



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN BIOQUÍMICA

D.^a Andrea Iglesias Gardón

**Desarrollo de sistemas de liberación a base de
polímeros biocompatibles y su evaluación sobre la
cicatrización de heridas**

Trabajo Fin de Grado
JUNIO 2024

Índice

Índice de Figuras.....	4
Índice de Tablas.....	5
Resumen.....	6
Resumo.....	7
Abstract	8
Introducción.....	9
Trastornos de la piel	9
Tratamientos disponibles para la curación de heridas.....	11
Antioxidantes en la regeneración de heridas.....	12
Carvacrol.....	13
Encapsulación	14
Materiales de cubierta más frecuentes en la encapsulación.....	15
Formas resultantes más comunes obtenidas de la liberación.....	16
Métodos de encapsulación para la obtención de microcápsulas y cápsulas.	17
Objetivos.....	19
Materiales y métodos.....	20
Materiales.....	20
Métodos	20
Preparación de las cápsulas	20
Determinación de la solubilidad del carvacrol en tampón fosfato salino (PBS)	20
Estimación del rendimiento porcentual	21
Determinación de la cantidad de carvacrol encapsulado	21
Eficacia de encapsulación	21
Ensayos de liberación	21
Estabilidad de la formulación en distintos medios de liberación	22
Estudio de hinchamiento	22
Ensayo de viabilidad o proliferación celular WST-1.	22
Resultados y discusión	24
Obtención de cápsulas de Carvacrol.	24
Ensayo de solubilidad.	25
Evaluación del rendimiento del proceso, de la cantidad de CVC encapsulado y de la eficiencia de encapsulación.	27
Rendimiento (R%).....	27
Cantidad de CVC encapsulado y eficiencia de encapsulación (EE %)	28

Ensayos de liberación y estabilidad de las cápsulas en diferentes medios.....	29
Liberación controlada en PBS y estabilidad en diferentes medios	29
Ensayo de liberación en medio simulado de heridas (SWF).....	30
Estudios de hinchamiento en H2O Y SWF.	33
Medidas de proliferación y viabilidad celular	37
Conclusiones	40
Bibliografía	41

Índice de Figuras

Figura 1: Fases de cicatrización de heridas con la duración, descripción general y poblaciones celulares involucradas. Extraída de (Petkovic et al., 2021)	11
Figura 2: Estructura molecular del carvacrol. (consultado en: Carvacrol \geq 98%, FCC, FG 499-75-2 (sigmaaldrich.com) a 24/06/2024).....	13
Figura 3: a) Cadena polimérica de NaAlg con bloques de galurónico y manurónico; b) NaAlg en modelo “egg-box” tras la reticulación. Consulta en: (A) The structure and block distribution of sodium alginate. (B) The... Download Scientific Diagram (researchgate.net)	16
Figura 4: Unidad básica molecular de la carboximetilcelulosa. Consulta en: Carboximetilcelulose Celulose bacteriana Química, celulose, ângulo, branco png PNGEgg a 24/06/2024)	16
Figura 5: Encapsulador BÜCHI B-390. Consultado en: Buchi - Türkiye – B390 Encapsulador (Enkapsülâtör – Enkapsülasyon Cihazı) - Arif Malyer Ltd Sti a 24/06/2024)	18
Figura 6: Formación de la gota en Encapsulador BÜCHI B-390.....	24
Figura 7: A la izquierda cápsula de NaAlg y CMC sin principio activo (blanco) y a la derecha cápsulas de NaAlg y CMC con CVC (formulación).	25
Figura 8: Recta de calibrado de CVC en PBS.....	27
Figura 9: PBS con turbidez por degradación completa de las cápsulas	30
Figura 10: Perfil de liberación de las cápsulas en SWF	32
Figura 11: Perfil de liberación de las cápsulas hasta alcanzar el máximo en SWF.....	32
Figura 12: : Perfil de hinchamiento de las microcápsulas durante las 3 primeras horas en H ₂ O y SWF, donde se representan la media y la desviación estándar de los 4 lotes.	33
Figura 13: Perfil de hinchamiento total de las microcápsulas en H ₂ O y SWF. Los valores representados son la media y la desviación estándar de los 4 lotes.	34
Figura 14: Perfil de hinchamiento total de las cápsulas húmedas menos reticuladas en H ₂ O y SWF, representando media y desviación estándar.	36
Figura 15: Perfil de hinchamiento de las primeras 3 horas de las cápsulas húmedas menos reticuladas en H ₂ O y SWF, representando media y desviación estándar.....	36
Figura 16: a) Aspecto inicial de las cápsulas antes del hinchamiento con H ₂ O b) Aspecto final de las cápsulas tras el hinchamiento con H ₂ O c) a la izquierda cápsulas antes del hinchamiento y a la derecha cápsulas tras el hinchamiento en SWF.	37
Figura 17: Efectos del carvacrol puro a 3 concentraciones distintas (10; 25 y 50 mg/ml) y diluciones de las muestras obtenidas de los ensayos de liberación del carvacrol desde las microcápsulas sobre la actividad metabólica de las células HaCaT después de 24 hora	38

Índice de Tablas

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas del carvacrol.	13
Tabla 2: Contenido total de CVC y PBS en los viables de determinación de solubilidad ...	26
Tabla 3: Valores reportados de solubilidad de carvacrol.	26
Tabla 4: Rendimiento de la producción de los diferentes lotes a estudiar.	27
Tabla 5: Cantidad de CVC encapsulado determinado por espectrofotometría UV-VIS.....	28
Tabla 6: Eficacia de encapsulación por lote.....	28

Resumen

Desarrollo de sistemas de liberación a base de polímeros biocompatibles y su evaluación sobre la cicatrización de heridas

El uso de aceites esenciales y de sus compuestos en aplicaciones biomédicas es cada vez más demandado, pero su manipulación o aplicación directa resulta limitada debido a sus características fisicoquímicas como son: su volatilidad, degradación o pérdida de capacidad antioxidante, al exponerse a las condiciones de la atmósfera.

Para solventar esta limitación, en este trabajo se ha encapsulado el agente activo de interés (carvacrol) en dos polímeros (carboximetilcelulosa sódica y alginato de sodio) empleando para ello una técnica de encapsulación novedosa como es la formación de microcápsulas mediante una boquilla de vibración coaxial a dispersión. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que esta formulación podría ser una buena opción a la hora de usarse como apósito de heridas por sus propiedades mostradas de hinchamiento y liberación que permitirían mantener un ambiente húmedo sin exudados; no obstante, se necesitan estudios adicionales para dilucidar completamente su comportamiento y características para el tratamiento de heridas y su uso habitual como apósito novedoso.

PALABRAS CLAVE: carvacrol, microencapsulación, alginato sódico, carboximetilcelulosa sódica, gelificación iónica.

Resumo

Desenvolvemento de sistemas de liberación a base de polímeros biocompatibles e a súa avaliación sobre a cicatrización de feridas

O uso de aceites esenciais e dos seus compostos en aplicacións biomédicas é cada vez máis demandado, pero a súa manipulación ou aplicación directa resulta limitada debido ás súas características fisicoquímicas como son: a súa volatilidade, degradación ou perda de capacidade antioxidante, ó se expor ás condicións da atmosfera.

Para solventar esta limitación, neste traballo encapsulouse o axente activo de interese (carvacrol) en dous polímeros (carboximetilulosa sódica e alxinato de sodio) empregando para iso unha técnica de encapsulación novedosa como é a formación de microcápsulas mediante unha boquilla de vibración coaxial a dispersión. Os resultados obtidos neste traballo suxiren que esta formulación podería ser unha boa opción á hora de usarse como apósito de feridas polas súas propiedades mostradas de hinchamento e liberación que permitirían manter un ambiente húmido sen exudados; non obstante, necesítanse estudos adicionais para dilucidar completamente o seu comportamento e características para o tratamento de feridas e o seu uso habitual como apósito novidoso.

PALABRAS CLAVE: carvacrol, microencapsulación, alxinato sódico, carboximetilcelulosa sódica, xelificación iónica.

Abstract

Development of biocompatible polymer-based release systems and their assessment on wound healing

The use of essential oils and their compounds in biomedical applications is increasingly in demand, but their handling or direct application is limited due to their physicochemical characteristics such as: their volatility, degradation or loss of antioxidant capacity, when exposed to atmospheric conditions.

To solve this limitation, in this work the active agent of interest (carvacrol) has been encapsulated in two polymers (sodium carboxymethylcellulose and sodium alginate) using a novel encapsulation technique such as the formation of microcapsules by means of a dispersion coaxial vibration nozzle... The results obtained in this work suggest that this formulation could be a good option when used as a wound dressing due to its shown properties of swelling and release that would allow maintaining a moist environment without exudates; However, further studies are needed to fully elucidate its behaviour and characteristics for wound treatment and its routine use as a novel dressing.

KEY WORDS: carvacrol, microencapsulation, sodium alginate, sodium carboxymethylcellulose, ionic gelation.

Introducción

Trastornos de la piel

La primera defensa del cuerpo humano contra daños o estresores físicos es la piel, la cual es el órgano más grande del ser humano y tiene múltiples funciones; una piel sana está compuesta por queratina y 3 capas principales con funciones y estructuras específicas y estas son: la epidermis, la capa más externa que actúa como barrera protectora e impermeable y contiene queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans o células de Merkel entre otras; la dermis, es la capa intermedia y está compuesta por tejido conectivo, fibras de colágeno, elastina, fibroblastos, vías nerviosas, vasos sanguíneos, sistema linfático... y se encarga de dar soporte y flexibilidad y por último el tejido subcutáneo o capa subdérmica que es la capa más interna y se compone principalmente de tejido adiposo, vasos sanguíneos y nervios por lo que actúa regulando la temperatura corporal y propiedades mecánicas y almacenando energía (Freitas et al., 2020; Xu et al., 2020; Reinke & Sorg, 2012).

Al ser la primera barrera protectora la piel sufre diferentes procesos que pueden llevar a su desgaste, entre los cuales podemos destacar:

- El envejecimiento que es un proceso biológico complejo causado o influenciado por factores extrínsecos (como son la exposición a la radiación UV y a la contaminación y afectan sobre todo a la piel) e intrínsecos (afectan a todos los órganos y tejidos por igual); como resultado del envejecimiento se pierde matriz extracelular por medio de degradación enzimática de las moléculas de soporte de esta, pero también hay una pérdida de humedad debido a la degradación del ácido hialurónico, el cual, es un glicosaminoglicano implicado en la reparación, protección e hidratación (Freitas et al., 2020).
- Las heridas son alteraciones en la integridad de la piel a varios niveles (estructural, anatómico y morfológico) producidas por un daño físico, térmico o clínico que crean un desorden metabólico e inestabilidad a su alrededor que a su vez afectara en cierta medida al tratamiento e incluso al normal funcionamiento del cuerpo en función de grado de gravedad. Existen 2 tipos de heridas que son las agudas, causadas por lesiones mecánicas, químicas o quemaduras y tienen una mejor y más rápida cicatrización, y las crónicas causadas por múltiples factores, pero podemos definir las como aquellas que no recuperan su integridad funcional en un periodo de 3 meses o incluso reaparecen (Xu et al., 2020; Laseca Arranz et al., 2021).

Ambos procesos provocan el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que son moléculas que contienen oxígeno y son altamente reactivas al tener electrones no apareados (radical hidroxilo, anión superóxido o peróxido de hidrogeno) y que a su vez producen estrés oxidativo que agrava aún más la situación (Freitas et al., 2020; Xu et al., 2020).

No obstante, el proceso afecta de diferente manera en función de los niveles de ROS. Así, cuando las ROS están en unas cantidades estándar afectan positivamente a los procesos estimulando por ejemplo en el caso de las heridas la angiogénesis y la

migración celular; pero cuando están en exceso afectan negativamente y aumentan el deterioro/envejecimiento u obstaculizan o incluso detienen la regeneración de heridas. Algunos factores que afectan a la cantidad de ROS en el organismo son la respuesta inflamatoria prolongada que impide mantener el equilibrio redox y lograr una anti-oxidación, la hiperglucemia que interrumpe el equilibrio redox y causa trastornos metabólicos que afectan a la integridad de las vías sanguíneas y regeneración tisular. De forma general podemos decir que las ROS destruyen el equilibrio redox celular, dañan tejidos, agravan infecciones, retrasan la curación y pueden cambiar la expresión de los genes (Freitas et al., 2020; Xu et al., 2020).

El proceso de curación de una herida tiene lugar a través de un sistema extraordinario de funciones celulares en cascada o sucesión de fases donde lo primero que tiene lugar es la hemostasia (primaria y secundaria) para poder detener el sangrado y activar la respuesta inmune (atraiendo monocitos, neutrófilos y eosinófilos) a la vez que se forma el tapón plaquetario y activa la cascada de coagulación para formar el trombo de fibrina e impedir así la salida de la sangre (se crea un soporte mecánico o matriz provisional); posteriormente, ocurre el proceso de cicatrización o curación de heridas en sí mismo, que es un proceso fisiológico dinámico, ordenado, complejo y lento que se da gracias a la acción combinada de moléculas biológicas como las citoquinas y de células madre que promueven la reparación a diversos niveles y solucionan la pérdida de integridad de la piel (aunque nunca se recupera por completo la resistencia contráctil de la zona ni se obtiene un rendimiento de recuperación del 100% sobre todo si se sufren patologías como diabetes). A su vez, la cicatrización se ve influenciada por otros factores como la nutrición, la edad, la circulación sanguínea, las patologías previas, la temperatura, la hidratación de la zona, la contaminación bacteriana... Podemos decir que consta de 3 fases (Xu et al., 2020; Laseca Arranz et al., 2021; Reinke & Sorg, 2012).

- Fase inflamatoria, donde ocurre la vasodilatación y aumenta la permeabilidad para que puedan llegar los fibroblastos y células inmunitarias (linfocitos, monocitos y macrófagos) que se encargarán de destruir el tejido dañado, eliminar patógenos y segregar citoquinas que estimulen a los fibroblastos y células epidérmicas (Laseca Arranz et al., 2021).
- Fase proliferativa, las citoquinas estimulan la migración de los fibroblastos al lugar de la herida y se forma la matriz extracelular, se estimula la angiogénesis y se empiezan a epitelizar los bordes de la herida debido a la producción de colágeno, ácido hialurónico y proteoglicanos (se forma la nueva epidermis por la proliferación de queratinocitos). También en esta fase se forma el tejido de granulación compuesto por distintos tipos de colágeno y sustancia fundamental y se reabsorbe el coágulo (Laseca Arranz et al., 2021).
- Fase de remodelación o maduración, es la fase más larga donde se elimina al 100% los patógenos y el tejido dañado para crear un nuevo tejido conectivo que vaya reduciendo la herida progresivamente a la vez que se genera una costra por la producción de colágeno (hay una reorganización del colágeno y se forma el nuevo epitelio); además se necrosan los capilares formados en la anterior fase y se reabsorben los macrófagos (Xu et al., 2020; Laseca Arranz et al., 2021).

Todas las fases, incluida la hemostasia, ocurren prácticamente de manera simultánea y superpuesta por lo que no tienen un periodo de tiempo concreto, pues en función de las

condiciones y actividad celular necesitaran más o menos tiempo para completarse (Xu et al., 2020).

Si este proceso de cicatrización se ve alterado se pueden generar cicatrices atróficas, hipertróficas, normo tróficas o queloides. Por lo tanto, podemos hablar de 2 tipos de cicatrices que son las defectuosas (anomalías anatómicas o acabados poco estéticos) y la patológicas (tumores fibrosos benignos) (Laseca Arranz et al., 2021).

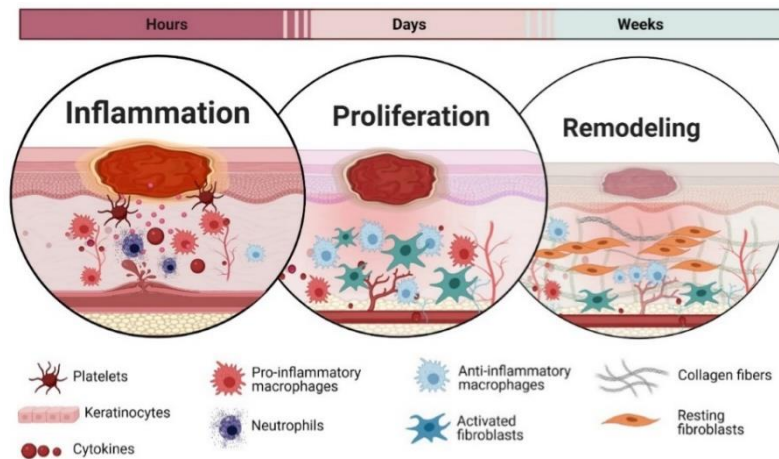


Figura 1: Fases de cicatrización de heridas con la duración, descripción general y poblaciones celulares involucradas. Extraída de (Petkovic et al., 2021)

Tratamientos disponibles para la curación de heridas

El objetivo principal en el tratamiento de heridas es conseguir una cicatrización rápida y eficaz. Esto depende en parte los factores involucrados en la misma y de la formulación o forma farmacéutica usada (Xu et al., 2020; Laseca Arranz et al., 2021).

Para el tratamiento de heridas se usan apósitos, los cuales deben ser biocompatibles, semipermeables al agua y oxígeno, estériles, protectores frente a contaminantes y patógenos, absorbentes (el apósito idóneo será aquel que mejore la migración de leucocitos, prevenga infecciones, elimine exudados, promueva intercambio de gases, aislé térmicamente y prevenga lesiones) (Xu et al., 2020; Laseca Arranz et al., 2021).

Actualmente distinguimos 2 tipos de formulaciones que son los apósitos convencionales, que tratan la herida creando un ambiente seco que previene infecciones pero no absorben grandes cantidades de exudado (gasas) y los apósitos modernos o activos que mantienen el microambiente de la herida húmedo y permiten una frecuencia de cambio variable según la lesión a tratar (Xu et al., 2020; Laseca Arranz et al., 2021).

Debido a que recientes estudios indican que los ambientes cálidos y húmedos conllevan a una mejor cicatrización los apósitos modernos o activos son la mejor opción para el tratamiento de heridas (Laseca Arranz et al., 2021). Entre este tipo de apósitos podemos encontrar diferentes tipos formulaciones entre las que destacan: los hidrocoloides que son compuestos de carboximetilcelulosa sódica que al absorber el exudado forman un gel que mantiene unas condiciones óptimas, las espumas de poliuretano que son capaces de absorben mayor cantidad de exudado que el anterior pero no se recomiendan cuando hay infección, los alginatos que son los más absorbentes y tiene acción hemostática y los hidrogeles son la mejor opción cuando no hay exudado pues son los más hidratantes

al poder retener agua en su interior todos ellos impregnados del principio activo que tendrá unas propiedades deseadas y específicas. A la hora de decidir qué tipo de formulación usar, es importante tener en cuenta la causa y tipo de lesión y la presencia o ausencia de exudado para evitar una cicatrización defectuosa o infecciones (Freitas et al., 2020).

También cabe destacar que hay otro tipo de formulaciones aún más novedosas que son los nanosistemas de liberación de fármacos que permiten un mayor control de la liberación de este a la vez que protegen a este de su degradación y aquí tenemos a los liposomas, las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas inorgánicas, nanopartículas lipídicas, estructuras nano fibrosas y nano hidrogeles (Laseca Arranz et al., 2021).

Ahora bien, todos estos apósitos modernos llevan en su estructura el principio activo o fármaco que tendrá la propiedad terapéutica de interés, como puede ser poder antibiótico, antimicrobiano, antiinflamatorio, desbridante, emoliente, antiséptico o la tratada en este trabajo que es la función antioxidante (Xu et al., 2020; Laseca Arranz et al., 2021).

Antioxidantes en la regeneración de heridas

Como se ha mencionado anteriormente, las formulaciones para el tratamiento de heridas pueden llevar incorporados distintos tipos de principios activos, que presentan diferentes propiedades. En este trabajo nos hemos centrado en la acción antioxidante, ya que los antioxidantes son capaces de lograr la reparación enzimática y mejora metabólica, promueven la proliferación celular y son capaces de eliminar radicales libres. Es decir, combaten en cierta medida los efectos causados por las ROS y el estrés oxidativo, por lo que son especialmente importantes en el retraso del envejecimiento, la cicatrización de heridas y para prevenir enfermedades degenerativas o el cáncer; al proteger a los organismos y a las células del daño que las ROS y el estrés oxidativo producen (Freitas et al., 2020; Xu et al., 2020; Yanishlieva et al., 1999).

Se pueden clasificar en:

- Compuestos tiol (-SH), como el glutatión (GSH) que es un antioxidante endógeno clave en células animales, que se encarga de mantener el sistema inmune, neutralizar radicales libres y regenerar otros antioxidantes (Xu et al., 2020).
- Compuesto no tiol, como los polifenoles (que son de origen vegetal y tienen un gran poder antioxidante al consumir oxígeno y capturar radicales libres y son flavonoides, resveratrol y ácidos fenólicos), antocianinas, ácido ascórbico, el tocoferol, vitamina A y algunas enzimas como la catalasa que neutraliza el peróxido de hidrógeno, la superóxido dismutasa (SOD) que es una metaloproteína que elimina O_2^- y es fundamental en el equilibrio redox, la GSH-reductasa o la GSH-peroxidasa (Xu et al., 2020).

Para utilizar un antioxidante como principio activo debemos conocer su seguridad biológica y estabilidad antioxidante, además de utilizar los más fáciles de sintetizar, obtener, modificar y gelatinizar. Por ello el uso de aceites esenciales como principio activo es un campo en auge en estos momentos, ya que estos contienen fenoles que son

mejores principios activos que, por ejemplo, las enzimas, pues estas necesitan de unas condiciones específicas para llevar a cabo su actividad lo cual es un factor limitante (Xu et al., 2020).

La demanda y el uso de recursos naturales en el ámbito de la biomedicina, alimentación, cosmética, farmacia, agricultura... es cada vez mayor y debido a que estos pueden poseer un gran efecto antioxidante el uso de aceites esenciales (AE) es cada vez más frecuente ya que estos se extraen de diferentes partes de la planta como son las hojas, tallo, raíz, flores, fruto, pericarpio, semillas... a pesar de que su rendimiento de extracción es bajo son fáciles de extraer por lo que son muy usados en diversos sectores (Cruz et al., 2016; De Medicina, 2012; Muchiutti et al., 2019).

Los AE son una mezcla de sustancias orgánicas olorosas, incoloras o de aspecto amarillento y líquidos a temperatura ambiente, con efecto terapéutico, sedativo, histamínico, analgésico y propiedades antibacterianas, antimicóticas, insecticidas y antioxidantes, por lo que se usan como agentes activos; tienen una baja densidad con respecto al agua y un elevado índice de refracción y su composición es muy variada dependiendo del tipo de AE que tengamos pero de manera general van a estar compuestos por terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), terpenoides, fenoles, ésteres, aldehídos, cetonas, alcoholes y óxidos; la mayoría de sus compuestos son volátiles, inestables y susceptibles a la degradación en contacto con las condiciones de la atmósfera, pero también solubles en alcoholes, éter y cloroforma y poco solubles o insolubles en agua. De forma general los podemos clasificar en naturales y sintéticos según su origen y en bálsamos o resinas según su consistencia (Cruz et al., 2016; De Medicina, 2012; Chew & Nyam, 2016).

Carvacrol

El carvacrol (CVC) o 5-isopropil-2-metilfenol es un fenol monoterpénoide presente en diferentes AE sobre todo de los géneros *Thymus* (aceite de tomillo), *Satureja* (ajedrea) y *Origanum* (aceite de orégano y mejorana) que pertenecen a la familia de *Lamiaceae* (Yanishlieva et al., 1999; Gandova et al., 2023; Isabel Zamora González et al., n.d.; Sharifi-Rad et al., 2018).

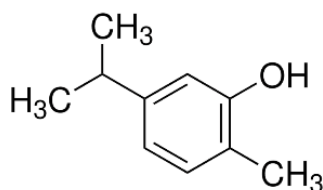


Figura 2: Estructura molecular del carvacrol. (consultado en: Carvacrol $\geq 98\%$, FCC, FG | 499-75-2 (sigmaaldrich.com) a 24/06/2024)

El CVC posee las siguientes características fisicoquímicas:

Formula molecular	C ₁₀ H ₁₄ O	Punto de ebullición	237-238°C
Peso molecular	150,22	Índice de refracción	1,529-1,560
Densidad relativa	0,974-0,979	Solubilidad en agua	Ligera
Punto de fusión	1°C	Solubilidad en alcoholes	Completa

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas del carvacrol.

Cabe añadir también, que es un líquido espeso de color amarillo pálido y olor muy fuerte y característico, considerado un compuesto biológicamente activo con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiparasitarias, anticancerígenas, antifúngicas y que puede actuar como insecticida. Además, debe almacenarse en condiciones muy controladas pues es volátil y fácilmente degradable en contacto con las condiciones de la atmósfera como la luz, la humedad o los cambios de temperatura (Marinelli et al., 2019; Gandova et al., 2023; Muchiutti et al., 2019)

Este compuesto es uno de los más estudiados de los AE (junto con su isómero timol, pues de forma natural estos dos se encuentran normalmente juntos y tienen una elevada actividad antioxidante) y se ha utilizado ya como aditivo alimentario seguro, aromatizante, antimicrobiano y antioxidante y se estudia su uso como anti mutagénico, anti genotóxico, hepatoprotector y antiinflamatorio (Yanishlieva et al., 1999; Isabel Zamora González et al., n.d.; Keawchaoon & Yoksan, 2011; Sharifi-Rad et al., 2018).

En la actualidad se usan ya composiciones farmacéuticas cargadas de carvacrol tanto en humanos como en animales para el tratamiento de histomiasis e inflamaciones, ya que es capaz de desintegrar la membrana externa de bacterias y provocar la salida de lipopolisacáridos aumentando la permeabilidad e induciendo la salida de ATP (Keawchaoon & Yoksan, 2011).

Debido a sus características fisicoquímicas y problemas de estabilidad, su incorporación a casi cualquier forma farmacéutica sigue siendo un problema hoy en día, por lo que lograr su adecuada formulación para proteger su vida útil y propiedades sigue siendo objeto de estudio (Keawchaoon & Yoksan, 2011).

Encapsulación

La encapsulación es una técnica de empaquetado donde un material o varios que se encuentran en estado líquido, gas o incluso en forma de pequeñas partículas sólidas son atrapados por una matriz heterogénea formando así una estructura con una parte interna a la que denominamos núcleo, carga o fase interna y otra parte más externa o pared a la que denominaremos membrana, cubierta o portador y la cual debe ser semipermeable, delgada y fuerte (Cruz et al., 2016; Ferrandiz et al., 2017).

La técnica de encapsulación es ampliamente usada en diversos sectores industriales como el farmacéutico, el textil o el alimentario (Chew & Nyam, 2016); por lo que existen numerosos ejemplos exitosos de encapsulación que van desde la encapsulación de enzimas o agentes microbianos para proteger su actividad funcional y mejorar su estabilidad y eficacia hasta la encapsulación de fragancias o alimentos para enmascarar o proteger aromas (Lobato Guarnido, 2024).

En nuestro caso nos interesa la aplicación de esta técnica y su uso en la encapsulación eficaz de aceites esenciales, lo cual es un campo emergente y una creciente demanda tanto por parte de los consumidores como por parte de las empresas (Yamine et al., 2024).

La encapsulación de AE permite una mayor biodisponibilidad y una mejor liberación controlada que permite reducir el coste y cantidad de compuesto necesario debido a la degradación gradual de la cubierta (Yamine et al., 2024); pero además permite

mejorar la estabilidad, prolongar la vida útil y evitar la degradación, deterioro u oxidación ya sea química, física o térmica de los aceites y por lo tanto mantener las actividades funcionales tan relevantes de estos como son la capacidad antioxidante, antiinflamatoria o antimicrobiana con lo que finalmente se consigue un mejor rendimiento en el proceso y posterior uso (Ferrandiz et al., 2017).

Podemos decir por lo tanto que la encapsulación es una forma de afrontar las desventajas y limitaciones que poseen los aceites esenciales.

Materiales de cubierta más frecuentes en la encapsulación.

El uso de un determinado material para la encapsulación depende de múltiples factores entre los que se encuentra su aplicación posterior a la encapsulación pues dependiendo de estas se necesitaran unas u otra propiedades necesarias en los materiales.

De forma general podemos decir que las mejores opciones a la hora de llevar a cabo la encapsulación serán aquellos materiales que permitan una buena encapsulación, sean biocompatibles, biodegradables y que presente nula o baja toxicidad (Yamine et al., 2024); por lo que teniendo en cuenta esto los más destacables son los polímeros tanto sintéticos como naturales que nos permiten inmovilizar el núcleo y crear un lugar de almacenamiento del aceite segura y efectivo (Lobato Guarnido, 2024); entre los más comunes tenemos:

- Goma arábiga: heteropolisacárido extraído de la resina de árboles de acacia y formado por proteínas como la D-galactosa o L-arabinosa. Tiene un carácter anfifílico y es capaz de proteger contra la oxidación al a la vez que actúa como estabilizante o espesante, por lo que en cierta forma actúa de barrera protectora (Cruz et al., 2016).
- Almidón: es un polisacárido de reserva complejo, formado por la unión repetida de moléculas de glucosa que pueden ser amilosa (polímero lineal que constituye el 20%) o amilopectina (polímero ramificado que representa el 80%). Entre sus propiedades destacadas tenemos su bajo coste, biodegradabilidad y propiedades hidrocoloides (Cruz et al., 2016).
- Alginato de sodio (NaAlg): son polisacáridos lineales no ramificados de origen natural que se obtienen de algas pardas marinas procedentes de diversas familias como la *Laminariaceae* o *Lessoniaceae* todas ellas pertenecientes a la clase *Phaeophyceae*. Este polisacárido está formado por cantidades variables y repetidas de ácido α -L-gulurónico y ácido β -D-manurónico que se unen mediante enlaces glucosídicos (1-4) por lo que puede formar homo y hetero polímeros. Entre sus propiedades podemos decir que tiene muy buena gelificación, viscosidad y solubilidad en agua pero es insoluble con cationes divalentes y solventes miscibles con agua como alcoholes y cetonas (Cruz et al., 2016). Pese a ser uno de los polímeros más usado presenta algunas limitaciones debido a su porosidad o inestabilidad en algunos medio de liberación (Chew & Nyam, 2016). Además este polisacárido tiene una característica que lo hace realmente interesante a la hora de gelificarlo; ya que en presencia de cationes divalente forma un red tridimensional por interacción de estos con el ácido gulurónico a la que se le conoce como modelo “egg-box”.

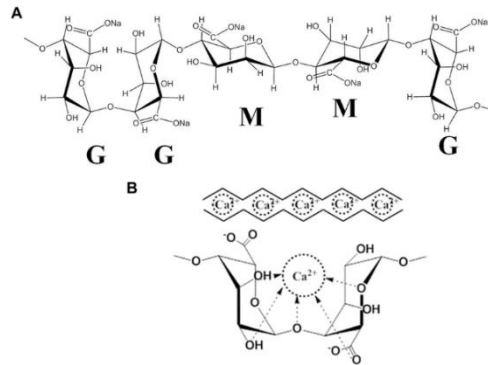


Figura 3: a) Cadena polimérica de NaAlg con bloques de gulurónico y manurónico; b) NaAlg en modelo “egg-box” tras la reticulación. Consultado en: (A) *The structure and block distribution of sodium alginate*. (B) *The... | Download Scientific Diagram*

- Carboximetilcelulosa (CMC): es un derivado del éter de celulosa que se obtiene mediante la adición de grupos carboximetilos. Posee diversas propiedades entre las cuales destacan su gran poder higroscópico y viscosidad, su baja toxicidad y coste, su biodegradabilidad y además de su inocuidad y su comportamiento coloide protector (Cruz et al., 2016).

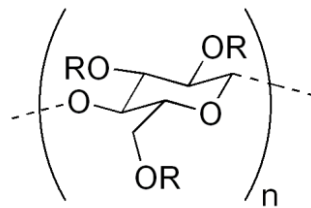


Figura 4: Unidad básica molecular de la carboximetilcelulosa. Consulta en: *Carboximetilcelulose Celulose bacteriana Química, celulose, ângulo, branco png | PNGEgg a 24/06/2024*

Formas resultantes más comunes obtenidas de la liberación.

A la hora de llevar a cabo cualquier método de encapsulación es importante tener en cuenta que formulación se quiere obtener de este pues actualmente existen diversas formas disponibles y no todas puede fabricarse a partir del mismo método.

Las formas más clásicas o vistas son:

- Las cápsulas, que son sistemas vesiculares huecos que permiten capturar el aceite y protegerlo gracias a la cubierta; estas se pueden obtener a partir de polisacáridos o incluso de proteínas y permiten una liberación controlada de los compuestos (Yammine et al., 2024).
- Los hidrogeles, que se forman por interacción de materiales con cargas opuestas lo que resulta en una estructura 3D que retiene una gran cantidad de agua y alta capacidad de carga y estabilidad (Yammine et al., 2024).
- Las emulsiones, es el resultado de la dispersión de dos fases inmiscibles y se obtienen formulaciones muy estables (Yammine et al., 2024).
- Los liposomas, son vesículas esféricas compuestas de una o varias bicapas de fosfolípidos por lo que son capaces de encapsular compuestos hidrofílicos e

hidrofóbicos, pero son menos usadas que el resto por su elevado coste de producción (Yammine et al., 2024).

- Las nanopartículas lipídicas sólidas, son portadores nano coloidales esféricos con gotas lipídicas cristalizadas que pueden incorporar compuestos hidrofílicos o hidrofóbicos, se preparan a partir de emulsiones con temperaturas más elevadas a los puntos de fusión (Yammine et al., 2024).

Métodos de encapsulación para la obtención de microcápsulas y cápsulas.

Teniendo en cuenta todos los factores anteriormente descritos debemos saber que existen diversos métodos de encapsulación que se pueden clasificar según si son procesos físicos como el secado por pulverización o la extrusión; procesos químicos como la inclusión molecular o procesos fisicoquímicos como la gelificación iónica (Cruz et al., 2016).

Ahora bien, para la obtención de cápsulas o microcápsulas los métodos más recomendados:

- Nano precipitación, también se le conoce como método de desplazamiento del solvente pues consiste en adicionar una fase orgánica que incluye al compuesto bioactivo a una fase acuosa que contiene el solvente orgánico y el material de la cubierta, por lo que cuando la fase orgánica cae el material de la cubierta precipita y el solvente se elimina por evaporación; este método se ha usado en la encapsulación de varios aceites como el de tomillo, orégano o lavanda (Yammine et al., 2024).
- Secado por aspersion o pulverización, es de los métodos más usados que consiste en la conversión de un líquido, en el que están disueltos los materiales de la pared y del núcleo, a polvo o partículas aglomeradas debido a altas temperaturas por lo que es vital importancia controlar las condiciones de secado para evitar la oxidación de los aceites (Mohammed et al., 2020).
- Gelificación iónica, consiste en el goteo del material a una solución iónica que está en constante agitación para la obtención de geles esféricos pues es un método que se basa en la interacción de iones con cargas opuestas para formar enlaces cruzados inter e intramoleculares que dé como resultado una reticulación que aporte resistencia mecánica, estabilidad y liberación controlada (Yammine et al., 2024). Este mecanismo en si puede ser externo si el alginato se introduce en la solución salina y ocurre una difusión que da lugar al gel o interno si se introduce la solución salina en una solución de alginato (Cruz et al., 2016). Además es un proceso simple, económico y reproducible que no requiere de un equipo especializado para su utilización, pero posee una desventaja al poder producir una gelificación heterogénea por mecanismos de difusión asociado (Kurozawa & Hubinger, 2017).
- Coacervación o separación de fases pues se producen partículas por la separación de dos fases líquidas inmiscibles en una solución coloidal. Este proceso a su vez puede ser simple o complejo en función de la cantidad de polímeros que se vayan a utilizar (Yammine et al., 2024).

- Extrusión, esta técnica tiene su principio básico en hacer pasar la solución que contiene todos los materiales de la formulación por una boquilla para crear gotas que caen a un baño gelificante y formar partículas que encapsulan tanto compuestos hidrofílicos como hidrofóbicos sensibles al calor. Este método a su vez tiene varios subtipos que son la extrusión termofusible, la co-extrusión o la extrusión electrostática entre otras (Yammine et al., 2024); nos centramos en el electrostático usando un encapsulador con boquillas concéntricas vibratorias que crean un chorro líquido laminar que se fragmenta en gotas (Chew & Nyam, 2016).

Es importante mencionar que la gran mayoría de métodos usados para encapsulación se pueden combinar entre sí para lograr un mejor resultado (Yammine et al., 2024).

En nuestro caso particular hemos usado dos métodos de encapsulación que son la extrusión electrostática y la gelificación iónica para lograr conseguir cápsulas de CVC a partir de una combinación de NaAlg con CMC usando un encapsulador BUCHI B-390 idéntico al que se muestra en la figura inferior y una solución de CaCl_2 en constante agitación.



Figura 5: Encapsulador BÜCHI B-390. Consultado en: Buchi - Türkiye – B390 Encapsulator (Enkapsülator – Enkapsülasyon Cihazı) - Arif Malyer Ltd Sti a 24/06/2024)

Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado se ha centrado en:

- El desarrollo, caracterización y evaluación de cápsulas de alginato de sodio y carboximetilcelulosa sódica como sistema de liberación de carvacrol para su posible uso en el tratamiento y regeneración de heridas.

Materiales y métodos

Materiales

Tanto el alginato de sodio (NaAlg) (W201502, Sigma-Aldrich, EE. UU.), la carboximetilcelulosa sódica 1550-4500 (CMC) (Mg94225, Guinama, España), el cloruro de calcio anhidro (CaCl_2) (141221, Panreac Química SLU, España), el carvacrol (CVC) (GP9460, Glentham Life Sciences, Reino Unido) y el aceite de girasol de grado alimentario fueron adquiridos y usados en la preparación de las cápsulas; los restantes reactivos fueron empleados en grado analítico.

Métodos

Preparación de las cápsulas

Las cápsulas de alginato de sodio (NaAlg) y carboximetilcelulosa (CMC) fueron preparadas mediante tecnología de co-extrusión usando un encapsulador BUCHI B-390 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza).

En primer lugar, se prepararon por separado las dispersiones de NaAlg y CMC, ambas al 1%, en agua destilada hasta su homogenización en un agitador genérico y se almacenaron a 4°C durante 24 horas para su hidratación; y a partir de estas se prepararon 100 ml de la mezcla de polímeros de la cubierta en proporción 3:1; también se preparó la disolución de carvacrol (CVC) al 40% junto con aceite de girasol que actuó como disolvente.

Una vez preparadas las dispersiones de los dos polímeros, se procedió a fijar los parámetros de encapsulación del equipo, haciendo pasar ambas disoluciones por un sistema de boquillas concéntricas con un diámetro interno de 450 μm y uno externo de 900 μm , una frecuencia fija de 400 Hz, una tensión de electrodo de 400 a 1500 V y una presión del aire de 500 mbar creando unas gotas de NaAlg, CMC y CVC que se dejan caer continuamente a una solución de cloruro de calcio al 2,3 % que actúa como agente gelificante y que está en continua agitación con un agitador genérico a 100 rpm y se encuentra a 24 cm de la boquilla de salida de las gotas con las dispersiones; las cápsulas formadas se dejan en la solución gelificante durante al menos 30 minutos para permitir su endurecimiento.

En este proceso se fue variando el caudal de la dispersión de polímero que da lugar al núcleo, donde va incorporado el aceite esencial y por otro lado, se estableció el caudal de la dispersión que da lugar a la cubierta polimérica hasta obtener finalmente, la formulación más adecuada, en cuanto a forma esférica, rigidez y capacidad de encapsulación. Una vez quedaron establecidos los parámetros de encapsulación, se procedió a la fabricación de lotes idénticos para su posterior caracterización.

Determinación de la solubilidad del carvacrol en tampón fosfato salino (PBS)

Debido a que en estudios anteriores se demostró la solubilidad del CVC en PBS (Isabel Zamora González et al., n.d.), se decidió determinar dicha solubilidad tomando 4 viales con 25 ml del PBS previamente preparado con NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4

10 mM y KH_2PO_4 1,8 mM y ajustado a un pH de 7,4 con HCl 1N, e ir añadiendo diferentes cantidades del fenol a dichos viales junto con agitación constante y sin exposición a condiciones de oxidación hasta llegar al punto de saturación de la disolución para poder determinar así una solubilidad relativa.

Estimación del rendimiento porcentual

El porcentaje de rendimiento del proceso de fabricación de las microcápsulas se calculó considerando el peso teórico del CVC, aceite de girasol y formulación de NaAlg-CMC usados durante la preparación de estas con la siguiente ecuación:

$$R (\%) = \frac{m_c}{m_f} \times 100$$

Donde m_c es el peso de cápsulas fabricada y m_f el peso teórico de los polímeros y el principio activo junto con el aceite usados.

Determinación de la cantidad de carvacrol encapsulado

El contenido total de CVC encapsulado se determinó pesando una cantidad fija de microcápsulas (3 microcápsulas) de los 4 lotes fabricados en el mismo ensayo que se disolvieron en 100 ml de PBS (pH 7,4) en agitación constante hasta su homogenización con un agitador genérico; una vez la solución estuvo homogenizada se determinó la concentración de CVC espectrofotométricamente, a la longitud de onda de absorción máxima del CVC en PBS (272 nm) usando un espectrofotómetro Evolution 60s UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU). Las muestras de los 4 lotes se tomaron por triplicado para tener un rango fiabilidad.

Eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación (E.E %) se determinó considerando la cantidad total de CVC determinado espectrofotométricamente en proporción a la cantidad teórica total usada en el proceso de encapsulación, mediante la siguiente formula:

$$E. E (\%) = \frac{CVC_e}{CVC_t} \times 100$$

Donde CVC_e es la cantidad total extraída de las cápsulas y CVC_t la cantidad total usada en el proceso de encapsulado.

Ensayos de liberación

Se quiso obtener el perfil de liberación del principio activo (CVC) en la formulación de las cápsulas en diferentes medios y condiciones de pH.

Ensayo de liberación en PBS

Se realizó un ensayo de liberación en PBS (pH 7,4) de los 4 lotes por triplicado tomando una cantidad fija de cápsulas (6 cápsulas) que se suspendieron en 10 ml de PBS en viales de vidrio, incubándolos a 37°C, en oscuridad y agitación suave hasta llegar a su máximo de liberación en un agitador-incubador Heidolph UNIMAX 1010 (Alemania).

Ensayo de liberación en fluido simulado de heridas.

Se realizó el mismo procedimiento que para la liberación en PBS, pero esta vez con el fluido de heridas simulado (pH 7,5), o SWF por sus siglas en inglés (simulated wound fluid), el cual se prepara a partir de tampón Tris 0,08 M, CaCl₂ 0,02 M, NaCl₂ 0,4 M y BSA (albumina de suero bovina) al 2%, el objetivo de esta liberación fue similar el ambiente o exudados de una herida para ver el comportamiento de las cápsulas. El experimento se realizó por triplicado para cada lote y se dejó en condiciones de oscuridad y agitación en un agitador-incubador Heidolph UNIMAX 1010 (Alemania) a 37°C-38°C, tomando a intervalos prefijados de tiempo muestras de 1 ml y reponiendo el mismo volumen del medio de liberación, en este caso SWF (pH 7,5). Por último, la cantidad de CVC en las muestras fue cuantificada espectrofotométricamente a la longitud de onda de absorción máxima del CVC en PBS (272 nm) de acuerdo con la siguiente recta de calibrado:

$$y = 0,0133x + 0,0225 ; r^2 = 0,9994$$

Estabilidad de la formulación en distintos medios de liberación

Simultáneamente a los estudios de liberación se quiso observar la estabilidad de las cápsulas en diferentes medios de liberación usando las mismas condiciones que para los ensayos de liberación, por lo que se usaron viales de vidrio con 10 ml de PBS, SWF, CaCl₂ y agua destilada a los que se les incorporaron la misma cantidad de cápsulas (6 cápsulas por vial), esta determinación se hizo por triplicado para cada uno de los 4 lotes y los resultados se observaron de manera visual.

Estudio de hinchamiento

El fenómeno se evaluó en dos tipos de medio con valores variables de pH que fueron agua destilada (pH 7) y SWF (pH 7,5), pero en todos ellos se determinó el grado de hinchamiento introduciendo una cantidad fija de cápsulas (18 cápsula, que pesaron aproximadamente 400/500 mg) en 10 ml del medio. Las cápsulas se mantuvieron a la temperatura ambiente del laboratorio y se pesaron a intervalos de tiempo fijos, secándolas con papel de filtro cuidadosamente para tener el mínimo grado de humedad posible. El grado de hinchamiento (S_w) se calculó con la siguiente ecuación:

$$S_w(\%) = \left[\frac{(W_t - W_0)}{W_0} \right] \times 100$$

En donde W_t es el peso de las capsulas hinchadas en función del tiempo transcurrido y W_0 es el peso inicial de las cápsulas.

Ensayo de viabilidad o proliferación celular WST-1.

Por último, se realizó un ensayo de viabilidad en células de queratinocitos humanos inmortalizados, HaCaT, mediante un método basado en la metabolización de la sal de tetrazolio WST-1 (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) a una sal de formazán hidrosoluble que se usa para la cuantificación espectrofotométrica no radiactiva de la proliferación, crecimiento, citotoxicidad, viabilidad y quimio sensibilidad celular en poblaciones celulares en respuesta a citoquinas, nutrientes o factores de crecimiento.

Debido a que esta metabolización solo tiene lugar cuando las células son metabólicamente activas, es decir, viables, la cantidad de sal de formazán que se produce es directamente proporcional a la cantidad de células funcionales y activas. Este tipo de ensayos de viabilidad celular basados en la metabolización de sales de tetrazolio han sido muy utilizados desde el desarrollo del ensayo tradicional MTT, pues a partir de este se desarrollaron derivados como el método WST-1 que vamos a usar y que presenta ventajas pues no se necesita hacer una solubilización para determinar la absorbancia tras el periodo de incubación.

La cuantificación de la sal de formazán se realizó espectrofotométricamente a una longitud de onda entre 420 y 480 nm y el ensayo se llevó a cabo con un kit comercial optimizado para su uso en microplaca (Roche Applied Bioscience, Madrid, España) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante y en unas condiciones previamente optimizadas para nuestra línea celular. Los queratinocitos humanos inmortalizados, HaCaT, se sembraron en placas estériles de 96 pocillos a una concentración de 5.000 células/pocillo y mantuvieron durante 18 horas hasta su total adherencia. Posteriormente, las células se trataron después con diferentes concentraciones del CVC libre (10; 25 y 50 mg/ml) y con muestras de liberación de CVC a partir de las microcápsulas tomadas a distintos tiempos durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Tras el periodo de incubación, se añadió el reactivo WST-1, el cual es transparente que viene diluido en una solución salina tamponada con fosfato, y se incubó de nuevo la placa 4 horas a 37°C y 5% de CO₂ para posteriormente determinar su absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placas (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, EE. UU.). Para cuantificar el número de células viables se realizó una dilución seriada de una suspensión celular que se sembró en las mismas condiciones y tras finalizar el ensayo se determinó la relación entre la absorbancia obtenida a 450 nm y el número de células activas. Como control negativo se mantuvieron las células sin la presencia del CVC y de control positivo se usó un medio de cultivo sin células como blanco y células tratadas con TritonTM X-100 al 1% como control de mortalidad. Todos los ensayos se realizaron con un medio de cultivo completo sin rojo fenol para de esta forma minimizar lo máximo posible la interferencia analítica; además para cada uno de los procesos o tratamientos los ensayos se realizaron por triplicado. Finalmente, se expresaron los resultados en términos de porcentaje de viabilidad celular en relación con el control positivo de las células sin CVC.

Resultados y discusión

Obtención de cápsulas de Carvacrol.

Para la obtención de una “formulación” definitiva de cápsulas de NaAlg-CMC se realizaron multitud de pruebas hasta lograr alcanzar una encapsulación adecuada de CVC, pues en las primeras pruebas se observó que en la solución de CaCl_2 al final de la fabricación del lote presentaba una gran cantidad de mezcla oleosa que debería estar encapsulada en el núcleo en forma de gotas por toda la superficie (CVC y aceite de girasol). Esta observación fue el indicativo de un proceso y encapsulación deficientes o incluso nulo. Como solución a este problema se optó por dejar todos los parámetros fijos e ir variando manualmente y en medida de lo posible el caudal de flujo tanto de las dispersiones del núcleo como de la dispersión de la cubierta hasta obtener una mejor encapsulación, lo cual se determinó observando que las cápsulas resultantes tuvieran una forma esférica idónea visualmente y analizando el aspecto de la solución gelificante al final de la producción de los lotes.



Figura 6: Formación de la gota en Encapsulador BÜCHI B-390

Finalmente, se fijaron los parámetros que dieron un mejor resultado de encapsulación, obteniendo así unas cápsulas de NaAlg-CMC perfectamente esféricas, lisas y de diámetro prácticamente igual que salían de la boquilla del encapsulador con la forma mostrada en la figura 6.

Durante este proceso de encapsulación por goteo se observó que la mezcla de los polímeros con el principio activo para la formación de las cápsulas no lograba reproducirse de manera heterogénea. Pues a pesar de que se consiguió que todo el material se encapsulara cuando las gotas con las dispersiones del núcleo y la cubierta caían a la solución de CaCl_2 , no todas lo hacían uniformemente debido a que la orientación del núcleo en estas cápsulas no era siempre la misma. Esta disposición irregular del núcleo en las cápsulas afectaba a la calidad de estas dando como resultados cubiertas delgadas y una reticulación débil que impedía la encapsulación de los compuestos de forma inmediata. Por lo tanto, mientras que la reticulación y endurecimiento de la cubierta no finalizaban se podía observar una ligera pérdida del principio activo a encapsular en la solución de reticulación que se manifestaba como gotas oleosas.

Se intentó solucionar dicho problema, pero a pesar de los numerosos intentos realizados no se logró solventar completamente debido a las propias limitaciones del encapsulador. Observando que en los procesos realizados todo el material de la cubierta se lograba encapsular y que la pérdida parecía ser causada como resultado de un goteo irregular de las dispersiones, se tomó la decisión de preparar los lotes para el estudio utilizando los parámetros que mejor resultado manifestaron en la formación de las cápsulas y separar de forma manual las cápsulas perfectamente encapsuladas (núcleo concéntrico) de las que mostraban una encapsulación con el núcleo desplazado hacia la pared. Esto se logró realizar debido que estas últimas cápsulas eran capaces de flotar en la solución de CaCl_2 a diferencia de las perfectamente formadas. Este mismo proceso se llevó a cabo para obtener unas cápsulas con la misma composición de la cubierta pero sin CVC, que se usarán como control o blanco en procesos posteriores.

Estos resultados obtenidos se corresponden relativamente bien con algunos encontrados en la bibliografía estudiada pues la estabilidad del proceso de encapsulación y por lo tanto de las cápsulas en sí mismas, depende principalmente de la composición y estructura de los materiales usados en el proceso (Atencio et al., 2020).

Debido a las propiedades mecánicas que presentan por separado el NaAlg y la CMC se esperaba que la combinación de ambos resultase en una encapsulación apropiada. Por otro lado, la pérdida de aceite encontrada en la solución de endurecimiento aparece también en otros estudios donde tras completar esa fase de reticulación se observa también una fina capa de aceite en el medio de reticulación con CaCl_2 . Esto se podría explicar por la heterogeneidad en la salida de la gota que da lugar a una estructura final con microcápsulas que no presentaban el núcleo totalmente cubierto o que si lo tienen totalmente protegido pero la capa protectora es demasiado fina y permite la liberación del aceite en los primeros momentos tras su formación (Atencio et al., 2020).

El resultado final son unas microcápsulas como las que aparecen en la imagen inferior con un tamaño de unos 3 mm aproximadamente. Cabe señalar que el tamaño de las microcápsulas con y sin aceite encapsulado no varió, siendo similar en todas las preparaciones.



Figura 7: A la izquierda cápsula de NaAlg y CMC sin principio activo (blanco) y a la derecha cápsulas de NaAlg y CMC con CVC (formulación).

Ensayo de solubilidad.

Estos ensayos se llevaron a cabo con la finalidad de obtener la solubilidad máxima del carvacrol en las condiciones de trabajo (pH 7,4). Los aceites esenciales de origen natural (botánico) proceden de distintas fuentes y son obtenidos mediante distintos métodos de obtención, por lo que los datos de solubilidad del carvacrol no tienen por qué ser exactamente los mismos los que se recogen la literatura.

Los datos expuestos en la Tabla 1 nos muestran que el nivel de saturación se alcanzó con la incorporación de 0,025-0,024 ml de CVC al tampón por lo que en relación con estos datos podemos decir que la solubilidad de CVC en PBS es de aproximadamente 0,099 % (v/v).

Muestra	Cantidad de PBS (ml)	Cantidad de CVC (ml)	Concentración final (v/v)
S1	25	0,250	SATURADO
S2	25	0,025	0,001
S3	25	0,024	0,00096
S4	25	0,025	0,001

Tabla 2: Contenido total de CVC y PBS en los viables de determinación de solubilidad

Expresando esto de diferente manera determinar que la solubilidad media del CVC en PBS (pH 7,4) de nuestro ensayo fue de 0,964 mg/ml; este dato es interesante a la hora de realizar ensayos previos pues nos facilita realizar las mediciones de absorbancia, entre otras, sin la necesidad de utilizar solventes tóxicos o irritantes como el acetonitrilo, donde si alcanza valores mayores de solubilidad.

Gracias a esta determinación se procedió a realizar disoluciones de CVC en PBS en diferentes concentraciones (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 65 µg/ml) y medir la absorbancia de estas para de esta forma obtener una recta de calibrado CVC-PBS.

Esta solubilidad depende de diversos factores como son: el método usado, la temperatura, la volatilización de los compuestos o incluso la presión atmosférica; por ello existe mucha controversias entre estudios que afirman la insolubilidad de este terpeno en agua (Rajendran et al., n.d.) y otros que afirman una pequeña solubilidad (0,11 mg/ml) del mismo (Marinelli et al., 2019).

<i>Solvente</i>	<i>Solubilidad</i>
<i>Etanol</i>	<i>Muy soluble</i>
<i>Éteres</i>	<i>Soluble</i>
<i>Agua</i>	<i>Baja solubilidad</i>
<i>Soluciones acuosas (PBS, tampón fosfato...)</i>	<i>Baja solubilidad que aumenta con la adicción de aditivos</i>

Tabla 3: Valores reportados de solubilidad de carvacrol.

Teniendo en cuenta la variedad de datos de solubilidad en la bibliografía y los factores que influyen en esta (temperatura y volatilización del compuesto), usamos un estudio de referencia (Martins et al., 2017), para concluir que existe una discrepancia significativa en cuanto a los valores de solubilidad.

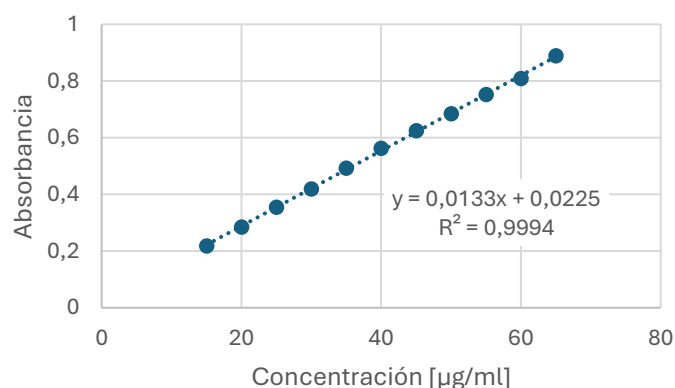


Figura 8: Recta de calibrado de CVC en PBS

Evaluación del rendimiento del proceso, de la cantidad de CVC encapsulado y de la eficiencia de encapsulación.

Los lotes ya obtenidos con los parámetros fijos, adecuados y ajustados se evaluaron de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, con los consiguientes resultados:

Rendimiento (R%)

Esto es una característica importante de cara al futuro, pues en caso de llevarse a una producción industrial a gran escala es fundamental que el rendimiento del proceso sea lo máximo posible para que sea lo más rentable posible (no se desperdicie producto). Un elevado rendimiento es indicativo de una gran producción de cápsulas, mientras que uno constante es indicativo de un proceso estable, controlado y por lo tanto reproducible.

La Tabla 2 muestra los distintos valores de rendimiento de encapsulación obtenidos en los 4 lotes que se analizaron en el estudio. Se pudo determinar un rango de rendimiento desde 56,27 a 63,72 % por lo que estimamos que el rendimiento medio del proceso fue de 59,72 % \pm 3,12. Además en esta tabla el peso total de los productos usados en la producción de cada lote se calcula de forma estimada pues durante el proceso de producción no se paró el encapsulador para evitar así pérdidas mayores de los polímeros y del principio activo. El total del material usado se calculó pesando las formulaciones al principio y al final del proceso y estimando que en la producción de los lotes se gastó en todas las misma cantidad (para cada lote se utilizaron las misma características y tiempo de fabricación).

Experimento	Peso microcápsulas (g)	Material consumido (g)	Rendimiento (%)
E1	11,36	20,19	56,27
E2	10,64	20,19	58,70
E3	10,91	20,19	60,18
E4	11,55	20,19	63,72

Tabla 4: Rendimiento de la producción de los diferentes lotes a estudiar.

A la hora de discutir los resultados obtenidos vemos que los rendimientos son bastante bajos lo cual es un factor determinante a la hora de poder llevar a cabo la producción a gran escala. Estos bajos rendimientos podrían explicarse en sí por varios motivos; primero por el propio proceso de encapsulación o incluso por el propio equipo de encapsulación. Una limitación que presenta este equipo en concreto es la imposibilidad de mantener de forma exacta un caudal totalmente constante, ni definir los parámetros oportunos desde el primer momento. Esto supone ya desde el inicio del proceso un gran gasto inicial de las dispersiones hasta que se logra obtener el flujo y la forma de gota adecuada; por otro lado, tendríamos también las pérdidas de principio activo debidas a la encapsulación no concéntrica y la formación de finas paredes protectoras (Atencio et al., 2020) que suponen un gasto de la dispersión de CVC que además no se va a encapsular y por lo tanto se va a perder. Por otra parte, también cabe tener en cuenta que estos valores pueden ser resultado de las pérdidas de agua de las dispersiones de polímeros durante el proceso de reticulación (Cáceres et al., 2020).

Cabe concluir por último que estos resultados de eficacia del proceso de obtención de microcápsulas de carvacrol deben ser tomados con prudencia, ya que es más que posible que estén infraestimados. Tal y como se indicó en otro punto del trabajo, existe una pérdida relevante del material que compone el núcleo de la microcápsula desde que el equipo comienza a funcionar hasta que se ajustan adecuadamente los caudales de ambos canales (núcleo y cubierta)

Cantidad de CVC encapsulado y eficiencia de encapsulación (EE %)

La tabla 3 muestra el peso medio de 3 cápsulas utilizadas en la extracción junto con su absorbancia y los miligramos de CVC encapsulados por miligramo de cápsula para cada uno de los 4 lotes.

LOTE	Peso 3 cápsulas (mg)	Absorbancia media	mg CVC/mg cápsula
1	86,4	0,2958	0,071
2	75,2	0,2441	0,066
3	84,3	0,3085	0,077
4	80,7	0,2556	0,065

Tabla 5: Cantidad de CVC encapsulado determinado por espectrofotometría UV-VIS

Por otro lado la Tabla 4 expresa la EE% determinada para cada uno de los lotes.

Muestra	CVC encapsulado (mg)	CVC usado (mg)	EE %
1	796,27	2062,5	38,61
2	745,80	2062,5	36,16
3	764,72	2062,5	37,08
4	809,58	2062,5	39,25

Tabla 6: Eficacia de encapsulación por lote

Dados estos parámetros podemos decir que la cantidad media de miligramos de CVC por miligramo de cápsula es de $0,07 \text{ mg} \pm 0,0056$; mientras que la EE % media del proceso es de $37,77 \% \pm 1,41$.

Ambos resultados son muy importantes a la hora de llevar a cabo el proceso pues un contenido inapropiado de CVC puede llegar a tener el efecto contrario al deseado y producir efectos tóxicos (Sharifi-Rad et al., 2018) y por otro lado la EE% es clave para determinar el éxito del proceso (Dobroslavić et al., 2024).

En relación con los datos obtenidos en la EE% vemos que nuestros datos son relativamente bajos pues a la hora de calcular el CVC encapsulado por lote con los datos obtenidos de la carga solo se tuvo en cuenta la porción de cápsulas totalmente concéntricas y no aquellas en las que núcleo se vio desplazado, si se tiene en cuenta también esta porción (puesto que después del endurecimiento ya no perdían aceite) esta EE % subiría hasta una media de $47,97\% \pm 1,41$, pero esta media no sería real puesto que esa fracción de las cápsulas no contiene la misma cantidad de CVC encapsulado. Pese a esto nuestros datos de EE% con la fracción de cápsulas concéntrica se siguen correspondiendo con algunos de los resultados vistos (Dobroslavić et al., 2024).

Por otro lado, se vio que la encapsulación de una mayor cantidad de CVC resultaba en una drástica disminución de la EE% que se podía observar por la aparición de aceite en el medio de reticulación lo cual se reportó ya en el apartado 3.1 y en estudios previos (Benavides et al., 2016), por este mismo motivo es importante tener unos parámetros fijos entre los cuales se encuentren un bajo caudal o flujo del material de la cubierta y del núcleo pues estos permiten un mayor grado de eficacia. (Chew & Nyam, 2016).

De la misma forma que se ha comentado anteriormente, debemos tener en cuenta, que la eficacia de encapsulación del carvacrol se determina en base al carvacrol empleado en la preparación de las microcápsulas, que se determina como aceite consumido (canal interior) para la formación del núcleo. Debido a las dificultades experimentales para obtener microcápsulas desde el momento en que se inicia el proceso (debido a los ajustes que hay que hacer en los caudales), existe una pérdida de aceite esencial no determinada y que por tanto, no se ha empleado para los cálculos de eficacia de encapsulación.

Ensayos de liberación y estabilidad de las cápsulas en diferentes medios

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo en dos medios con diferente pH y formulación, además se analizó la estabilidad de las microcápsulas en otro tipo de líquidos.

Liberación controlada en PBS y estabilidad en diferentes medios

Una vez comenzado el ensayo de liberación, se tomaron las muestras relativas a las 4 primeras horas, se pudo comprobar como las microcápsulas se empezaban a desintegrar perdiendo totalmente el contenido de su interior y creando una turbidez blanquecina en el PBS (figura 9).

Este suceso puede explicarse por la lixiviación del calcio debido a la formación de complejos con otras moléculas (Atencio et al., 2020). Esto en parte es debido a la propia composición del PBS, pues en dicha composición presenta dos sales que contienen sodio por lo que en sí el propio medio va a contener iones de sodio disueltos en el que son capaces de realizar intercambio iónico con el Ca^{+2} presente en la estructura de las microcápsulas por la presencia de grupos COO^- y NH_2^- produciendo una relajación de la cadena (Bajpai & Sharma, 2004) y posteriormente la aparición de turbidez por formación de sales de fosfato de sodio e hidroxiapatita, que se ve fomentada cuando el pH es básico o neutro, como es en este caso (Pasparakis & Bouropoulos, 2006). Pero como veremos más adelante en los resultados del estudio de hinchamiento este intercambio iónico por sí solo no conlleva a la degradación, pues esta va a depender de las cantidades de Ca^{+2} y Na^+ disponibles, pues cuando la cantidad de Na^+ es elevada, este reacciona también con los grupos funcionales de los residuos de manurónico y empieza a reaccionar también el calcio ionizado que conlleva a un aumento drástico de la superficie de la microcápsula que se antepone a su posterior destrucción o degradación (Bajpai & Sharma, 2004).

Por otro lado, tenemos el ensayo de estabilidad que se realizó principalmente para confirmar que el PBS rompía las cápsulas, con la finalidad de confirmar los argumentos encontrados en la bibliografía utilizada. De esta forma se reafirmó que las microcápsulas en PBS volvían a aparecer degradadas y con el medio con turbidez y que las formulaciones sumergidas en solución CaCl_2 al 1% no sufrían ningún tipo de cambio; En el resto de los medios también mantuvieron la integridad de las microcápsulas, como se expone más adelante.



Figura 9: PBS con turbidez por degradación completa de las cápsulas

Cabe mencionar que este ensayo se realizó simultáneamente a la extracción de CVC de las cápsulas y por ello dicho proceso se realizó en PBS. En la figura 9 podemos ver la turbidez que presenta el medio tras la degradación de las cápsulas, dicha turbidez acaba sedimentando si no se mantiene el medio en agitación constante.

Ensayo de liberación en medio simulado de heridas (SWF).

La evaluación de la liberación del CVC encapsulado en NaAlg-CMC en un medio que simula la composición del exudado que emana de una herida mostró una liberación media del $70,96 \% \pm 6,86$ en las primeras horas del experimento alcanzándose el máximo de liberación y en las primeras 24 horas con una liberación media de los lotes del $95,91\% \pm 3,61$. La figura 10 muestra esta cinética de liberación completa hasta el final del ensayo donde podemos ver que la gran mayoría del producto se libera al

principio del ensayo y luego la liberación se mantiene estable; mientras que en la figura 11 vemos la liberación de CVC hasta llegar a su máximo.

Estos resultados muestran una elevada liberación inicial del principio activo al comienzo del ensayo. Debemos tener en cuenta que en los sistemas de administración en los que se pretende una liberación del compuesto bioactivo, la liberación tiene lugar de forma más rápida o más lenta dependiente de las propias características de la formulación como son el pH en el que se encuentran las microcápsulas, el contenido de agua de estas, la temperatura del ensayo de liberación, la proporción de los componentes, las condiciones de almacenamiento... (Yammine et al., 2024).

En vista de los resultados obtenidos podemos decir que la liberación de CVC en nuestras condiciones experimentales sigue un mecanismo de difusión pues en este tipo de mecanismos de liberación tiene lugar una liberación muy rápida del contenido o principio activo en los primeros tiempos de muestreo del ensayo, que después se mantiene constante en el tiempo.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que también existe una contribución relacionada con el mecanismo de hinchamiento de la cubierta polimérica a la hora de llevar a la cabo la liberación, como se comentará un poco más adelante. (Yammine et al., 2024).

Por otro lado, esta rápida liberación del contenido de CVC al medio podría ser debido a que el pH de 7,5 puede tener un efecto similar a un pH de 7,4 a la hora de crear enlaces cruzados iónicos relativamente fuertes con el Ca^{+2} dentro del gel que generen una elevada fuerza de expulsión debida a las repulsiones electrostáticas entre los grupos -COO^- (Lin et al., 2005).

En otros estudios encontrados en la literatura, se observan perfiles más lentos de liberación que los obtenidos en nuestros ensayos. Esto puede ser debido a que teóricamente a un pH de este rango debería limitar proporcionalmente la liberación del fármaco (Lin et al., 2005), pues las mayores cinéticas de liberación se corresponden con medio de liberación a pH más ácidos, mientras que los pH más básicos muestran una liberación más controlada debida a la deprotonación de los grupos funcionales de los compuestos que forman la cubierta protectora de las microcápsulas (Yammine et al., 2024).

No obstante, no debemos dejar de lado, por una parte, las diferentes metodologías empleadas, la sustancia activa de estudio, o bien, las diferencias entre formulaciones, ya que es posible que en este caso la liberación se viese aumentada por el estado físico de las propias microcápsulas, pues las preparaciones se mantuvieron en condiciones del 100% de humedad. Las microcápsulas objeto de este trabajo se mantuvieron en estas condiciones y no se secaron ni liofilizaron ya que se podía dar una pérdida del compuesto bioactivo de su interior, que recordemos que es altamente volátil. También el hecho de mantenerlas en estado húmedo pudo acelerar la posterior liberación del CVC encapsulado (Yammine et al., 2024) en el caso de existir una presión osmótica que puede ser capaz de impulsar el contenido del núcleo hacia el exterior de forma más rápida (Pasparakis & Bouropoulos, 2006).

Otro factor importante que tener en consideración es la temperatura del ensayo. En este caso el objetivo fue el de simular un ambiente similar al de una herida (con una temperatura de 37°C), lo cual pudo provocar la contracción de las cadenas poliméricas y llegar a incluso a producir un aumento de la velocidad de la liberación. Este factor suele ser algo dependiente de los materiales usados en la preparación y del control de la proporción de cada uno en la cubierta (Yammine et al., 2024).

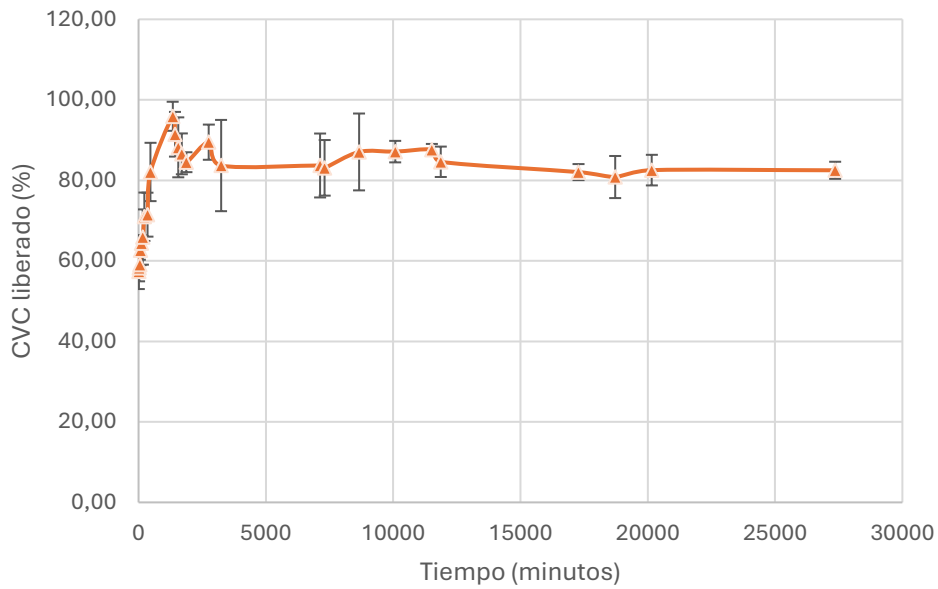


Figura 10: Perfil de liberación de las cápsulas en SWF

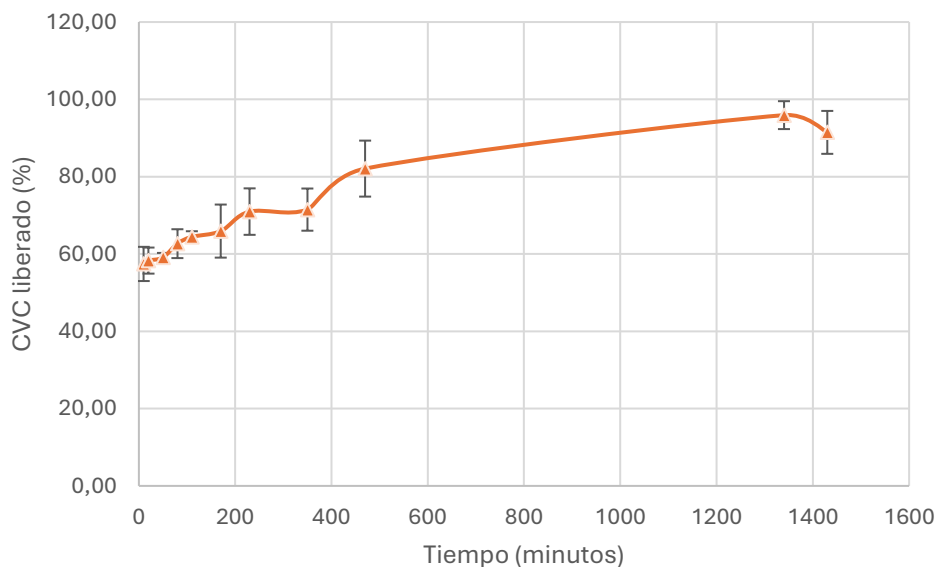


Figura 11: Perfil de liberación de las cápsulas hasta alcanzar el máximo en SWF

Estudios de hinchamiento en H₂O Y SWF.

La figura 12 muestra el cambio dinámico de peso debido al hinchamiento de las microcápsulas mixtas de NaAlg y CMC cargadas con el principio activo, formado por CVC y aceite de girasol, en dos medios diferentes, que fueron el agua destilada o H₂O (pH 7,0) y el fluido simulado de heridas o SWF (pH 7,5). Estos resultados reflejan el hinchamiento durante las primeras 3 horas que fue cuando se estabilizó por primera vez el peso hasta mantenerse constante. Podemos observar que el grado de hinchamiento (S_w %) es diferente en cada uno de los medios, ya que en agua destilada se llega a un $22,7 \% \pm 5,8$ mientras que en SWF tan solo se alcanza el $9,6 \% \pm 1,2$ en relación con el estado inicial de las microcápsulas húmedas.

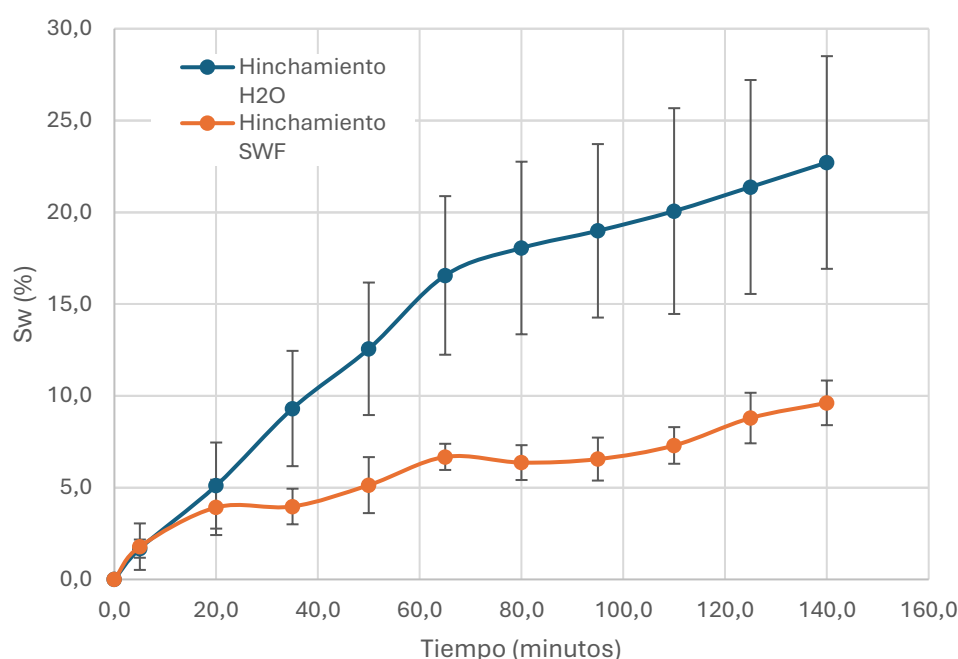


Figura 12: Perfil de hinchamiento de las microcápsulas durante las 3 primeras horas en H₂O y SWF, donde se representan la media y la desviación estándar de los 4 lotes.

En la figura 13, en cambio, se muestra el comportamiento de hinchamiento o de absorción de agua durante todo el estudio hasta llegar a un estado final de hinchamiento (peso constante e invariable) realizado en ambos medios, donde podemos observar aún más claramente la notable diferencia que hay en la capacidad de hinchamiento de las perlas en función del medio en el que estén; pues en agua destilada (pH 7,0) obtenemos un grado de hinchamiento de $104,5 \% \pm 8,4$ mientras que en SWF (pH 7,5) se obtiene un hinchamiento del $11,7 \% \pm 1,7$.

A la hora de discutir y analizar estos resultados vemos claramente que existe una notable diferencia en el grado de hinchamiento en función del medio en el que se están inmersas las microcápsulas.

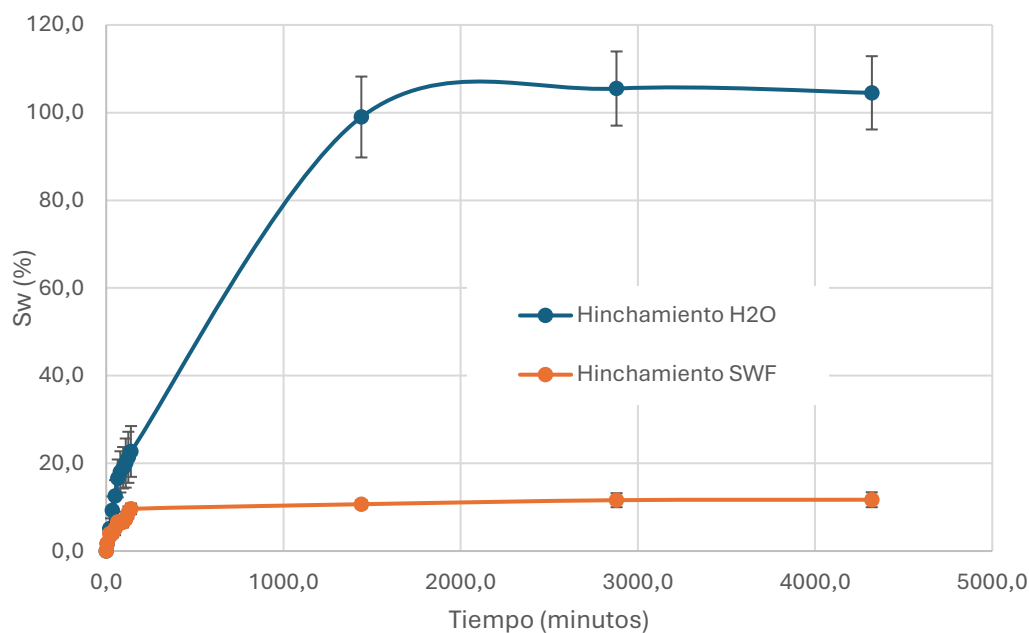


Figura 13: Perfil de hinchamiento total de las microcápsulas en H₂O y SWF. Los valores representados son la media y la desviación estándar de los 4 lotes.

En el caso de las cápsulas de NaAlg-CMC en agua, se observó que al finalizar el muestreo del peso de las mismas se vio duplicado pasando de ser de 408,1 mg \pm 41,9 a ser de 834,7 mg \pm 62,3. Este proceso puede tener su explicación, ya que las microcápsulas húmedas de NaAlg son propensas a absorber agua para ocupar así las regiones vacías de su red o estructura polimérica que se encuentra deshidratada, dando lugar de esta forma a una relajación de la estructura por presión osmótica, la cual no cesa hasta que se equilibra con las fuerzas de enlace de reticulación y por lo tanto forma una estructura estable de gel expandido, lo cual se corresponde con el comportamiento observado en el ensayo (Pasparakis & Bouropoulos, 2006).

Por otro lado, en cuanto al mecanismo de hinchamiento de estas mismas microcápsulas en SWF, se partió de un peso inicial medio de 421 mg \pm 41,6 y se obtuvo un peso final de 470,3 mg \pm 47,8. Esto podría deberse en parte al pH del medio, que crea interacciones iónicas relativamente fuertes entre los grupos carboxílicos, el NaAlg y el Ca⁺² de la solución gelificante, lo que impidió una gran absorción de agua por parte del gel (Lin et al., 2005).

Otro de los factores que puede incrementar el grado de hinchamiento es la presencia de iones de sodio en el medio en el que se colocan los geles, pues estos iones de sodio sufren intercambio iónico con el Ca⁺² unido principalmente a los grupos -COO⁻ de las secuencias de manurónico del NaAlg y del CMC, lo que pudo crear una repulsión electrostática, que a su vez resulta en una relajación de la cadena polimérica del gel y por lo tanto, un aumento de peso o hinchamiento (Bajpai & Sharma, 2004). Este proceso podría explicar el escaso hinchamiento de las microcápsulas en SWF pues este fluido está compuesto por NaCl, CaCl₂, BSA y tampón Tris; por lo que la presencia de

iones de sodio es escasa o no lo suficientemente abundante como para producir un hinchamiento masivo.

Otro aspecto relevante para tener en cuenta en los resultados de este ensayo en comparación a otros resultados obtenidos en la bibliografía es la integridad de las microcápsulas al final del ensayo, e incluso semanas después de haber terminado dichos ensayos. Esto puede deberse al mayor grado de reticulación presente en nuestras preparaciones de microcápsulas; debido a que en nuestra metodología experimental de elaboración de las microcápsulas, la solución de reticulación es de una concentración del 2,3 % y sabemos que a medida que se aumenta el grado de reticulación, el cual depende de esta solución de CaCl_2 , se disminuye la absorción de agua por parte de la red polimérica pues se forma una mejor estructura de “egg-box” por parte de los grupos carboxílicos del gulurónico con las moléculas de Ca^{+2} de la solución (Bajpai & Sharma, 2004).

Otra posible causa de esta integridad puede deberse a los componentes usados en la formación de las microcápsulas, pues en nuestros ensayos hemos utilizado CMC y NaAlg, ambos polímeros poseen un gran número de grupos funcionales $-\text{COO}^-$, por lo que la reticulación puede verse aumentada (Che Nan et al., 2019).

Con el fin de dilucidar un poco mejor nuestros resultados, dentro de este mismo ensayo, se realizó un ensayo de hinchamiento tanto en SWF como en agua destilada de un lote que se fabricó con los mismos parámetros de encapsulación, pero dejándolo menos tiempo (15 minutos) que el resto de los lotes estudiados en la solución de endurecimiento (este lote solo se utilizó para este ensayo de hinchamiento en concreto).

Como podemos ver en la figura 14 y en la 15, donde se muestran ambos perfiles de hinchamiento, pese a la menor reticulación de las microcápsulas usadas en este ensayo, la diferencia entre el comportamiento de las mismas en H_2O y SWF, sigue la misma tendencia que la vista anteriormente ya que la explicación o procesos que ocurren en estas para que se produzca el hinchamiento son los mismos, la única diferencia que sucede en comparación con las cápsulas vistas anteriormente es que el proceso de hinchamiento en H_2O es mucho más rápido en este caso. Esto puede explicarse debido a la diferencia en el proceso de reticulación y por lo tanto en el endurecimiento ya que al permitir que estas cápsulas estén un menor tiempo en contacto con la solución de CaCl_2 la estructura polimérica o “egg box” que se forma es más débil y la reticulación como consecuencia de una menor interacción entre los iones divalentes del calcio y los polímeros que crea huecos en la red polimérica que pueden ser fácilmente rellenos con la absorción de agua, esto no ocurre en el caso del SWF ya que aquí el hinchamiento sigue un patrón distinto que depende de la cantidad de iones de sodio disponibles en el propio medio como se vio anterior (Bajpai & Sharma, 2004).

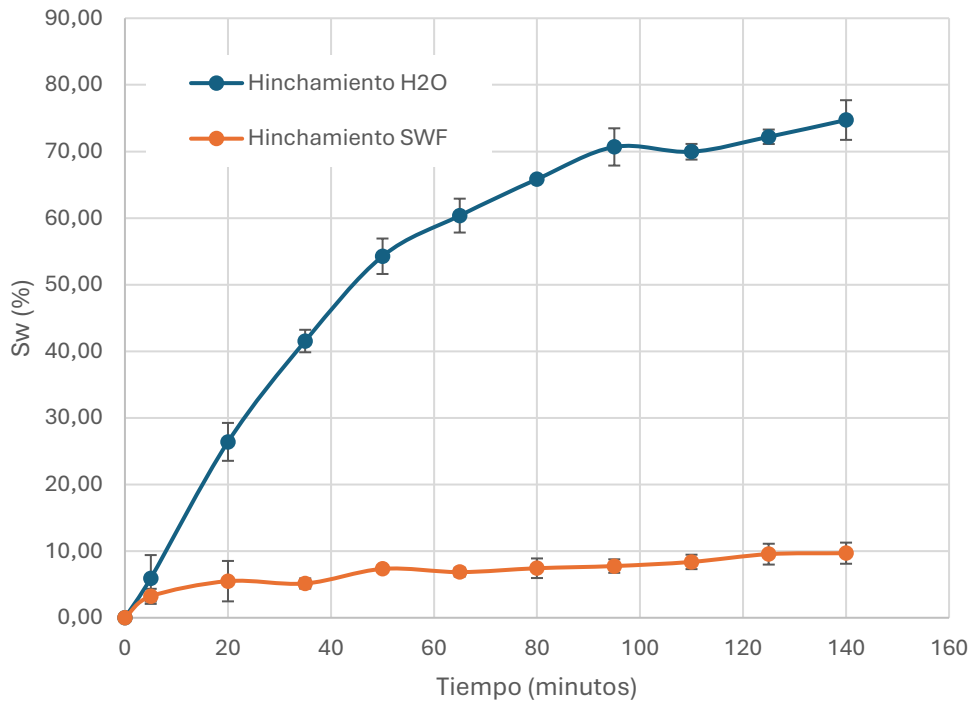


Figura 15: Perfil de hinchamiento de las primeras 3 horas de las cápsulas húmedas menos reticuladas en H₂O y SWF, representando media y desviación estándar.

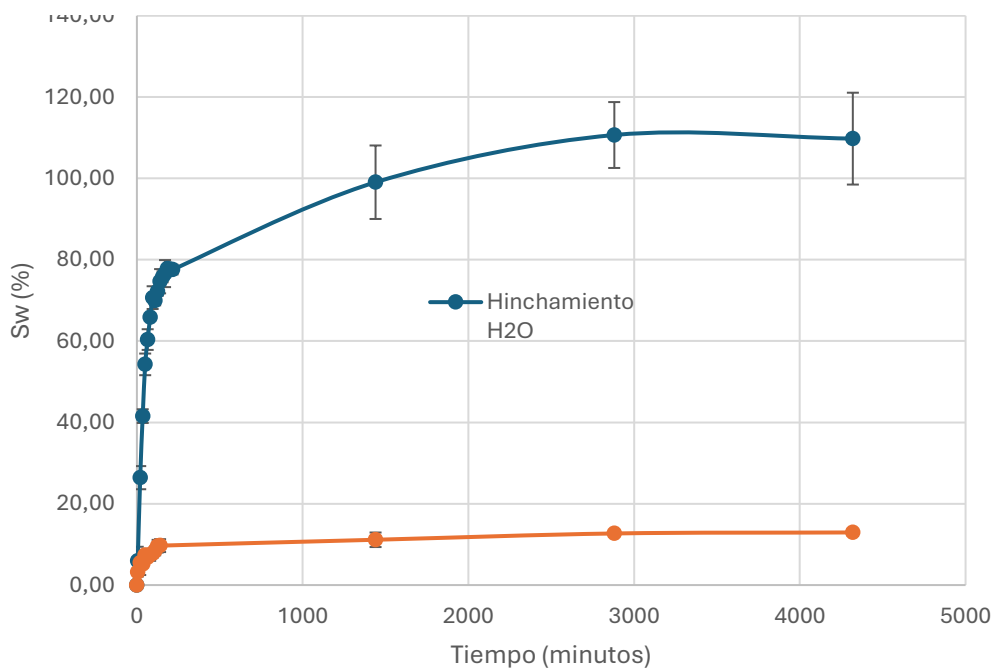


Figura 14: Perfil de hinchamiento total de las cápsulas húmedas menos reticuladas en H₂O y SWF, representando media y desviación estándar.

Ya por último en este estudio en la figura 16 se exponen de manera visual las cápsulas antes y después del proceso de hinchamiento producido en los distintos medios a los que se sometieron; por lo que podemos ver en el caso del agua destilada se pasa de un diámetro de 4 mm por cápsula a prácticamente 6 mm y en cambio en el fluido de heridas simulado no hay ningún visualmente notable.

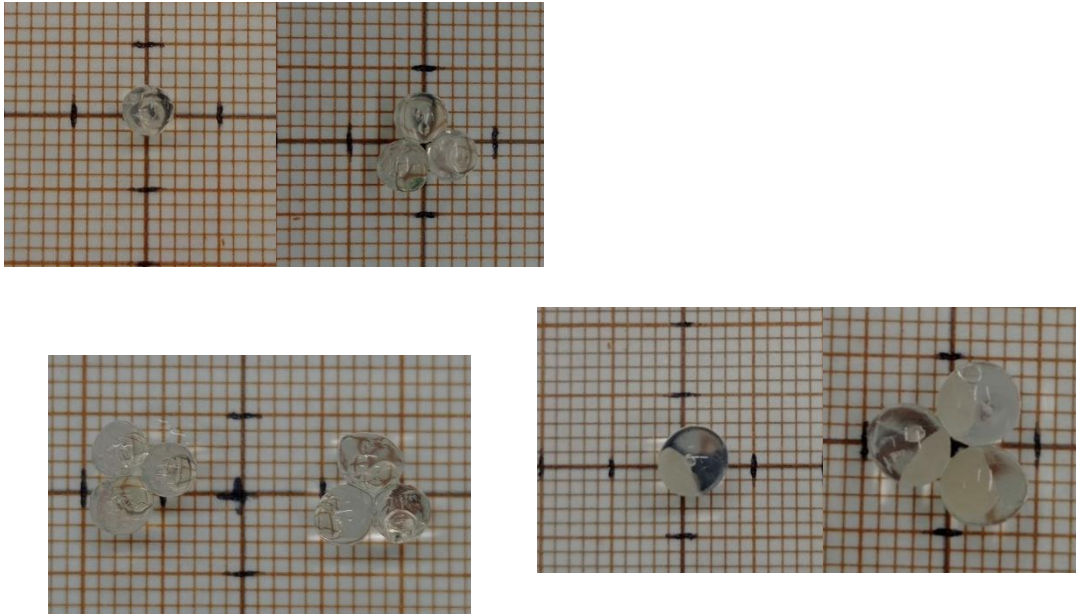


Figura 16: Arriba a la izquierda: aspecto inicial de las cápsulas antes del hinchamiento con H₂O. A la derecha aspecto final de las cápsulas tras el hinchamiento con H₂O. Abajo a la izquierda: cápsulas antes del hinchamiento y a la derecha cápsulas tras el hinchamiento en SWF.

Medidas de proliferación y viabilidad celular

Las técnicas de proliferación y viabilidad celular son claves hoy en día en las ciencias de la salud, pues dan una idea de la compatibilidad celular que tienen los componentes, las preparaciones basadas en esos componentes y los agentes activos en unas condiciones *in vitro*, donde se trabaja con tipos celulares de interés.

En vista de la importancia de este tipo de resultados y con el fin de evaluar el efecto del CVC tanto libre como encapsulado, se realizó un ensayo de viabilidad en células de línea continua de queratinocitos humanos inmortalizados, HaCaT, usando el protocolo de ensayo WST-1.

Este ensayo se realizó para ver los efectos citotóxicos de CVC en las células y determinar la biocompatibilidad de las cápsulas preparadas.

Así, se estudió el efecto de tres concentraciones diferentes de carvacrol (10; 25 y 50 mg/ml) y también, el efecto del carvacrol liberado desde las microcápsulas a distintos tiempos de liberación.

En la figura 17 aparecen reflejados los datos de viabilidad obtenidos tras 24 horas de exposición. Como control positivo, se usó un tensoactivo (Tritón X 100; 0.055%), y como control negativo, células sin tratar.

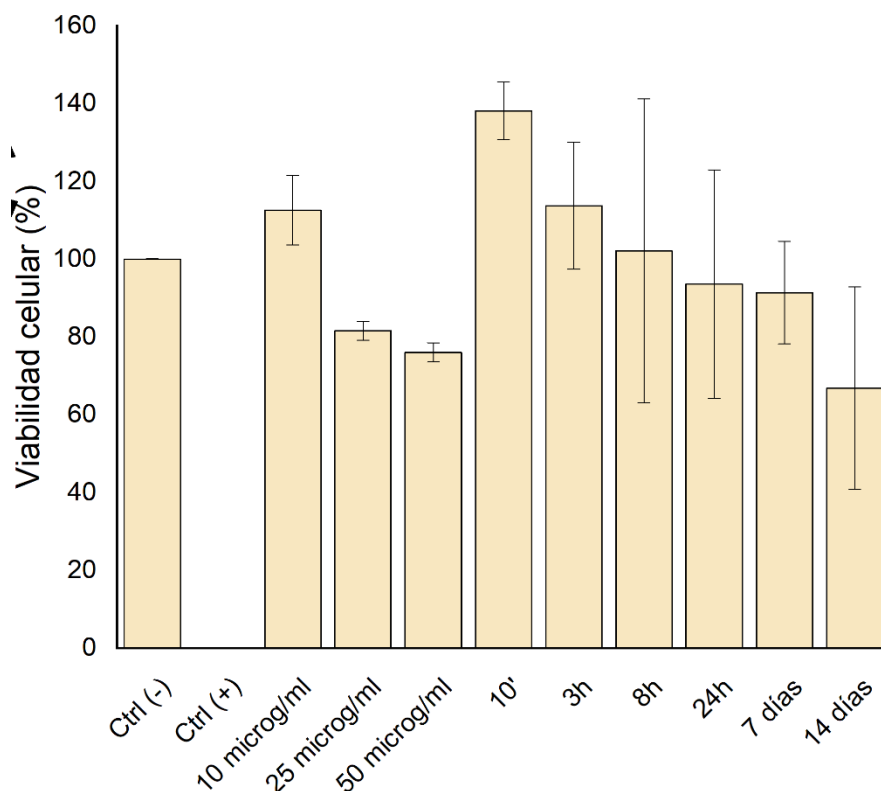


Figura 17: Efectos del carvacrol puro a 3 concentraciones distintas (10; 25 y 50 mg/ml) y diluciones de las muestras obtenidas de los ensayos de liberación del carvacrol desde las microcápsulas sobre la actividad metabólica de las células HaCaT después de 24 hora

Como se puede observar, existe una influencia clara de la concentración de carvacrol en el medio de cultivo. Así, los valores de viabilidad obtenidos para la concentración de carvacrol de 25 mg/ml, podría considerarse que están dentro de los límites que existen en cuanto a viabilidad. Por el contrario, los valores de viabilidad correspondientes a las concentración más alta, rondaron entre el 71% y el 76% de viabilidad celular, lo que indica una clara reducción de la actividad metabólica en esta línea celular. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores, tanto para el carvacrol como para otros aceites esenciales en diferentes líneas celulares (Amirghofran et al., 2016).

En cuanto al efecto del carvacrol liberado a partir de las microcápsulas a distintos tiempos, cabe señalar que se encontró un patrón de descenso a medida que fue pasando el tiempo. Aunque las concentraciones en todas las muestras de liberación estaban por debajo del rango de concentración que demostró tener una viabilidad del 100% (estas muestras estaban alrededor de los 0.5 mg/ml), en estos estudios, bajo nuestras condiciones de ensayo y teniendo en cuenta esta línea celular, concentraciones bajas pero mantenidas en el tiempo, dan lugar a una reducción en la viabilidad celular.

Si bien, el efecto del carvacrol y otros aceites esenciales sobre la actividad metabólica de las células ha podido ser demostrada en varios trabajos (Ranjitkar et al., 2021), el efecto del carvacrol después de haber sido liberado de un sistema, no han sido tan fáciles de constatar. De hecho, los resultados de nuestro trabajo son hasta cierto punto sorprendentes, debido a que la concentración en todas las muestras es muy similar. La explicación para aclarar estos resultados aún está por dilucidar, aunque podría ser debido a alguna variación química de la molécula del carvacrol (de mayor toxicidad que el propio carvacrol) a lo largo del tiempo del ensayo de liberación, o bien a la existencia de alguna reacción química de ese metabolito con el reactivo empleado en este ensayo o reacciones químicas llevadas a cabo durante la liberación.

Cabe señalar, por último, que en la observación de los cultivos y de los distintos pocillos a través del microscopio no se observaron, cambios estructurales o de morfología, empleando objetivos hasta 40X.

En el futuro, llevaremos a cabo ensayos complementarios, empleando, por ejemplo, otros tipos de ensayos de viabilidad celular, con el fin de determinar si realmente existe interferencia con el agente activo.

Conclusiones

Tras realizar las diferentes metodologías y en función de los resultados obtenidos en este trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

- El proceso de encapsulación por el método con boquillas coaxiales a dispersión no es un método completamente reproducible ni de alto rendimiento debido a las propias limitaciones del encapsulador; sin embargo, presenta una eficacia de encapsulación notable y adecuada para su uso en investigación.
- Las cápsulas de alginato de sodio y carboximetilcelulosa sódica son inestables en medios que presenten grandes concentraciones de iones de sodio debido al intercambio iónico y lixiviación del calcio
- Estas mismas cápsulas son muy estables en los fluidos simulados de heridas; presentando una liberación inicial rápida del principio activo por difusión, seguida de una liberación sostenida en el tiempo, influenciada seguramente por la temperatura, humedad y pH.
- El grado de hinchamiento de las cápsulas depende fundamentalmente del medio circundante debido al pH y composición de este.
- El proceso de reticulación es fundamental para obtener unos buenos resultados, pues influye en la porosidad e integridad de las cápsulas, y por lo tanto lo hace también en la liberación.
- Concentraciones de carvacrol de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o inferiores peso sostenidas en el tiempo provocan una disminución de la viabilidad, pero no una alteración morfológica de las células.

En investigaciones futuras sería una buena opción centrar los estudios en la capacidad de estas formulaciones de proteger la actividad antioxidante del carvacrol así como aumentar la cantidad de pruebas realizada in vitro para poder seguir desarrollando una formulación cada vez mejor.

Bibliografía

- Amirghofran, Z., Ahmadi, H., Karimi, M. H., Kalantar, F., Gholijani, N., & Malek-Hosseini, Z. (2016). In vitro inhibitory effects of thymol and carvacrol on dendritic cell activation and function. *Pharmaceutical Biology*, 54(7), 1125–1132.
<https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1055579>
- Atencio, S., Maestro, A., Santamaría, E., Gutiérrez, J. M., & González, C. (2020). Encapsulation of ginger oil in alginate-based shell materials. *Food Bioscience*, 37.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100714>
- Bajpai, S. K., & Sharma, S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *Reactive and Functional Polymers*, 59(2), 129–140.
<https://doi.org/10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2004.01.002>
- Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., & Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry*, 204, 77–83. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.02.104>
- Cáceres, L. M., Velasco, G. A., Dagnino, E. P., & Chamorro, E. R. (2020). MICROENCAPSULATION of grapefruit oil with sodium alginate by gelation and ionic extrusion: optimization and modeling of crosslinking and study of controlled release kinetics. *Revista Tecnología y Ciencia*, 39, 41–61.
<https://doi.org/10.33414/RTYC.39.41-61.2020>
- Che Nan, N. F., Zainuddin, N., & Ahmad @ Ayob, M. (2019). *Preparation and swelling study of CMC hydrogel as potential superabsorbent*.
[http://www.pertanika.upm.edu.my/Pertanika%20PAPERS/JST%20Vol.%2027%20\(1\)%20Jan.%202019/28%20JST-1018-2017.pdf](http://www.pertanika.upm.edu.my/Pertanika%20PAPERS/JST%20Vol.%2027%20(1)%20Jan.%202019/28%20JST-1018-2017.pdf)
- Chew, S. C., & Nyam, K. L. (2016). Microencapsulation of kenaf seed oil by co-extrusion technology. *Journal of Food Engineering*, 175.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.12.002>
- Cruz, C. de la, Chamba, S. D. J., & Natali, M. (2016). ELABORACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE MICROENCAPSULADOS DE ACEITES ESENCIALES DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*) Y HOJAS DE ISHPINK (*Ocotea quixos*) COMO ADITIVOS NUTRICIONALES PARA PISCICULTURA. *Tesis*.
- De Medicina, F. (2012). *Obtención y caracterización de nanopartículas poliméricas para la encapsulación de aceites esenciales por la técnica de nanoprecipitación*.
<http://cd.dgb.uanl.mx//handle/201504211/5468>
- Dobroslavić, E., Cegledi, E., Robić, K., Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V., & Repajić, M. (2024). Encapsulation of Fennel Essential Oil in Calcium Alginate Microbeads via Electrostatic Extrusion. *Applied Sciences* 2024, Vol. 14, Page 3522, 14(8), 3522.
<https://doi.org/10.3390/APP14083522>
- Ferrandiz, M., López, A., Franco, E., Garcia-Garcia, D., Fenollar, D., & Balart, R. (2017). Development and characterization of bioactive alginate microcapsules with

- cedarwood essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 32(3).
<https://doi.org/10.1002/ffj.3373>
- Freitas, R., Martins, A., Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Alves, J., Teodoro, F., Ribeiro, H. M., Gonçalves, L., Petrovski, Ž., Branco, L., & Pedrosa, R. (2020). Highlighting the biological potential of the brown seaweed *fucus spiralis* for skin applications. *Antioxidants*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/antiox9070611>
- Gandova, V., Lazarov, A., Fidan, H., Dimov, M., Stankov, S., Denev, P., Ercisli, S., Stoyanova, A., Gulen, H., Assouguem, A., Farah, A., Ullah, R., Kara, M., & Bari, A. (2023). Physicochemical and biological properties of carvacrol. *Open Chemistry*, 21(1). <https://doi.org/10.1515/chem-2022-0319>
- Isabel Zamora González, M., Gabriela López Villa, A., Benjamín Figueroa Ochoa, E., Ricardo Cortez Álvarez, C., Jazmín del Rocío Soltero Sánchez, D., Adriana Velarde Avalos, D., & Benjamín Figueroa Ochoa Profesor, E. (n.d.). *Estudio del perfil cinético de liberación del carvacrol solubilizado en el sistema gelificado F127/Agua*.
- Keawchaoon, L., & Yoksan, R. (2011). Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.031>
- Kurozawa, L. E., & Hubinger, M. D. (2017). Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. *Current Opinion in Food Science*, 15, 50–55.
<https://doi.org/10.1016/J.COFS.2017.06.004>
- Laseca Arranz, A., Sánchez Dengra, B., Bermejo Sanz, M. del V., González Álvarez, I., & González Álvarez, M. (2021). Formulaciones para la cicatrización de heridas, presente y futuro. *RESCIFAR Revista Española de Ciencias Farmacéuticas*, ISSN-e 2660-6356, Vol. 2, N°. 1, 2021, Págs. 1-12, 2(1).
- Lin, Y. H., Liang, H. F., Chung, C. K., Chen, M. C., & Sung, H. W. (2005). Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*, 26(14), 2105–2113.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2004.06.011>
- Lobato Guarnido, I. (2024). *Aplicación de técnicas de encapsulación para la incorporación de aditivos en la formulación de detergentes*. 1.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=328269&info=resumen&idioma=ENG>
- Marinelli, L., Fornasari, E., Eusepi, P., Ciulla, M., Genovese, S., Epifano, F., Fiorito, S., Turkez, H., Örtücü, S., Mingoia, M., Simoni, S., Pugnali, A., Di Stefano, A., & Cacciatore, I. (2019). Carvacrol prodrugs as novel antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 515–529.
<https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.05.093>
- Martins, M. A. R., Silva, L. P., Ferreira, O., Schröder, B., Coutinho, J. A. P., & Pinho, S. P. (2017). Terpenes solubility in water and their environmental distribution. *Journal of Molecular Liquids*, 241, 996–1002. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2017.06.099>
- Mohammed, N. K., Tan, C. P., Manap, Y. A., Muhiaddin, B. J., & Hussin, A. S. M. (2020). Spray Drying for the Encapsulation of Oils—A Review. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3873, 25(17), 3873. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25173873>

- Muchiutti, G. S., López Novello, L. H., Córscico, F. A., & Larrosa, V. J. (2019). Cápsulas de alginato para la protección de polifenoles presentes en el aceite esencial de orégano. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 30(59 nov-abr). <https://doi.org/10.33255/3059/687>
- Pasparakis, G., & Bouropoulos, N. (2006). Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 323(1–2), 34–42. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2006.05.054>
- Rajendran, U. S., Sridhar, M., Suganthi, R. U., & Manpal, S. (n.d.). *Biological and pharmacological of actions carvacrol and its effects on poultry: An updated review*. Retrieved June 21, 2024, from www.wjpps.com
- Ranjitkar, S., Zhang, D., Sun, F., Salman, S., He, W., Venkitanarayanan, K., Tulman, E. R., & Tian, X. (2021). Cytotoxic effects on cancerous and non-cancerous cells of trans-cinnamaldehyde, carvacrol, and eugenol. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95394-9>
- Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., & Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1675–1687. <https://doi.org/10.1002/PTR.6103>
- Xu, Z., Han, S., Gu, Z., & Wu, J. (2020). Advances and Impact of Antioxidant Hydrogel in Chronic Wound Healing. In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 9, Issue 5). <https://doi.org/10.1002/adhm.201901502>
- Yammine, J., Chihib, N. E., Gharsallaoui, A., Ismail, A., & Karam, L. (2024). Advances in essential oils encapsulation: development, characterization and release mechanisms. *Polymer Bulletin*, 81(5), 3837–3882. <https://doi.org/10.1007/S00289-023-04916-0>
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., & Raneva, V. G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64(1). [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00086-7)