidón se rige principalmente por la difusión molecular. Cabe mencionar que, en la mayoría de los casos, se busca una liberación controlada para evitar altas concentraciones en la liberación inicial. En el caso de medicamentos administrados por vía oral o vía intravenosa, es indeseable el efecto de burst release, por lo que se debe suprimir este efecto. Estudios adicionales sugieren que podrían utilizarse otros biopolímeros para formar mezclas como quitosano-almidón [67], alginato-almidón [68] o funcionalizaciones en almidón [70, 71] para reducir la liberación inicial y que la cinética sea controlada por fenómenos asociados a las interacciones de las cadenas y de la red, especialmente si se empleasen menores cantidades de fármaco. Sin embargo, en algunos casos, se requiere una liberación rápida inicial, como en el tratamiento de heridas, lo que se lograría controlando la liberación inicial (burst release) [72]. La posibilidad de adaptar la cinética de liberación podría proporcionar un método sencillo para preparar sistemas de administración de fármacos empleando almidón como excipiente.

Tabla IV. Modelos matemáticos y resultados estadísticos de regresión para evaluar el comportamiento de liberación de las nanopartículas de almidón cargadas con ENX.

Muestra	Modelos cinéticos			
	Modelo de Korsmeier-Pepas $\frac{Mt}{M_{\infty}} = K_{kp}t^n$	Modelo de Korsmeier-Pepas (considerando el término <i>burst release</i> ) $\frac{Mt}{M_{\infty}} = K_{kp}t^{0.43} + \alpha$	Cinética de primer orden $\ln \left[ 1 - \frac{Mt}{M_{\infty}} \right] = -kt$	Modelo de Higuchi $\frac{Mt}{M_{\infty}} = K_H t^{1/2}$
NP-PN 20 mg	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.652t^{0.1188}$ ( $R^2 = 0.9586$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.1009t^{0.43} + 0.5746$ ( $R^2 = 0.8492$ )	$\ln \left[ 1 - \frac{Mt}{M_{\infty}} \right] = -0.057t - 1.2067$ ( $R^2 = 0.7628$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.0754t^{1/2} + 0.605$ ( $R^2 = 0.8191$ )
NP-PN 50 mg	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.516t^{0.1470}$ ( $R^2 = 0.9925$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.1096t^{0.43} + 0.4221$ ( $R^2 = 0.9507$ )	$\ln \left[ 1 - \frac{Mt}{M_{\infty}} \right] = -0.051t - 0.6886$ ( $R^2 = 0.8958$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.0826t^{1/2} + 0.4535$ ( $R^2 = 0.9323$ )
NP-PB 20 mg	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.695t^{0.0853}$ ( $R^2 = 0.9699$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.0787t^{0.43} + 0.6289$ ( $R^2 = 0.9027$ )	$\ln \left[ 1 - \frac{Mt}{M_{\infty}} \right] = -0.0482t - 1.2853$ ( $R^2 = 0.7798$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.0591t^{1/2} + 0.6519$ ( $R^2 = 0.8798$ )
NP-PB 50 mg	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.526t^{0.1524}$ ( $R^2 = 0.9738$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.1279t^{0.43} + 0.4044$ ( $R^2 = 0.9946$ )	$\ln \left[ 1 - \frac{Mt}{M_{\infty}} \right] = -0.0767t - 0.6215$ ( $R^2 = 0.8673$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.0971t^{1/2} + 0.4392$ ( $R^2 = 0.9923$ )
NP-PH 20 mg	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.641t^{0.1239}$ ( $R^2 = 0.9403$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.1025t^{0.43} + 0.5643$ ( $R^2 = 0.8096$ )	$\ln \left[ 1 - \frac{Mt}{M_{\infty}} \right] = -0.0521t - 1.2038$ ( $R^2 = 0.6545$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.0764t^{1/2} + 0.5956$ ( $R^2 = 0.7767$ )
NP-PH 50 mg	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.520t^{0.1416}$ ( $R^2 = 0.9890$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.1103t^{0.43} + 0.4212$ ( $R^2 = 0.9767$ )	$\ln \left[ 1 - \frac{Mt}{M_{\infty}} \right] = -0.0538t - 0.6759$ ( $R^2 = 0.7110$ )	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 0.0834t^{1/2} + 0.4522$ ( $R^2 = 0.9646$ )

#### IV. CONCLUSIONES

Se emplearon almidones de papas nativas (variedades Negra, Blanca y Huamantanga) para elaborar nanopartículas de almidón por el método de nanoprecipitación rápida (flash nanoprecipitation), un método que se caracteriza por la facilidad y rapidez de ejecución, además que es versátil para trabajar con fármacos (liposolubles y acuosolubles). Para ello se empleó STPP como agente entrecruzante, polisorbato Tween®80 como surfactante y etanol como fase orgánica no solvente. Los diámetros obtenidos oscilaron entre 10 nm hasta 120 nm, aunque también presentaron distribuciones heterogéneas y poca estabilidad en suspensión. Una vez se determinó el comportamiento de las nanopartículas de almidón, se procedió a elaborar nanopartículas de almidón cargadas con ENX.

Para estos sistemas soportados en almidón, se obtuvieron nanopartículas, cuyos tamaños variaron entre 60 y 240 nm, observándose una tendencia de aumento de tamaño con respecto a la absorción de fármaco. Si bien no se ha evidenciado la capacidad de hinchamiento (los diámetros hidrodinámicos son similares), si se evidencia que la absorción de fármaco se realiza en las nanopartículas, logrando encapsulamiento de hasta 21-24 mg de ENX por gramo de nanopartículas. Evaluando la cinética de liberación para nanopartículas de almidón, se encontró que todos los sistemas elaborados presentaron el efecto de burst release, el cual parece reducirse a medida que se incrementa la absorción de ENX. Esta primera liberación (primeros 30 min) puede representar entre el 50% y 70% de ENX atrapado. Posiblemente esto tenga relación con el incremento de las interacciones moleculares entre las nanopartículas y las moléculas de ENX (fuerzas de atracción-repulsión entre grupos fosfato de las NP y fluoruro de ENX). Posterior a la primera liberación, se observa una tasa de liberación sostenida, cuya cinética se puede describir en base a fenómenos difusivos (fenómeno fickiano).

No se encontró evidencia de que la tasa de absorción y liberación dependa de la fuente de almidón, aunque otros estudios podrían complementar esta hipótesis. Finalmente, los resultados indican que las nanopartículas de almidón podrían ser consideradas buenas alternativas para la elaboración de excipientes para aplicaciones biomédicas que requieran tasas de liberación rápidas (por ejemplo, aplicaciones tópicas). Futuros estudios deberían contemplar la evaluación de las cinéticas de liberación para partículas formadas a partir de dos o más polímeros, de modo que se tenga un mayor control sobre las tasas de liberación.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Privada del Norte por el apoyo financiero para la publicación del estudio. Se agradece al personal del Laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales de la Pontificia Universidad Católica del Perú por el apoyo en los ensayos realizados.

#### REFERENCIAS

- [1] C. A. Charitidis, P. Georgiou, M. A. Koklioti, A.-F. Trompeta, and V. Markakis, "Manufacturing nanomaterials: from research to industry," *Manuf. Rev.*, vol. 1, p. 11, 2014, doi: 10.1051/mfreview/2014009.
- [2] W. H. De Jong and P. J. a. Borm, "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 3, no. 2, pp. 133–149, 2008, doi: 10.2147/IJN.S596.
- [3] M. Vishnu Priya, M. Sabitha, and R. Jayakumar, "Colloidal chitin nanogels: A plethora of applications under one shell," *Carbohydr. Polym.*, vol. 136, pp. 609–617, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.09.054.
- [4] P. Wang, E. Lombi, F. J. Zhao, and P. M. Kopittke, "Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences," *Trends Plant Sci.*, vol. 21, no. 8, pp. 699–712, 2016, doi: 10.1016/j.tplants.2016.04.005.
- [5] D. Hudson and A. Margaritis, "Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 34, no. 2, pp. 161–179, 2014, doi: 10.3109/07388551.2012.743503.
- [6] N. Jawahar and S. Meyyanathan, "Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review," *Int. J. Heal. Allied Sci.*, vol. 1, no. 4, p. 217, 2012, doi: 10.4103/2278-344x.107832.
- [7] F. F. Visentini, O. E. Sponton, A. A. Perez, and L. G. Santiago, "Biopolymer nanoparticles for vehiculation and photochemical stability preservation of retinol," *Food Hydrocoll.*, vol. 70, pp. 363–370, 2017, doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.04.020.
- [8] N. Zahin *et al.*, "Nanoparticles and its biomedical applications in health and diseases: special focus on drug delivery," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 27, no. 16, pp. 19151–19168, 2020, doi: 10.1007/s11356-019-05211-0.
- [9] S. Sundar, J. Kundu, and S. C. Kundu, "Biopolymeric nanoparticles," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 11, no. 1, p. 014104, 2010, doi: 10.1088/1468-6996/11/1/014104.
- [10] F. G. Torres, O. P. Troncoso, J. Vega, and M. Wong, "Influence of botanic origin on the morphology and size of starch nanoparticles from andean native starch sources," *Polym. from Renew. Resour.*, vol. 6, no. 3, pp. 91–104, 2015.
- [11] E. Bertoft and A. Blennow, *Structure of Potato Starch*, Second Ed. Elsevier Inc., 2016.
- [12] J. Bras and A. Dufresne, "Starch Nanoparticles : A Review," pp. 1139–1153, 2010.
- [13] H. E. Grommers and D. A. van der Krogt, *Potato Starch: Production, Modifications and Uses*, Third Edit. Elsevier Inc., 2009.
- [14] F. G. Torres, O. P. Troncoso, C. G. Grande, and D. A. Díaz, "Biocompatibility of starch-based films from starch of Andean crops for biomedical applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 8, pp. 1737–1740, 2011, doi: 10.1016/j.msec.2011.08.004.
- [15] J. H. Dupuis and Q. Liu, "Potato Starch : a Review of Physicochemical , Functional and Nutritional Properties," 2019.
- [16] O. O. Kunle, "Starch Source and Its Impact on Pharmaceutical Applications," in *Chemical Properties of Starch*, 1st ed., M. Emeje, Ed. IntechOpen Book Series, 2020, p. 35.
- [17] H. Y. Kim, S. S. Park, and S. T. Lim, "Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 126, pp. 607–620, 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.11.011.
- [18] N. Ab'lah and T. W. Wong, *Starch as oral colon-specific nano- and microparticulate drug carriers*. INC, 2020.
- [19] F. Ye, M. Miao, K. Lu, B. Jiang, X. Li, and S. W. Cui, "Structure and physicochemical properties for modified starch-based nanoparticle from different maize varieties," *Food Hydrocoll.*, vol. 67, pp. 37–44, 2017, doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.12.041.
- [20] Z. Sun, "Starch nanoparticles: modifications, toxicity, and drug loading," pp. 1–81, 2015, [Online]. Available: [https://uwaterloo.ca/bitstream/handle/10012/9301/Sun\\_Ziyi.pdf?sequence=1](https://uwaterloo.ca/bitstream/handle/10012/9301/Sun_Ziyi.pdf?sequence=1).
- [21] D. Le Corre, J. Bras, and A. Dufresne, "Starch nanoparticles: A review," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 5, pp. 1139–1153, 2010, doi: 10.1021/bm901428y.
- [22] S. Martinez, C. Rivon, O. P. Troncoso, and F. G. Torres, "Botanical origin as a determinant for the mechanical properties of starch films with nanoparticle reinforcements," *Starch/Staerke*, vol. 68, no. 9–10, pp. 935–942, 2016, doi: 10.1002/star.201600143.
- [23] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita, "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement," *Int. J. Pharm.*, vol. 55, no. 1, pp. 1–4, 1989, doi: 10.1016/0378-5173(89)90281-0.
- [24] C. J. Martínez Rivas *et al.*, "Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 532, no. 1, pp. 66–81, 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.064.
- [25] A. Hebeish, M. H. El-Rafie, M. A. EL-Sheikh, and M. E. El-Naggar, "Ultra-Fine Characteristics of Starch Nanoparticles Prepared Using Native Starch With and Without Surfactant," *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, vol. 24, no. 3, pp. 515–524, 2014, doi: 10.1007/s10904-013-0004-x.
- [26] M. E. El-Naggar, M. H. El-Rafie, M. A. El-sheikh, G. S. El-Feky, and A. Hebeish, "Synthesis, characterization, release kinetics and toxicity profile of drug-loaded starch nanoparticles," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 81, no.

- September, pp. 718–729, 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.005.
- [27] F. G. Torres, O. P. Troncoso, D. A. Díaz, and E. Amaya, “Morphological and thermal characterization of native starches from Andean crops,” *Starch/Staerke*, vol. 63, no. 6, pp. 381–389, 2011, doi: 10.1002/star.201000155.
- [28] M. Yu, M. Seipenbusch, J. Yang, and H. Jin, “A new analytical solution for solving the Smoluchowski equation due to nanoparticle Brownian coagulation for non-self-preserving system,” *Aerosol Air Qual. Res.*, vol. 14, no. 6, pp. 1726–1737, 2014, doi: 10.4209/aaqr.2014.03.0059.
- [29] A. D. Sezer, A. L. Baş, and J. Akbuğa, “Encapsulation of Enrofloxacin in Liposomes I: Preparation and In Vitro Characterization of LUV,” *J. Liposome Res.*, vol. 14, no. 1–2, pp. 77–86, 2004, doi: 10.1081/LPR-120039717.
- [30] W. S. Saad and R. K. Prud’Homme, “Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation,” *Nano Today*, vol. 11, no. 2, pp. 212–227, 2016, doi: 10.1016/j.nantod.2016.04.006.
- [31] S. F. Chin, A. Azman, and S. C. Pang, “Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a microemulsion method,” *J. Nanomater.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/763736.
- [32] N. Masina *et al.*, “A review of the chemical modification techniques of starch,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 157, pp. 1226–1236, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.094.
- [33] A. K. Maurya, A. Mishra, and N. Mishra, *Nanoengineered polymeric biomaterials for drug delivery system*. Elsevier Ltd., 2020.
- [34] F. Zhu and P. Liu, “Starch gelatinization, retrogradation, and enzyme susceptibility of retrograded starch: Effect of amylopectin internal molecular structure,” *Food Chem.*, vol. 316, p. 126036, 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.126036.
- [35] M. A. El-Sheikh, “New technique in starch nanoparticles synthesis,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 176, pp. 214–219, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.033.
- [36] S. Mishra and T. Rai, “Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches,” *Food Hydrocoll.*, vol. 20, no. 5, pp. 557–566, 2006, doi: 10.1016/j.foodhyd.2005.01.001.
- [37] X. Li, Y. Qin, C. Liu, S. Jiang, L. Xiong, and Q. Sun, “Size-controlled starch nanoparticles prepared by self-assembly with different green surfactant: The effect of electrostatic repulsion or steric hindrance,” *Food Chem.*, vol. 199, no. February 2016, pp. 356–363, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.037.
- [38] H. Lu and Y. Tian, “Nanostarch: Preparation, Modification, and Application in Pickering Emulsions,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 69, no. 25, pp. 6929–6942, 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.1c01244.
- [39] S. H. Mahmoudi Najafi, M. Baghaie, and A. Ashori, “Preparation and characterization of acetylated starch nanoparticles as drug carrier: Ciprofloxacin as a model,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 87, no. February, pp. 48–54, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.030.
- [40] S. Bel Haaj, W. Thielemans, A. Magnin, and S. Boufi, “Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maize as nanoreinforcement: A comparative study,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 143, pp. 310–317, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.01.061.
- [41] S. F. Chin, S. C. Pang, and S. H. Tay, “Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 4, pp. 1817–1819, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.07.012.
- [42] C. Semeijn and P. L. Buwalda, “Potato Starch,” in *Starch in Food*, Second ed., M. Sjöö and L. Nilsson, Eds. Elsevier Ltd, 2018, pp. 353–372.
- [43] M. Stasiak, M. Molenda, I. Opaliński, and W. Błaszczak, “Mechanical properties of native maize, wheat, and potato starches,” *Czech J. Food Sci.*, vol. 31, no. 4, pp. 347–354, 2013, doi: 10.17221/348/2012-cjfs.
- [44] X. Wu, Y. Chang, Y. Fu, L. Ren, J. Tong, and J. Zhou, “Effects of non-solvent and starch solution on formation of starch nanoparticles by nanoprecipitation,” *Starch/Staerke*, vol. 68, no. 3–4, pp. 258–263, 2016, doi: 10.1002/star.201500269.
- [45] A. M. Shi, D. Li, L. J. Wang, B. Z. Li, and B. Adhikari, “Preparation of starch-based nanoparticles through high-pressure homogenization and miniemulsion cross-linking: Influence of various process parameters on particle size and stability,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 4, pp. 1604–1610, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.10.011.
- [46] Y. Tan, K. Xu, L. Li, C. Liu, C. Song, and P. Wang, “Fabrication of size-controlled starch-based nanospheres by nanoprecipitation,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 1, no. 4, pp. 956–959, 2009, doi: 10.1021/am900054f.
- [47] P. F. Minimol, W. Paul, and C. P. Sharma, “PEGylated starch acetate nanoparticles and its potential use for oral insulin delivery,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 95, no. 1, pp. 1–8, 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.02.021.
- [48] M. R. Saboktakin, R. M. Tabatabaie, A. Maharramov, and M. A. Ramazanov, “Synthesis and in vitro evaluation of carboxymethyl starch-chitosan nanoparticles as drug delivery system to the colon,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 48, no. 3, pp. 381–385, 2011, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.10.005.
- [49] R. F. N. Quadrado and A. R. Fajardo, “Microparticles based on carboxymethyl starch/chitosan polyelectrolyte complex as vehicles for drug delivery systems,” *Arab. J. Chem.*, vol. 13, no. 1, pp. 2183–2194, 2020, doi: 10.1016/j.arabj.2018.04.004.
- [50] M. Rabišková and J. Valášková, “The influence of HLB on the encapsulation of oils by complex coacervation,” *J. Microencapsul.*, vol. 15, no. 6, pp. 747–751, 1998, doi: 10.3109/02652049809008257.
- [51] S. Rodriguez, F. G. Torres, K. N. Gonzales, O. P. Troncoso, M. Fernández-García, and D. López, “Tailoring size and release kinetics of  $\kappa$ /t-hybrid carrageenan microgels via a surfactant-assisted technique,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 70, no. 5, pp. 338–344, 2021, doi: 10.1080/00914037.2020.1716225.
- [52] S. Rodriguez, F. G. Torres, J. Arroyo, K. N. Gonzales, O. Troncoso, and D. López, “Synthesis of highly stable  $\kappa$ -iota-hybrid carrageenan nanogels via a sonication-assisted microemulsion route,” *Manuscr. Submitt. Publ.*, 2019.
- [53] S. Bhattacharjee, “DLS and zeta potential – What they are and what they are not?,” *J. Control. Release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [54] E. Joseph and G. Singhvi, *Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier*. Elsevier Inc., 2019.
- [55] C. K. Simi and T. Emilia Abraham, “Hydrophobic grafted and cross-linked starch nanoparticles for drug delivery,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 30, no. 3, pp. 173–180, 2007, doi: 10.1007/s00449-007-0112-5.
- [56] A. Kumar, A. S. Grewal, V. Singh, R. Narang, D. Pandita, and V. Lather, “Synthesis, Antimicrobial Activity and QSAR Studies of Some New Sparfloxacin Derivatives,” *Pharm. Chem. J.*, vol. 52, no. 5, pp. 444–454, 2018, doi: 10.1007/s11094-018-1837-y.
- [57] Y. N. Martinez, L. Pinuel, G. R. Castro, and J. D. Breccia, “Polyvinyl alcohol-pectin cryogel films for controlled release of enrofloxacin,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 167, no. 5, pp. 1421–1429, 2012, doi: 10.1007/s12010-012-9554-6.
- [58] G. P. Kumar *et al.*, “Polyvinylpyrrolidone oral films of enrofloxacin: Film characterization and drug release,” *Int. J. Pharm.*, vol. 471, no. 1–2, pp. 146–152, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.033.
- [59] L. P. V. Calsavara, G. M. Zanin, and F. F. De Moraes, “Enrofloxacin inclusion complexes with cyclodextrins,” *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, vol. 73, no. 1–4, pp. 219–224, 2012, doi: 10.1007/s10847-011-0045-0.
- [60] S. Rodriguez, F. G. Torres, K. N. Gonzales, O. P. Troncoso, M. Fernández-García, and D. López, “Tailoring size and release kinetics of  $\kappa$ /t-hybrid carrageenan microgels via a surfactant-assisted technique,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 70, no. 5, pp. 338–344, 2021, doi: 10.1080/00914037.2020.1716225.
- [61] M. Banach, Z. Kowalski, Z. Wzorek, and K. Gorazda, “A chemical method of the production of ‘heavy’ sodium tripolyphosphate with the high content of Form I or Form II,” *Polish J. Chem. Technol.*, vol. 11, no. 2, pp. 13–20, 2009, doi: 10.2478/v10026-009-0018-x.
- [62] M. E. Lesser, L. Sagalowicz, M. Michel, and H. J. Watzke, “Self-assembly of polar food lipids,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 123–126, no. SPEC. ISS., pp. 125–136, 2006, doi: 10.1016/j.cis.2006.07.003.
- [63] N. Seedher and P. Agarwal, “Various solvent systems for solubility enhancement of enrofloxacin,” *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 71, no. 1, pp. 82–87, 2009, doi: 10.4103/0250-474X.51958.
- [64] G. S. El-Feky, M. H. El-Rafie, M. A. El-Sheikh, and El-Nag, “Utilization of Crosslinked Starch Nanoparticles as a Carrier for Indomethacin and Acyclovir Drugs,” *Nanomedicine Nanotechnol.*, vol. 06, no. 01, pp. 1–8, 2015, doi: http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.1000254.
- [65] S. Azadi, H. Ashrafi, and A. Azadi, “Mathematical modeling of drug release from swellable polymeric nanoparticles,” *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 7, no. 04, pp. 125–133, 2017, doi: 10.7324/JAPS.2017.70418.
- [66] Y. Qin, Y. Liu, L. Yuan, H. Yong, and J. Liu, “Preparation and characterization of antioxidant, antimicrobial and pH-sensitive films based on chitosan, silver nanoparticles and purple corn extract,” *Food Hydrocoll.*, vol. 96, no. May, pp. 102–111, 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.05.017.
- [67] P. V. F. Lemos, H. R. Marcelino, L. G. Cardoso, C. O. de Souza, and J. I. Druzian, “Starch chemical modifications applied to drug delivery systems: From fundamentals to FDA-approved raw materials,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 184, no. June, pp. 218–234, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.077.
- [68] D. Thomas, N. Mathew, and M. S. Nath, “Starch modified alginate nanoparticles for drug delivery application,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 173, pp. 277–284, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.227.
- [69] J. Siepmann and N. A. Peppas, “Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse,” *Int. J. Pharm.*, vol. 418, no. 1, pp. 6–12, 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.051.
- [70] P. B. Malafaya, F. Stappers, and R. L. Reis, “Starch-based microspheres produced by emulsion crosslinking with a potential media dependent responsive behavior to be used as drug delivery carriers,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 4, pp. 371–377, 2006, doi: 10.1007/s10856-006-8240-z.
- [71] H. Yu *et al.*, “Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting,” *Biodegradation*, vol. 18, no. 6, pp. 793–802, 2007, doi: 10.1007/s10532-007-9108-8.
- [72] K. S. Soni, S. S. Desale, and T. K. Bronich, “Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation,” *J. Control. Release*, vol. 240, pp. 109–126, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.11.009.