



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA

APLICADA Y TECNOLOGÍA

UNIDAD LEGARIA CICATA-IPN

**NANOENCAPSULACIÓN DE RIBOFLAVINA EN
MATRICES POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES
EMPLEANDO LA TÉCNICA DE SECADO POR
ASPERSIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA:

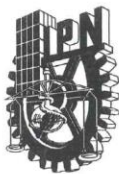
VIOLETA MANCILLA DÁVALOS

DIRECTORES DE TESIS

DRA. MÓNICA ROSALÍA JAIME FONSECA

DR. JORGE YÁÑEZ FERNÁNDEZ

México D.F. Julio del 2014



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 21 del mes de mayo del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-LEGARIA para examinar la tesis titulada:

Nanoencapsulación de riboflavina en matrices poliméricas biodegradables empleando la técnica de secado por aspersion

Presentada por el alumno:

MANCILLA
Apellido paterno

DÁVALOS
Apellido materno

VIOLETA
Nombre(s)

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 1 | 2 | 0 | 3 | 5 | 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca

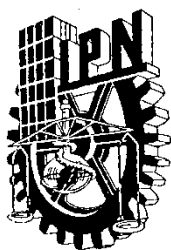

Dr. Jorge Yañez Fernández


Dr. Eduardo San Martín Martínez


Dr. Fernando Trejo Zárraga


Dr. Ruth Pedroza Islas


Dr. José Antonio Calderón Arenas
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
DEL I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 7 del mes de julio del año 2014, el (la) que suscribe **Violeta Mancilla Dávalos** alumno(a) del Programa de **Maestría en Tecnología Avanzada**, con número de registro **B120358**, adscrito(a) al **C.I.C.A.T.A.-IPN**, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) **Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca** y **Dr. Jorge Yáñez Fernández** y cede los derechos del trabajo titulado **NANOENCAPSULACIÓN DE RIBOFLAVINA EN MATRICES POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES EMPLEANDO LA TÉCNICA DE SECADO POR ASPERSIÓN**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, Figuras o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones **Centro de Investigación de Tecnología Avanzada del IPN. Av. Legaria 694 Col. Irrigación 11500 D.F. México. Teléfono 015557296300 ext. 67789 e-mail: mjaimef@ipn.mx, vmancilla88@hotmail.com, jyanez68@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Violeta Mancilla Dávalos

El trabajo presente se llevó a cabo en el Laboratorio de Biomateriales del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca y el Dr. Jorge Yáñez Fernández, con el apoyo del CONACyT

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional, por brindarme la oportunidad de continuar mis estudios superiores.

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por el apoyo económico que me dieron.

A la Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca, por su apoyo incondicional, consejos, palabras de aliento, amistad, profesionalismo y tiempo dedicado a lo largo de la maestría.

Al Dr. Eduardo San Martín Porras por apoyarme con su intelecto y consejos, personalmente una persona que me ayudo desde el momento que llegue a México, hasta la finalización de la maestría, la amistad brindada por su persona es invaluable.

A la Dra. Guadalupe Valverde, por creer en mí y darme la mano cuando lo necesité, su buena vibra y sus consejos me iluminaron en el momento adecuado.

A los profesores, por los conocimientos adquiridos que nos permitieron y por los cuales logre llevar a cabo los objetivos de esta investigación y el sueño de convertirme en profesional.

A los sinodales, gracias por sus como comentarios y sugerencias para completar este trabajo de tesis.

DEDICATORIA

Al Todo Poderoso Dios primeramente por acompañarme en todos mis pasos, en el arduo camino, permitiéndome avanzar hasta la cumbre de mi profesión.

A mis perseverantes padres:

Que día a día se enfrentaron a este mundo para darme lo mejor, ellos con cariño y gratitud me han apoyado en cada momento, por sus consejos, sus valores, por sus ejemplos de responsabilidad y constancia que me han infundido siempre, pero más que todo por su amor.

Pilar Dávalos Sánchez mi madre, por su apoyo incondicional, ella siempre a mi lado compartiendo conmigo el sueño de terminar esta carrera, por darme fuerzas para no fallecer, por colocarme en el mejor camino y creer en mí.

Richard F. Mancilla Terrazas mi padre gracias a sus palabras de aliento y consejos que complementaron mis decisiones y su comprensión alegada a mis decisiones.

Juan Manuel y Richard Mancilla Dávalos por ser mis héroes en todo momento, su amor, cariño, comprensión y protección fueron el escudo en este camino, gracias por sus infaltables palabras de aliento.

A todos mis familiares y amigos gracias por acompañar este camino, por el aliento que me dieron y por aportar un granito de arena para llegar a la cima.

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron las características estructurales y morfológicas de nanopartículas de Riboflavina (vitamina B₂), encapsulada en matrices de Quitosano, Alginato y Pectina y una combinación de estos biopolímeros Alginato-Quitosano y Pectina-Quitosano. Las nanoesferas se obtuvieron empleando la técnica de secado por aspersión a escala nano (Nano Spray Dryer Büchi B-90).

Se determinaron las condiciones de concentración efectivas de los biopolímeros y variables de proceso en el funcionamiento del equipo Nano Spray Dryer para la formación de nanoestructuras con tamaños homogéneos. Este equipo tiene la capacidad de secar por pulverización soluciones y suspensiones acuosas empleando aire comprimido como gas de secado, produciendo estructuras con una distribución homogénea de tamaños. Se empleó 0.125% de concentración en cada biopolímero para que el microfiltro no se sature de la solución a utilizar, esto se analizó mediante un diseño factorial de experimentos 2³, en el que se fijaron condiciones de uso del Nano Spray Dryer para la formación de nanopartículas de tamaño homogéneo. Las variables de proceso del equipo fueron: microfiltro de 4 µm y temperatura de 120°C.

Para diseñar estructuras resistentes y compactas, se determinó el intervalo de pH en el cual se favorece la interacción de cargas electrostáticas inversas entre ambos biopolímeros (Alginato-Quitosano y Pectina-Quitosano), con el fin de formar nanoesferas compactas y resistentes para la liberación controlada de Riboflavina. La medición de cargas electrostáticas se realizó en un equipo Nano Zetasizer. Una vez obtenida la curva de interacción pH vs. mV (cargas electrostáticas), se realizaron las soluciones de biopolímeros y se ajustó el pH de la solución de Alginato-Quitosano (pH = 3.3) y de Pectina-Quitosano (pH = 3.6) en cada biopolímero para su posterior acoplamiento. Una vez teniendo la solución homogénea, se elaboran las nanopartículas en el equipo Nanospray Dryer.

La estabilidad de las nanoesferas a la humedad del medio se analizó observando la morfología de las estructuras a través de la técnica de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). En general, las nanoesferas fueron estables a una humedad de 33 y 75%, sin embargo, a una humedad del 98% las estructuras se hidrataron en las primeras 24 horas, presentando estructuras aglomerados.

Del análisis de espectroscopia FT-IR, se observaron los grupos funcionales que interactúan una vez que las nanoesferas están formadas, estableciendo que el grupo carboxilo (-COO) del polímero aniónico (Alginato) puede interactuar con el grupo amino (-NH₃⁺) del Quitosano en la interacción Quitosano-Alginato.

Finalmente, se realizó la cinética de liberación de Riboflavina en un modelo *in vitro*. Como resultado del mismo se observó que la interacción de biopolímeros tiene una liberación progresiva, resaltando que la combinación de Pectina-Quitosano fue la matriz en la cual se liberó más rápidamente la vitamina comenzando en los primeros 40 min de su hidratación y la de Alginato-Quitosano lo hizo en un tiempo de 30 min. Concluyendo así que la matriz de Pectina-Quitosano retardó la liberación del compuesto activo.

En cuanto a los resultados de concentración, las nanopartículas en promedio alcanzaron una estabilidad en concentraciones de 0.02 mM, a partir de este punto la liberación que manifiestan se mantiene constante.

ABSTRACT

In this work the structural and morphological characteristics of nanoparticles of riboflavin (vitamin B₂), encapsulated in matrices of Chitosan, Alginate and Pectin and combinations of these biopolymers: Alginate-Chitosan and Pectin-Chitosan were studied. The nanospheres were obtained using the Spray Drying technique at nano scale (Nano Spray Dryer Büchi B-90).

The effective experimental conditions to form nanostructures with homogenous sizes were determined. Variables such as concentration of biopolymers and temperature of drying were studied during processing in the Nano Spray Dryer. This equipment has the capability to spray drying aqueous solutions and suspensions using compressed air as the drying gas, producing structures with a homogenous size distribution. For drying, 0.125% concentration of each biopolymer was used to avoid saturation of the microfilter. Results were analyzed by a statistical factorial design 2³, in which experimental conditions of processing by the Nano Spray Dryer were studied to form nanoparticles of uniform size. The variables selected were: 4 microns microfilter and 120 ° C.

To design robust and compact structures, the pH range in which the interaction of electrostatic charges between these two biopolymers (Alginate-Chitosan and Pectin-Chitosan) was studied. The measurement of electrostatic charge was performed in a Nano Zetasizer equipment. Once the interaction curve pH vs mV (electrostatic charge) biopolymers solutions were built, the pH of the Alginate-Chitosan (pH = 3.3) and Pectin-Chitosan (pH = 3.6) solutions was adjusted. Once having the homogeneous solution, the nanoparticles are obtained in the Nano Spray Dryer equipment. Nanospheres stability to moisture of the medium was analyzed by observing the morphology of the structures through Scanning Electron Microscopy (SEM). Overall, the nanospheres were stable at an interval of humidities between 33 and 75%, however, at high humidity (98%) structures were rapidly hydrated in the first 24 hours, introducing agglomerates.

By the FTIR analysis of nanospheres, functional groups interactions were observed, establishing that the (-COO) carboxyl group of the anionic polymer (Alginate) can interact with the amino group (NH³) of chitosan in Alginate-Chitosan interaction.

Finally, the kinetics of the release of riboflavin was performed in an *in vitro* model. As a result, it was observed that the interaction of biopolymers is a progressive release, noting that the combination of chitosan-pectin was the matrix in which vitamin released more quickly starting in the first 40 min of their hydration and chitosan-alginate did so in a time of 30 min concluding that the chitosan-pectin matrix delayed release of the active compound.

Regarding the results of concentration of vitamin, nanoparticles reached at maximum concentration at 0.02 mM after two hours.

INDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-------------|
| RESUMEN | I |
| ABSTRACT | III |
| INDICE DE CONTENIDO | V |
| INDICE DE FIGURAS | VIII |
| INDICE DE GRÁFICAS | X |
| INDICE DE TABLAS | XI |
| 1. ANTECEDENTES | 1 |
| 1.1 ENCAPSULACIÓN | 1 |
| 1.1.1 MICROENCAPSULACIÓN | 2 |
| 1.1.2 NANOENCAPSULACIÓN | 7 |
| 1.2 POLÍMEROS | 12 |
| 1.2.1 POLÍMEROS SINTÉTICOS | 13 |
| 1.2.2 POLÍMEROS NATURALES | 14 |
| 1.3 INTERACCIÓN DE BIOPOLÍMEROS | 20 |
| 1.4 COMPUESTOS ACTIVOS | 20 |
| 1.5 RIBOFLAVINA | 21 |
| 1.6 POTENCIAL Z | 23 |
| 1.7 HOMOGENIZACIÓN | 25 |
| 1.7.1 HOMOGENIZACIÓN POR ULTRASONIDO | 25 |
| 1.8 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM) | 26 |
| 1.9 ESPECTROFOTOMETRÍA FT-IR | 26 |
| 1.10 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD | 27 |
| 1.11 LIBERACIÓN DEL ACTIVO | 27 |

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| <u>2</u> | <u>JUSTIFICACIÓN</u> | 29 |
| <u>3</u> | <u>OBJETIVOS</u> | 31 |
| 3.1 | GENERAL | 31 |
| 3.2 | PARTICULARES | 31 |
| <u>4</u> | <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> | 32 |
| 4.1 | MATERIALES | 32 |
| 4.2 | METODOLOGÍA | 32 |
| 4.2.1 | EXPERIMENTACIÓN PREVIA | 35 |
| 4.2.2 | VENTANA DE INTERACCIÓN | 36 |
| 4.2.3 | PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN | 37 |
| 4.2.4 | FORMACIÓN DE NANOESFERAS | 38 |
| 4.2.5 | CARACTERIZACIÓN, MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA | 40 |
| 4.2.6 | ESTUDIO DE LIBERACIÓN | 41 |
| 4.2.7 | DISEÑO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 42 |
| <u>5</u> | <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> | 43 |
| 5.1 | SECADO POR ASPERSIÓN | 43 |
| 5.2 | VENTANA DE INTERACCIÓN | 46 |
| 5.3 | ELABORACIÓN DE NANOESFERAS | 48 |
| 5.4 | CARACTERIZACIÓN, MORFOLOGÍA Y ESTABILIDAD | 49 |
| 5.4.1 | ANÁLISIS POR MICROCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM) | 49 |
| 5.4.2 | ESTUDIO DE ESTABILIDAD | 53 |
| 5.4.3 | ESTUDIO FT-IR | 54 |
| 5.5 | ESTUDIO DE LIBERACIÓN | 56 |
| 5.5.1 | LIBERACIÓN DE RIBOFLAVINA EN NANOESFERAS DE ALGINATO, PECTINA Y QUITOSANO | 57 |
| 5.5.2 | LIBERACIÓN DE NANOESFERAS EN MATRICES COMBINADAS | 59 |

| | | |
|-----------------|---|------------------|
| <u>6</u> | <u>CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS</u> | <u>62</u> |
| <u>7</u> | <u>ANEXOS</u> | <u>64</u> |
| <u>8</u> | <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | <u>65</u> |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Papel Carbón (Fanger, 1974) | 2 |
| Figura 2 - Formas Principales De Encapsulación: A) Cápsula Mononuclear Y B) Agregados) - (Cerón, 2012)..... | 3 |
| Figura 3 - Nanoestructuras: A) Núcleo Líquido, B) Matriz Polimérica Y C) Sustancia Activa (Mora Et Al., 2010)..... | 8 |
| Figura 4 - Nanospray Dryer B-90 - Manual Nanospray Dryer | 9 |
| Figura 5 - Micrografia De Nanoesferas | 10 |
| Figura 6 - Formación De Polímeros..... | 12 |
| Figura 7 - Clasificación De Polímeros | 12 |
| Figura 8 - Polímeros Sintéticos | 14 |
| Figura 9 - Estructura Química Del Quitosano - (Jiang Et Al., 2014) | 15 |
| Figura 10 - Estructura Química Del Alginato De Sodio - (Aftab Et Al., 2014) | 16 |
| Figura 11 - Modelo Estructural De La Caja De Huevo | 17 |
| Figura 12 - Estructura Química De La Pectina - (Le Gall Et Al., 2006) | 18 |
| Figura 13- Estructuras Químicas De Riboflavina Y Sus Formas Activas, Fmn Y Fad..... | 21 |
| Figura 14 - Representación Esquemática Del Potencial Z. (An Introduction In 30 Minutes” Malvern Instruments) | 24 |
| Figura 15 - Nano Spray Dryer, Buchi B-90 | 35 |
| Figura 16 - Caperuza De Pulverización (Nano Spray Dryer) | 36 |
| Figura 17 - Nano Zetasizer Zs, Malvern | 37 |
| Figura 18 - Ultrasonido, Elma | 38 |
| Figura 19 - Torre De Recolección De Nanoesferas | 39 |
| Figura 20 - Ambientes De Humedad Relativa | 40 |
| Figura 21 - Microscopio Electrónico De Barrido | 41 |
| Figura 22 - Espectrofotómetro, Irapaffinity-1 | 41 |
| Figura 23 - Sistema De Liberación | 42 |
| Figura 24 - Multiskan Go, Thermo Scientist | 42 |
| Figura 25 - Alimentación Al Equipo Nano Spray Dryer | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 26 - Micrografías De Nanoesferas De A) Alginato, B) Pectina Y C) Quitosano..... | 49 |
| Figura 27 - Micrografías De Nanoesferas De A) Alginato + Riboflavina; B) Pectina + Riboflavina; C) Quitosano + Riboflavina..... | 49 |
| Figura 28 - Micrografía De Alginato-Quitosano | 50 |
| Figura 29 - Micrografía De Alginato-Quitosano Incorporando Riboflavina..... | 50 |
| Figura 30 - Micrografía De Pectina-Quitosano | 51 |
| Figura 31 - Micrografía De Pectina-Quitosano Incorporando Riboflavina..... | 51 |
| Figura 32- Tamaño De Nanoesferas | 52 |
| Figura 33 - Micrografías De Alginato | 53 |
| Figura 34 - Micrografías De Pectina..... | 53 |
| Figura 35 - Micrografías De Quitosano | 54 |

INDICE DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| Gráfica 1 - Tamaño De Nanoesferas..... | 45 |
| Gráfica 2 - Alginato-Quitosano; Variación De Cargas Electrostáticas En Función Del Ph..... | 47 |
| Gráfica 3 - Pectina-Quitosano; Variación De Cargas Electrostáticas En Función Del Ph..... | 47 |
| Gráfica 4 - Espectrofotómetro De Alginato-Quitosano..... | 55 |
| Gráfica 5 - Espectrofotómetro De Pectina-Quitosano..... | 56 |
| Gráfica 6 - Curva De Liberación De Riboflavina En Una Matriz De Alginato..... | 57 |
| Gráfica 7 - Curva De Liberación De Riboflavina En Una Matriz De Pectina..... | 58 |
| Gráfica 8 - Curva De Liberación De Riboflavina En Una Matriz De Quitosano..... | 58 |
| Gráfica 9 - Curva De Liberación Riboflavina En Una Matriz De Alginato-Quitosano..... | 59 |
| Gráfica 10 - Curva De Liberación De Riboflavina En Una Matriz De Pectina-Quitosano..... | 60 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1 - Equipos Utilizados Y Sus Características | 33 |
| Tabla 2 - Combinaciones Propuestas | 39 |
| Tabla 3 - Diseño Factorial De Experimentos De Con 3 Variables | 44 |
| Tabla 4- Comparación Del Tamaño De Partícula Obtenido Por Otros Autores..... | 45 |
| Tabla 5 - Velocidad De Liberación De Riboflavina En Matrices De Alginato, Pectina Y Quitosano . | 60 |

INTRODUCCIÓN

Para la mayor parte de la historia civilizada, no hubo diferencias claras en la forma en que se consumen alimentos y medicinas. Hasta la fecha, la administración oral sigue siendo la vía preferida de administración del fármaco, especialmente para terapias crónicas donde se requiere la administración repetida. La administración oral ofrece a los pacientes menos dolor, mayor comodidad, mayor probabilidad de cumplimiento y reducir el riesgo de contagio de infecciones y lesiones por pinchazo. Por lo tanto, las formulaciones de administración oral de fármacos siguen dominando más de la mitad del mercado. Como resultado, las nuevas estrategias de administración de fármacos han sido desarrolladas para superar los obstáculos encontrados por la administración oral. Se han formulado diferentes vehículos de entrega a partir de polímeros sintéticos y naturales.

A partir de ello se proponen nuevas tecnologías de encapsulación tanto en tamaño micro como nano, teniendo en cuenta las diferentes técnicas que se han desarrollado para ser usadas en sistemas de liberación tanto prolongadas como instantáneas. La nanotecnología es la base de técnicas innovadoras para el transporte de fármacos con beneficios potenciales para el paciente. Ha sido difícil entre los expertos llegar a una definición consensuada acerca de la nanotecnología, sin embargo, se puede decir que es una ciencia que abarca productos, procesos y propiedades a una escala nano/micrométrica, en donde la física, la química y la biología convergen para crearla (Andueza, 2012). El secado por atomización ha sido una tecnología ampliamente usada por la industria debido a su reproducibilidad y economía. Su aplicación principal es utilizada para enmascarar sabores, aromas y la encapsulación de vitaminas (Lupo et al., 2012).

Los materiales de la matriz son denominados, material de revestimiento, pared, cápsula, membrana, portador o cáscara, estos pueden ser constituidos de gomas, proteínas, azúcares, polisacáridos naturales y modificadas, lípidos y polímeros sintéticos. (Martins et al., 2014, Cerón, 2012) Este depósito puede ser lipófilo o hidrófilo de acuerdo con el método de preparación y las materias primas (Mora-Huertas et al., 2010, Vrignaud et al., 2011) por este motivo serán utilizados materiales polisacáridos para la matriz ya que al ser absorbidos cuentan con componentes de grupos de sustancias vitales (Morrison and Boyd, 1998), se aplican como agentes para la alimentación y como encapsulantes farmacéuticos (Estevinho et al., 2013). Proponiéndose de esta manera al Alginato, Pectina y Quitosano para formar la matriz encapsulante, esto debido a sus propiedades de estructura, flujo, textura y estabilidad de sistemas alimenticios (Porras, 2012).

1. ANTECEDENTES

En el presente capítulo se presenta la bibliografía relevante consultada para el desarrollo del presente proyecto. Se revisaron las técnicas de encapsulación disponibles, sus ventajas, importancia y aplicación en la industria farmacéutica y de alimentos. Asimismo, se presenta una revisión de los principales polímeros sintéticos y naturales empleados para la encapsulación de compuestos activos, profundizando en los biopolímeros de Quitosano, Alginato de Sodio y Pectina, ampliamente utilizados por su biocompatibilidad, biodegradabilidad e inocuidad para proteger diversos compuestos activos. Entre los principales principios activos se encuentran: antioxidantes, vitaminas, aminoácidos, minerales e incluso moléculas como células, enzimas, microorganismos y probióticos con beneficios para la salud, incluyendo citostáticos, antiinflamatorios, péptidos y hormonas. Finalmente, se incluye un resumen de las principales técnicas empleadas para la caracterización de nanoestructuras: Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopía FT-IR y UV-Vis y Potencial Z.

1.1 ENCAPSULACIÓN

La encapsulación se ha definido como el aislamiento de compuestos activos que pueden interactuar con otros componentes, sin embargo, también tiene la finalidad de proteger el compuesto o sustancia encapsulada del calor, la humedad, el aire, la luz y el oxígeno, contribuyendo a la vida útil del producto y promoviendo su liberación controlada (Cerón, 2012). El sistema de liberación controlada de estos encapsulados se hace por variando las condiciones del medio: modificando el pH, la temperatura, la actividad enzimática, el estrés mecánico, etc. (Gouin, 2004).

Los métodos de encapsulación son adecuados para la formulación de una amplia gama de productos funcionales, esto se da a partir de la microencapsulación, destacando la incursión con el papel carbón en 1940.(Fanger, 1974). En tecnología de los alimentos, por ejemplo, la encapsulación se emplea también para enmascarar sabores desagradables (Gouin, 2004), protegiendo los componentes activos, células o microorganismos, sensibles al calor, al pH, al oxígeno y a la luz, factores a los que son expuestos los alimentos durante su procesamiento y su almacenamiento (Lupo et al., 2012).

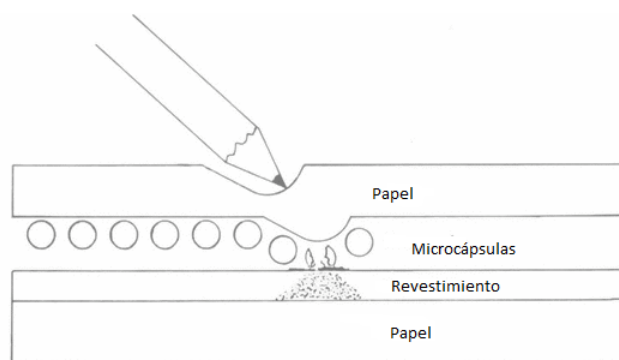


Figura 1 - Papel Carbón (Fanger, 1974)

Un material de recubrimiento o agente encapsulante se define como un material o compuesto que forma una capa delgada sobre una superficie. Esta capa puede ser orgánica, inorgánica o una combinación de ambas. Las cubiertas orgánicas, en general, contienen pigmentos, extensores y otros aditivos como catalizadores, absorbentes, modificadores y antioxidantes. Los materiales de recubrimiento se emplean para proteger una molécula o principio activo de la humedad atmosférica, luz ultravioleta, etc, así como para decorar las pinturas. El material de cubierta o encapsulante debe poseer propiedades “funcionales” específicas: degradables, antibacterianos, anticorrosivos (Castañeda et al., 2011).

1.1.1 MICROENCAPSULACIÓN

La microencapsulación, desarrollada aproximadamente hace 60 años, se define como una tecnología de envasado de sólidos, líquidos, o materiales gaseosos en cápsulas selladas del orden de micras que pueden liberar su contenido bajo condiciones controladas (Martins et al., 2014, Islas, 2012, Cerón, 2012). Los materiales que se van a envasar pueden ser puros o una mezcla de diferentes compuestos, que también son denominados material del núcleo o sustancias activas. Los materiales de la matriz son denominados, material de revestimiento, pared, cápsula, membrana o portador, estos pueden ser: gomas, proteínas, azúcares, polisacáridos naturales y modificados, lípidos y polímeros sintéticos (Martins et al., 2014, Cerón, 2012).

Se sabe que muchos alimentos, tales como jugos, zumos de frutas, vegetales y compuestos farmacológicos, fácilmente pierden su actividad biológica por oxidación, cuando se exponen al ambiente. Esta situación sugiere la necesidad de aplicar técnicas que impidan esta degradación o reducir los efectos del envejecimiento de las células (Castañeda et al., 2011).

Dependiendo del método de encapsulación las estructuras desarrolladas tienen diferentes morfologías. Las formas más comunes son las cápsulas con un núcleo en el centro y esferas sólidas (Vemmer and Patel, 2013). La forma específica dependerá de varios factores: la tecnología de proceso empleada, el núcleo o el compuesto activo y los materiales empleados para construir la pared de la estructura.

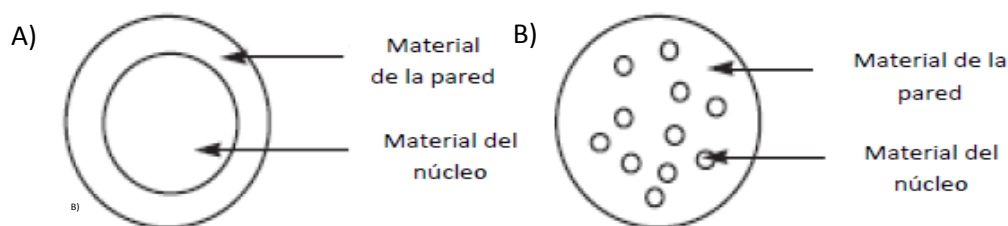


Figura 2 - Formas principales de encapsulación: A) cápsula mononuclear y B) agregados) - (Cerón, 2012)

En general las técnicas de encapsulación, conllevan a tres aspectos:

- La formación de la pared alrededor del material a encapsular.
- Asegurar que no ocurran fugas indeseadas.
- Asegurar que los materiales no deseados se mantengan fuera de la cápsula.

Para la producción de microcápsulas han sido propuestos varios métodos, con el fin de ser adaptado a diferentes tipos de materiales de núcleo y cubierta, así como, para generar partículas con diferentes tamaños, grosor de la cáscara y de la permeabilidad (Martins et al., 2014).

1.1.1.1 TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN

Existen diferentes técnicas para la realización del proceso de microencapsulación

- Procesos físicos:

Secado por atomización, extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado y separación por suspensión rotacional.

- Procesos físico-químicos:

Coacervación simple o compleja, liposomas y gelificación iónica.

- Procesos químicos:

Inclusión molecular, polimerización interfacial y co-cristalización (Vega, 2011).

Entre los que destacan:

-Polimerización interfacial

En este proceso se produce la polimerización de un monómero en la interfase de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana, que dará lugar a la pared de la microcápsulas. Este proceso tiene lugar en tres pasos:

1. Dispersión de una solución acuosa de un reactante soluble en agua, en una fase orgánica para producir una emulsión agua en aceite.
2. Formación de una membrana polimérica en la superficie de las gotas de agua, iniciada por la adición de un complejo soluble en aceite a la emulsión anterior.
3. Separación de las microcápsulas de la fase orgánica y su transferencia en agua para dar una suspensión acuosa. La separación de las microcápsulas se puede llevar a cabo por centrifugación (Villena et al., 2009, Larrasilla et al., 2010, Lizama, 2005).

-Coacervación

Es un método físico-químico que se basa en la separación de fases, consiste en tres pasos:

1. Formación de un sistema de tres fases químicamente inmiscibles (una fase líquida o fase continua, un material a recubrir y un material de cobertura o de pared).
2. Deposición del material polimérico líquido que formará la cubierta sobre el material a cubrir.
3. Solidificación de la cubierta (Villena et al., 2009, Villamizar and Martínez, 2009, Lizama, 2005).

-Liposomas

Los liposomas son partículas microscópicas formadas por dos fases: una fase lipídica y otra fase acuosa. Son estructuras compuestas de una bicapa de lípidos que engloban un volumen acuoso. Se elaboran con moléculas anfifílicas que poseen sitios hidrofóbicos, por ejemplo, fosfolípidos como la lecitina. En la fase acuosa, se coloca el material a encapsular cuando es hidrofílico o bien se agrega en el solvente orgánico donde se disuelven los fosfolípidos, si es lipofílico (Villena et al., 2009, Lopretti et al., 2011, Clavijo et al., 2007, Gómez, 2005).

-Gelificación iónica

Existen dos técnicas de gelificación:

Gelificación externa:

En la gelificación externa, la sal de calcio soluble es agregada en el seno de una emulsión. Una de las ventajas de esta técnica es que el tamaño de partícula no puede ser controlado y las partículas tienden a coagular en grandes masas antes de adquirir la consistencia apropiada. Además, la distribución del tamaño de partícula es heterogénea con intervalos entre 400 μ m y 1mm (Lupo et al., 2012, Villena et al., 2009).

Gelificación interna:

La gelificación interna se basa en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio. Esto se lleva a cabo por acidificación de un sistema aceite-ácido soluble, con participación en la fase acuosa del Alginato. Esta técnica permite obtener partículas de un tamaño de aproximadamente 50 μ m (Villena et al., 2009, Lupo et al., 2012).

-Encapsulación por extrusión

La técnica consiste en la formación de gotas de la solución de Alginato que contiene el componente a encapsular al hacer pasar dicha solución por un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de goteo controlado (Lupo et al., 2012, Lopretti et al., 2011, Flores and Jiménez, 2013).

-Encapsulación en emulsión

La técnica de encapsulación en emulsión se define como el proceso de dispersión de un líquido en otro líquido inmiscible donde la fase dispersa consta de la matriz que incluye el componente a encapsular. La adición de un surfactante mejora la formación y estabilidad de la emulsión, así como la distribución de tamaño de las gotas (Lupo et al., 2012, Flores and Jiménez, 2013).

-Encapsulación mediante secado por aspersión

El secado por aspersión ha sido una tecnología ampliamente empleada por la industria debido a su reproducibilidad y economía. Su aplicación principal es enmascarar sabores, aromas y la encapsulación de vitaminas (Flores and Jiménez, 2013). El procedimiento consiste en la preparación de una emulsión o suspensión que contenga al compuesto a encapsular y el material polimérico, el cual es pulverizado sobre un gas caliente que generalmente es aire promoviendo así la evaporación instantánea del agua, permitiendo que el principio activo presente quede atrapado dentro de una película de material encapsulante (Lupo et al., 2012, Flores and Jiménez, 2013).

La técnica de secado por aspersión es una de las técnicas más importantes de microencapsulación, debido a que existe mucha demanda para el control y liberación de las sustancias en alimentos, fármacos y microorganismos. Entre los materiales encapsulantes empleados con esta técnica se encuentran: la goma arábiga, agar, alginato de sodio, carragenina, carbohidratos almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz, celulosas, carboximetil-celulosa, derivados de la celulosa: metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa, lípidos, ceras, parafinas, triestearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas, (Vega, 2011) proteínas (gelatina, caseinatos, suero de leche, zeína) (Islas, 2012) gluten gnetina, albúmina, materiales inorgánicos como sulfato de calcio, silicatos.

En realidad existe una gran cantidad de materiales de recubrimiento que pueden usarse para encapsular las sustancias químicas o sustancias farmacéuticas, y no solo eso, sino que se pueden encapsular otros tipos de materiales como las sustancias microbiológicas y alimenticias (Vega, 2011).

1.1.2 NANOENCAPSULACIÓN

Nano, deriva de la palabra griega nanos, que significa enano o extremadamente pequeño. La nanotecnología se caracteriza por ser un campo esencialmente multidisciplinar y cohesionado exclusivamente por la escala de la materia con la que se trabaja (Pinzon, 2010).

En general, las nanopartículas se definen como partículas coloidales sólidas, de acuerdo al proceso de formación empleado pueden obtenerse nanoesferas y las nanocápsulas, esto en función de su morfología. (Rao and Geckeler, 2011, Mora et al., 2010). Las nanoesferas tienen estructuras homogéneas, matriciales en la que los medicamentos se dispersan de manera uniforme. Las nanocápsulas, son las que muestran una estructura núcleo-cápsula. La formulación de nanopartículas implica ciertos desafíos porque es importante tener una distribución de tamaño homogéneo, la morfología, el objetivo terapéutico de la administración del fármaco, la biocompatibilidad del polímero y la compatibilidad de las propiedades fisicoquímicas del agente bioactivo (Li et al., 2010). Las nanopartículas son sistemas poliméricos submicrónicos ($< 1\mu\text{m}$). (Sáez et al., 2004).

Las nanoesferas son partículas donde toda la masa es sólida y las moléculas pueden ser adsorbidas en la superficie de la esfera o puede estar encapsulado dentro de la partícula, en general, son esféricas, pero el término "nanoesfera" no hace referencia necesariamente a una morfología totalmente esférica. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares, actuando como una especie de depósito, en el que las sustancias atrapadas se limitan a una cavidad que consta de un núcleo líquido (aceite o agua) rodeado por una cáscara de material sólido, como se representa en la Figura 3. (Rao and Geckeler, 2011).

Entre los principales métodos de preparación podemos citar: nanoprecipitación, emulsión de difusión, doble emulsión, emulsión-coacervación, revestimiento de polímero y la capa por capa (Mora et al., 2010).

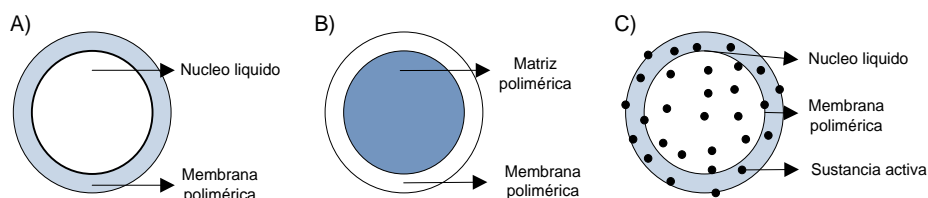


Figura 3 - Nanoestructuras: A) núcleo líquido, B) matriz polimérica y C) sustancia activa (Mora et al., 2010)

Las nanopartículas poliméricas se han estudiado ampliamente como vehículos de fármacos en el campo farmacéutico y diferentes equipos de investigación han publicado análisis sobre los mecanismos de formación de nanopartículas, la clasificación de los sistemas nanoparticulados y las técnicas para la preparación de nanocápsulas (Mora et al., 2010).

1.1.2.1 SECADO POR ASPERSIÓN

También llamado secado por aspersión o pulverización. Esta técnica fue empleada inicialmente en la industria de los alimentos, se emplea para mejorar el sabor de aceites (Gouin, 2004), el secado se emplea como proceso continuo y escalable para convertir líquidos (solución, emulsiones, suspensiones) en polvos sólidos, (Büchi, 2006, Li et al., 2010, Schafroth et al., 2012) como: leche, café, huevo tomate y glucosa (Maupoey et al., 2001).

Las áreas de aplicación en las que incursiona esta metodología son: suspensiones de nanopartículas/nanoemulsiones, micro y nanoencapsulación, aglomeraciones de nanopartículas, modificaciones estructurales, generación de nanopartículas con grandes tasas de recuperación y secado por pulverización de muestras en disolventes orgánicos y no orgánicos (Büchi, 2006).

En la Figura 4 (Büchi, 2006) se muestra el equipo Nano Spray Dryer por el cual se hace el secado por aspersión a escala nanométrica, se destaca las partes del sistema para la elaboración de las nanopartículas.

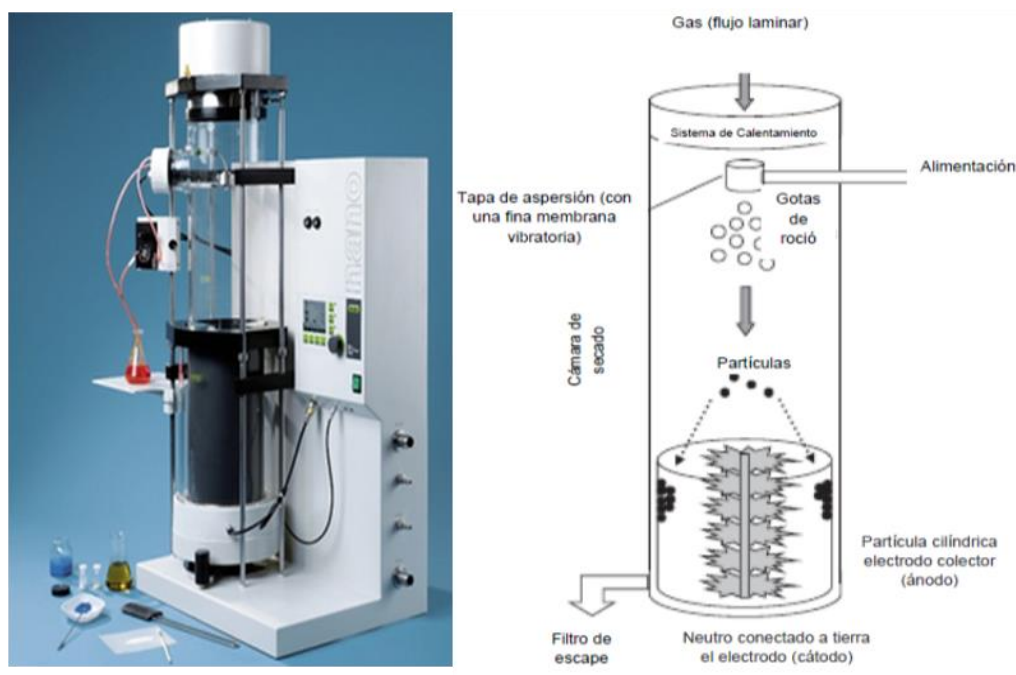


Figura 4 - Nanospray Dryer B-90 - Manual NanoSpray Dryer

El secado por aspersión consiste en 4 etapas:

- Atomización.
- Contacto aire-gota.
- Evaporación.
- Recuperación del producto seco.

En este proceso un material de alimentación líquido es atomizado por un rociado de pequeñas gotas finas, entra en contacto con el gas de secado caliente a temperatura suficiente para la evaporación de la humedad, a medida que las gotas viajan por una cámara de secado, la humedad de éstas se evapora y se forma el producto sólido en forma de un polvo que se recupera manualmente en la torre de recolección (Cerón, 2012, Vemmer and Patel, 2013).

El tamaño de partícula de salida depende principalmente de la caperuza de pulverización a utilizar, cuenta con filtros de 4.0, 5.5 y 7.0 μm . (Büchi, 2006, Burki et al., 2011)

Diseñado para generar tamaños de partículas entre 300 nm y 5 μm (Burki et al., 2011, Büchi, 2006), este secador de pulverización cuenta con un microfiltro de pulverización para atomizar la solución produciendo millones de pequeñas gotas que se generan por segundo y las partículas secas son recogidas por un colector de partículas electrostáticas. Los parámetros controlables son la temperatura de entrada, el tamaño de la membrana que vibra en la tapa de pulverización, la velocidad de flujo del gas de secado, así como la velocidad de pulverización relativa (Burki et al., 2011, Cerón, 2012).

Mediante esta metodología se están encontrando cada vez más aplicaciones en el mercado farmacéutico (Schafroth et al., 2012), biotecnológico, materiales y nanotecnología (Büchi, 2006, Cerón, 2012).

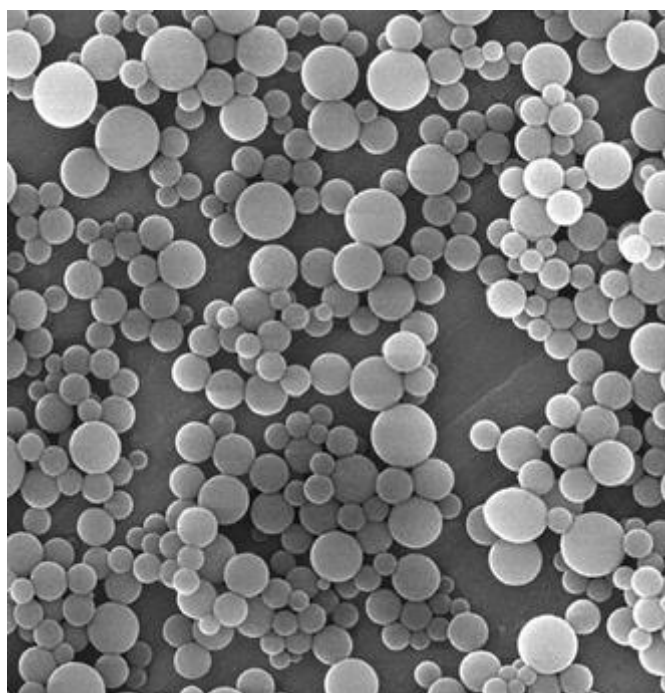


Figura 5 - Micrografía de nanoesferas

Las muestras de polvo son generalmente heterogéneas y amorfas. Los rendimientos globales de secado por atomización a escala de laboratorio son limitados, alcanzando alrededor del 50 al 70% (Li et al., 2010).

El interés relativo del uso de nanopartículas en lugar de sistemas a escala micrométrica en las aplicaciones farmacéuticas es su potencial para aumentar la tasa de absorción, mejorar la biodisponibilidad, habilitar la liberación de fármaco (Li et al., 2010). Las nanopartículas tienen la ventaja de almacenar pequeños volúmenes, altos rendimientos y pequeños tamaño de partículas (Schafroth et al., 2012).

1.1.2.1.1 APLICACIONES DEL SECADO POR ASPERSIÓN

Las nanopartículas a base de polímeros han demostrado ser muy útiles en el desarrollo de sistemas de liberación controlada. Estos materiales se pueden clasificar, según su origen, en naturales o sintéticos. Los polímeros naturales ofrecen grandes ventajas frente al uso de los polímeros sintéticos, como son su versatilidad, biodisponibilidad y menor costo (Fallic and Montero, 2012), se han estudiado ampliamente como vehículos en la industria farmacéutica para la liberación de medicamentos (Mora et al., 2010).

Especialmente en la industria de alimentos, secado por aspersión se utiliza para la preservación y la concentración de microorganismos (Vemmer and Patel, 2013).

- Micelas poliméricas de unos 30 nm. (Aquanova Alemania) para encapsulación de antioxidantes y suplementos (vitaminas, isoflavonas, β -caroteno, luteína, ácidos grasos omega-3) (Aquanova Novasol-Alemania).
- Microcápsulas para enmascarar sabor y olor a aceite de pescado (ácidos grasos omega-3) añadido al pan como ingrediente funcional (Tip-Top-Omega bread-Australia)
- Micelas para nanoencapsular fitoesteroles, reduce la ingesta de colesterol en un 14% (NSSL; Nutralease, Israel).
- Nanoceticals™ Slim Shake Chocolate: diminutas partículas diseñadas para vehicular chocolate puro para mejorar el sabor. (RBC Life Sci. Inc. USA).
- NANO B-12 Vitamin Spray Nanotech (Nutrition by Nanotec, LLC, USA) Nano gotas diseñadas para liberar la vitamina de forma controlada y constante.

Una desventaja de la tecnología de secado por pulverización la tecnología es el número limitado de materiales de cubierta disponible. Dado que casi todos los procesos de secado por aspersión en la industria alimentaria se llevan a cabo a partir de las formulaciones de alimentos acuosos, el material de la cubierta debe ser soluble en agua (Gouin, 2004). Entre los principales materiales encapsulantes se encuentran: goma acacia, maltodextrinas, almidón modificado hidrófobamente y mezclas de los mismos. Entre los polisacáridos más importantes podemos citar: Alginato, Carboximetilcelulosa, Goma Guar, Pectina, Quitosano (Li et al., 2010) y proteínas (suero de leche proteínas, proteínas de Soja, Caseinato de Sodio) (Burki et al., 2011, Gouin, 2004, Büchi, 2006, Cerón, 2012) como: Albumina (Madueño et al., 2011) y Cry (Batalla et al., 2011).

1.2 POLÍMEROS

Son el producto de la unión de cientos de miles de moléculas pequeñas (Griego: muchas partes), deben su gran tamaño al hecho de que, se encuentra formado por unidades simples, idénticas entre sí o al menos muy similares químicamente (Morrison and Boyd, 1998, Ramakrishna et al., 2010).

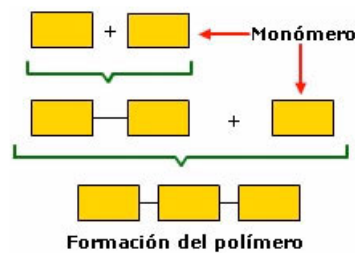


Figura 6 - Formación de Polímeros

Estas moléculas están formadas por cientos de miles de átomos por lo que sus pesos moleculares son muy elevados (Carey et al., 1999).

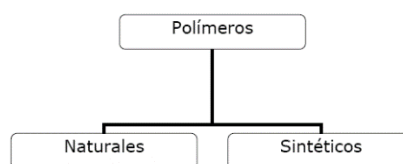


Figura 7 - Clasificación de Polímeros

Las diferencias entre los polímeros, incluyendo plásticos, las fibras y los elastómeros o caucho, vienen determinadas principalmente por las fuerzas intermoleculares (entre moléculas) e intramoleculares (dentro de cada molécula individual) y por los grupos funcionales presentes (Raimond and Charles, 2002).

1.2.1 POLÍMEROS SINTÉTICOS

Macromoléculas sintetizadas por el hombre, creadas a partir de elementos propios de la naturaleza para reemplazar las macromoléculas naturales como el caucho (utilizado para productos industriales, y el sedán, hoy en día se producen cientos de sustancias que no tienen análogos naturales, estos compuestos sintéticos incluyen; los elastómeros, que tienen la particularidad de elasticidad del caucho; las fibras, delgadas y largas como el hilo, con una gran resistencia a lo largo de la fibra que caracteriza el algodón, la lana y la seda; y plásticos que pueden ser moldeados a presión en forma de tubos o planchas, pintados en sus superficie o transformados en innumerables objetos (Morrison and Boyd, 1998).

Sin embargo muchos científicos dedicados a los polímeros manifestaron un talento especial para realizar descubrimientos empíricos antes de que esta ciencia se desarrollase. Charles y Nelson Goodyear transformaron el caucho del hevea, un material termoplástico pegajoso, en un elastómero de utilidad (caucho vulcanizado) o un plástico termoestable (ebonita) calentándolo con cantidades pequeñas o grandes de azufre, respectivamente. De la misma manera Schönbein combinaba celulosa con ácido nítrico, y Menard, en 1846, fabricaba colodión disolviendo nitrato de celulosa producto de la reacción anterior en una mezcla de etanol y éter etílico. El colodión, que se utilizó como líquido para engomar el tafetán, y también fue utilizado en la década de 1860 como reactivo por Parks y Hyatt, para obtener celuloide, fue el primer termoplástico artificial y el reactivo usado por Chardonnet para fabricar seda artificial (Seymour and Carraher, 1995).



Figura 8 - Polímeros Sintéticos

1.2.2 POLÍMEROS NATURALES

También llamados biopolímeros, son aquellos que componen grupos de sustancias vitales: los polisacáridos almidón y celulosa que nos proporcionan alimento, vestido y techo; las proteínas que forman parte importante del cuerpo animal, lo mantienen unido y lo hacen funcionar y los ácidos nucleicos que controlan la herencia a nivel molecular (Morrison and Boyd, 1998). La tierra, la vida misma se vale de polímeros naturales para hacer posible la vida.

Nuestros cuerpos están constituidos en gran parte por polímeros: DNA, RNA, proteínas e hidratos de carbono (Seymour and Carraher, 1995).

Se conocen como biopolímeros a los que son producidos por organismos de origen vegetal o animal, abundantes en la naturaleza y caracterizados por su diversidad. La interacción entre ellos es de fundamental importancia, esto a sus propiedades como son: estructura, flujo, textura y estabilidad de sistemas alimenticios. La formación de biopolímeros han demostrado ser efectivos en la estabilización mediante mecanismos estéricos y electrostáticos (Porrás, 2012).

Los polímeros más utilizados aplican como agentes para la alimentación y usos farmacéuticos encapsular son: Acetophthalate Celulosa, Alginato, Goma Arabiga, Quitosano, Ethyl Celulosa, Gelatina, Maltodextrina, Almidon, K-carragenina (Estevinho et al., 2013).

1.2.2.1 QUITOSANO

El Quitosano, es el segundo polisacárido más abundante (Kumar and Bristow, 2000), es un aminopolisacárido natural con estructura única de propiedad multifuncional, sobre todo en los campos de la biomedicina debido a sus propiedades físico-químicas y biológicas (Balan and Verestiuc, 2014) y en la industria farmacéutica, es utilizado en muchos campos debido a su inocuidad, biocompatibilidad, no inmunogenico y biodegradabilidad (Mostafa and Darwish, 2014, Ma et al., 2014, González et al., 2002).

Se obtiene de la N-desacetilación de la quitina bajo condiciones alcalinas. El Quitosano es el nombre general utilizado para un gran grupo de compuestos de Quitina desacetilado parcial o totalmente (Ma et al., 2014, Balan and Verestiuc, 2014). La quitina se obtiene de los exo-esqueleto de los crustáceos, tales como las conchas, las langostas, los camarones, insectos, y algunos hongos (Delgadillo, 2012, Balan and Verestiuc, 2014). La Quitina y el Quitosano no se encuentran presentes en los tejidos humanos (Carballo and Pedroza, 2011).

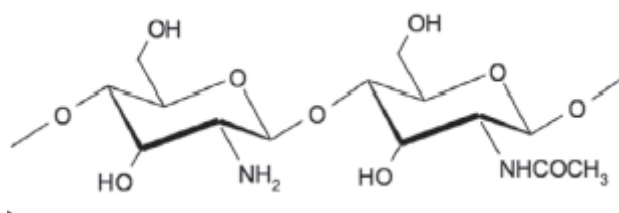


Figura 9 - Estructura química del Quitosano - (Jiang et al., 2014)

En cuanto a la solubilidad, el Quitosano es fácilmente soluble en soluciones ácidas diluidas ($\text{pH} < 6,0$). Cuando el pH aumenta por encima de 6, las aminas de Quitosano se desprotonan y el polímero se vuelve insoluble en agua. Desde el punto de vista químico, el Quitosano es un polielectrolito catiónico (en medio ácido), exhibe dos tipos de grupos funcionales reactivos (amino e hidroxilo) (Balan and Verestiuc, 2014).

Entre las ventajas de usar este polímero se puede mencionar que no es tóxico, es un producto natural, no causa alergia o reacción de irritación, su permeabilidad incrementa a medida que el pH decrece y tiene un sabor suave (Estevinho et al., 2013).

Se ha realizado investigaciones para su uso en aplicaciones médicas como la liberación de fármacos, piel artificial y anticoagulantes de sangre, cicatrización de heridas (Carballo and Pedroza, 2011, Mostafa and Darwish, 2014, Balan and Verestiuc, 2014).

Estudios actuales demuestra que el Quitosano se ha utilizado para aplicaciones biomédicas tales como: administración de fármacos, el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central y aplicaciones cardiovasculares (Balan and Verestiuc, 2014). En la industria se emplea de diferentes formas (películas, geles, partículas y membranas) para un gran número de aplicaciones, que van desde el campo biomédico (por ejemplo, la administración de fármacos, la ingeniería de tejidos) (Balan and Verestiuc, 2014), tratamientos de aguas residuales, para el tratamiento de tumores, aplicaciones antibacterianas e ingeniería de tejidos (Mostafa and Darwish, 2014, Balan and Verestiuc, 2014).

Se están haciendo estudios en la modificación química de Quitosano para mejorar su solubilidad y ampliar sus aplicaciones ambientales y biomédicas (Mostafa and Darwish, 2014).

1.2.2.2 ALGINATO DE SODIO

El Alginato es un biopolímeros polianiónico natural, no tóxico, biodegradable, biocompatible y sensible al pH, utilizado en la formación de micropartículas a través de la atracción electrostática, como vehículo para la entrega específica y de liberación controlada de fármacos de acuerdo con las propiedades de sus grupos carboxilo (Lacerda et al., 2014).

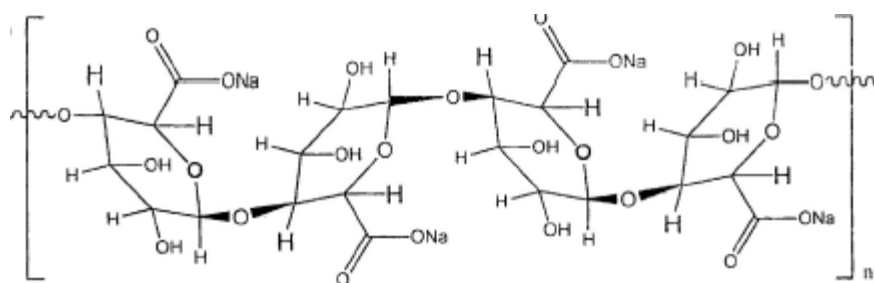


Figura 10 - Estructura química del Alginato de Sodio - (Aftab et al., 2014)

Es un copolímero lineal compuesto de dos unidades monoméricas β -1-4-enlazada ácido D-manurónico (M) y α -1-4-enlazada ácido L-gulurónico (G) (Aida et al., 2010, Wu et al., 2014, Rayment et al., 2009).

Es extraído de las algas marrones nativas en los que su función es la de dar fuerza y flexibilidad a los tejidos de algas. Se utiliza industrialmente por su facilidad de gelificación (usada para numerosas técnicas experimentales), propiedades de espesamiento y estabilización (Rayment et al., 2009).

Las ventajas de usar Alginato son: es un producto natural y la relativa facilidad de los trabajos en laboratorio. Como desventaja tiene un alto costo a escala industrial y tiene membranas porosas y permeables (Estevinho et al., 2013).

El Alginato y sus derivados sulfatados tienen diferentes actividades biológicas, tales como acciones antiinflamatorias y anticoagulantes (Wu et al., 2014).

En la ciencia, algunos de los principales usos de Alginato están en la ingeniería de tejidos, los estudios de transporte de medicamentos y los materiales de síntesis (Aida et al., 2010).

El Alginato ha sido ampliamente utilizado como encapsulante por el método de gelificación iónica (caja de huevos). (Lupo et al., 2012) Para la preparación de microcápsulas de Alginato de calcio con aplicaciones alimentarias, se tienen las técnicas por extrusión, en emulsión y secado por atomización. Aunque el secado por atomización ha sido para la industria un proceso práctico y económico, su aplicación con Alginato se ha visto limitada por la viscosidad y velocidad de gelificación del Alginato forma geles prácticamente independientes de la temperatura, aspecto que lo ha hecho atractivo en la elaboración de cremas, quesos, salsas, y aderezos. Sin embargo, la exposición prolongada a tratamientos de calor y variaciones extremas de pH degrada al polímero, presentado como consecuencia pérdidas en las propiedades del gel. El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de Alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ión calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica, como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel. El grado de gelificación depende de la hidratación del Alginato, la concentración del ión calcio y el contenido de los G-bloques (Lupo et al., 2012).

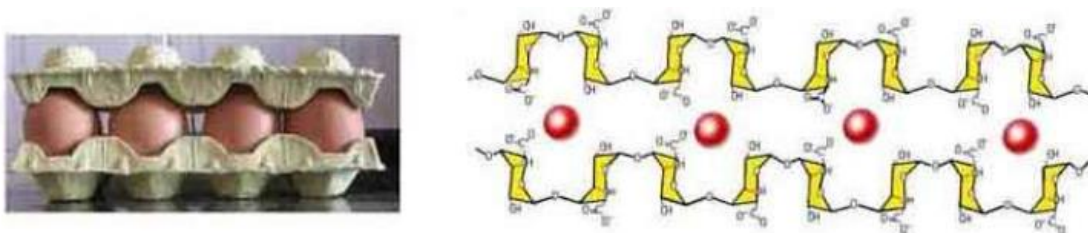


Figura 11 - Modelo estructural de la caja de huevo

Los geles de Alginato son usados ampliamente en alimentos. Recientemente, han sido utilizados como una matriz de inmovilización para el encapsulado de los biomateriales, y bacterias probióticas, así como otras aplicaciones de suministro controlado (Rayment et al., 2009). En el mercado la encontramos en productos como: leche, queso, helados, leche fermentada, postres congelados, zumos vegetales, salchichas (Lupo et al., 2012).

1.2.2.3 PECTINA

La Pectina es un polisacárido de origen natural, es un hidrato de carbono presente en el tejido de la pared celular vegetal (Rockwell et al., 2014, Seixas et al., 2014). La Pectina es un coloide reversible, puede ser disuelto en agua, precipitado, secado y redisolto en agua sin perder sus propiedades físicas (Grunauer, 2009). La Pectina es heterogénea con respecto a la estructura química y el peso molecular. Contiene grandes cantidades de poli (ácido D-galacturónico) a través de los enlaces α -1,4-glucosídicos (Shukla et al., 2011, Shpigelman et al., 2014, Chen et al., 2014).

Este polisacárido, contiene grupos carboxilo como parte de la estructura de ácido galacturónico, que pueden estar protonados (COOH) a $\text{pH} < 3$; en forma ionizada (COO⁻) a $\text{pH} > 3$, o esterificado como ester metílico o metoxilado (COOCH₃) (Grunauer, 2009).

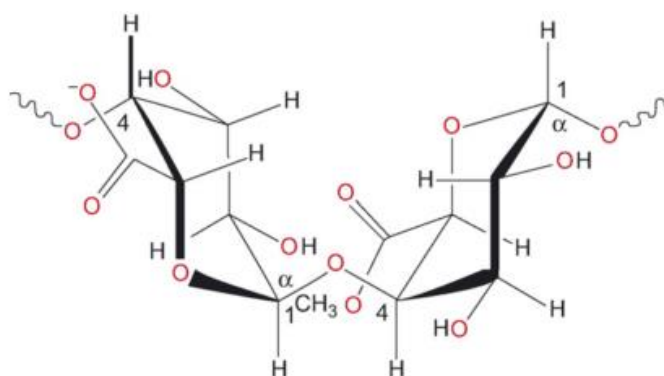


Figura 12 - Estructura química de la Pectina - (Le Gall et al., 2006)

La extracción de Pectina es un proceso físico-química de múltiples etapas en el que la hidrólisis y extracción de las macromoléculas de pectina de tejido de la planta y su disolución tienen lugar bajo la influencia de diferentes factores, principalmente la temperatura, el pH y el tiempo (Geng et al., 2014). La función principal del grupo Metoxílico es la formación del gel mediante su interacción con los otros componentes del medio en el cual se encuentre. Si existe carencia de este componente en la estructura del ácido Galacturónico, difícilmente puede gelificar. Las Pectinas de alto Metoxilo tienen la capacidad de formar geles en pH ácido (2.0–4.5), en presencia de sólidos solubles e incluso temperatura elevada (Grunauer, 2009).

La Pectina comercialmente disponible se extrae de diferentes fuentes vegetales dicotiledóneas que incluyen pulpa de manzana, la cáscara de los cítricos y la pulpa de remolacha (Rockwell et al., 2014).

Se encuentra en todas las frutas y la celulosa es responsable de su textura, se clasifican en Pectinas de alto Metoxilo (mayor al 50%) y bajo Metoxilo (25-45%). Las de alto Metoxilo forman geles no termorreversibles dependiendo de la cantidad de sólidos mayor al 60% y pH de 2.5 a 4. Las de bajo Metoxilo forman geles termorreversibles y este no depende del pH ni del contenido de sólidos solubles en los alimentos (Shukla et al., 2011). Por sus grupos $-NH_4$ (amino) es enzimáticamente degradable y puede modificarse químicamente en combinación con otros polímeros (Shukla et al., 2011).

Por su abundancia, costo, biodegradabilidad, solubilidad en agua, no toxicidad, la propiedad bioadhesiva, la complejidad de iones específicos y grupos funcionales reactivos y/o cargados, la Pectina representa un material natural atractivo para diversos usos en la industria biomédica, farmacéutica, electroquímica y reactiva (aplicaciones del dispositivo químico) (Shpigelman et al., 2014, Rockwell et al., 2014).

En el sector de alimentos la Pectina tiene una gama de productos que son procesados, desde jugos de frutas y vegetales, purés y pastas en los que la Pectina se origina a partir de la materia prima hasta productos tales como yogur, mermeladas (Shpigelman et al., 2014) y muchos otros donde se añade la Pectina como un espesante, estabilizador o agente gelificante (Geng et al., 2014, Shukla et al., 2011, Einhorn et al., 2014, Rockwell et al., 2014). Adquieren un uso potencial en la formulación de hidrogeles, películas, revestimientos para la liberación controlada de fármacos o como electrodos de iones específicos (Rockwell et al., 2014).

Tiene usos medicinales como: antidiarreicos, desintoxicación y reducción de la glucemia (Geng et al., 2014), en cuanto al procesamiento de alimentos de origen vegetal tiene como objetivo prolongar la vida útil, mientras que las propiedades sensoriales y nutricionales originales se mantienen. Además, el procesamiento se utiliza para aumentar la calidad comestible del producto (Shpigelman et al., 2014).

1.3 INTERACCIÓN DE BIOPOLÍMEROS

En solución, los biopolímeros presentan compatibilidad termodinámica (miscibilidad) cuando sus concentraciones son bajas. En concentraciones elevadas, las fuerzas atractivas y repulsivas entre las diferentes macromoléculas dan origen a que se presenten dos fenómenos opuestos: incompatibilidad termodinámica y formación de complejos.

La incompatibilidad termodinámica se da cuando existe una interacción repulsiva entre los biopolímeros provocando que exista una separación de dos fases, cada una de ellas abundante en una de las macromoléculas. La formación de complejos que pueden ser solubles e insolubles y se debe a interacciones atractivas en donde ocurre neutralización entre los grupos ionizables de ambas macromoléculas, provocando una disminución en la carga neta del sistema, a su vez, una disminución en la movilidad en las partes hidrofílicas, lo que puede o no generar separación (Porrás, 2012).

Se encuentra influenciado por el pH la distribución de los grupos ionizables sobre la superficie de los biopolímeros que interaccionan, de la flexibilidad y desdoblamiento de su estructura.

1.4 COMPUESTOS ACTIVOS

Las vitaminas son consideradas como compuestos orgánicos esenciales en el metabolismo y necesarios para el crecimiento, en general para el buen funcionamiento del organismo. Aunque se tenga una dieta rica en otros nutrientes, es necesario abastecer al organismo de cantidades adecuadas de vitaminas, así mismo, las vitaminas están relacionadas con la fusión de las enzimas, ya que inician y catalizan las reacciones químicas; sin embargo, se conoce claramente que varias vitaminas solo actúan en combinación con ciertas proteínas específicas y forman en este caso enzimas.

Algunas vitaminas forman complejos enzimáticos e intervienen en el metabolismo de los hidratos de carbono; ejemplo: vitamina B1 y B2 (Bustillo, 2008).

Las levaduras son organismos autónomos que poseen un metabolismo complicado y contienen un número de vitaminas como: B1 (tiamina), B2 (Riboflavina o Lactoflavina), B3 (factor de crecimiento de las aves), B4 (factor antiparalítico), B5 (vitamina entera), nicotinamida, ácido fólico, Inocitol, colina, y B-Caroteno. Las vitaminas de importancia para las levaduras son: B1, B2, B6, nicotinamida, ácido pantoténico, ácido fólico y la pro-vitamina D2 y D3 (Bustillo, 2008).

1.5 RIBOFLAVINA

La riboflavina es una vitamina soluble en agua (Yonezawa and Inui, 2013, Sugimoto et al., 2014, Patel et al., 2012) resistente al calor y la oxidación, estable en soluciones ácidas, pero inestable en soluciones alcalinas y es especialmente fotosensible (Aguilar and Gaona, 2012), no es tóxica (Allowances et al., 1980) y biocompatible (Fawzy et al., 2013). Es un factor de crecimiento esencial en los mamíferos, plantas y microorganismos (Sugimoto et al., 2014).

La Riboflavina llamada vitamina B2, Lactoflavina, Vitamina G, es la 6,7-dimetil-9-(1-D-ribitil)-isoaloxazina, su fórmula es $C_{17}H_{20}N_4O_6$ con un peso molecular de 376.36 g/mol, consiste en un anillo isoaloxacina heterocíclica adherido al alcohol del azúcar ribitol (Bustillo, 2008).

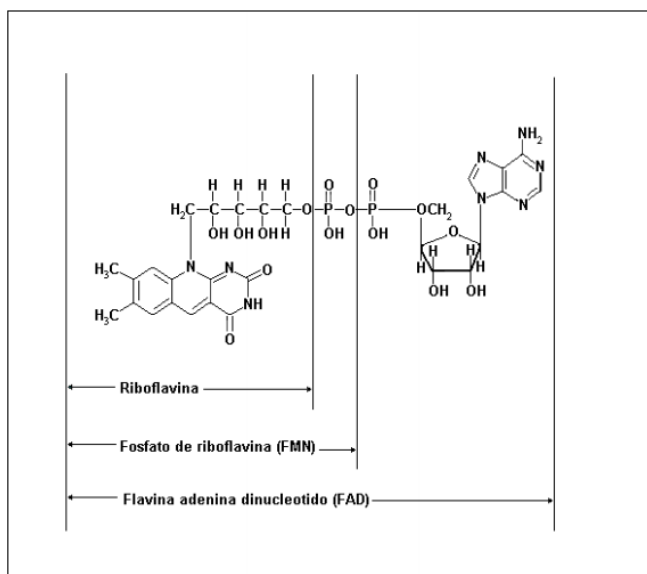


Figura 13- Estructuras químicas de Riboflavina y sus formas activas, FMN y FAD

Es un nutriente esencial para el cuerpo humano, ya que es una parte activa de las coenzimas flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN) (Lee et al., 2014, Sugimoto et al., 2014, Yao et al., 2013, Yonezawa and Inui, 2013, Sanches et al., 2014).

La Riboflavina es un polvo cristalino amarillo o amarillo anaranjado, que posee un leve olor, punto de fusión de 280°C, soluble en agua en una proporción de 5.5-33.3 mg en 100 ml. de agua; pero insoluble en acetona, cloroformo, etanol y benceno. (Bustillo, 2008).

Participan en varias reacciones de oxidación-reducción bioquímicas incluyendo el metabolismo de los hidratos de carbono, aminoácidos y lípidos (Yao et al., 2013). Esencial para el crecimiento y funciones celulares normales (Patel et al., 2012, Yonezawa and Inui, 2013). Proporciona energía al interior de las células, necesaria para producir enzimas decisivas en la liberación de la energía que tienen las grasas, los carbohidratos y las proteínas que ingerimos de los alimentos, vital para el crecimiento e importante en la reproducción celular y ayuda a producir glóbulos rojos sanos (Bustillo, 2008).

El hígado es el encargado de metabolizar la Riboflavina, el almacenamiento de ésta es escaso, por lo que se excreta a través de la orina y el sudor, así como por vía biliar y las glándulas mamarias (Aguilar and Gaona, 2012). El Dietary Allowances Committe del National Research Council recomienda ingestión de Riboflavina de 0.6 mg/1000 Kcal., que es equivalente alrededor de 1.6 mg/día para varones adultos jóvenes, y de 1.2 mg/día para mujeres adultas jóvenes. En ancianos se recomienda que el consumo no sea menor de 1,2 mg/día, incluso cuando la ingestión de calorías disminuye por debajo de 2,000 Kcal. (Bustillo, 2008).

Sin embargo, las principales barreras que impiden la aplicación comercial de la Riboflavina en la industria alimentaria son su alta sensibilidad a la luz tiene un fotoquímica compleja cuando se ve afectado por la luz. Esto es debido a su fácil degradación y oxidación. En consecuencia, la oxidación de lípidos fotosensibilizado por la Riboflavina se ha atribuido como el factor causal en el mal sabor de muchos alimentos (Lee et al., 2014).

En condiciones de estrés fisiológico y patológico, los seres humanos son susceptibles a desarrollar deficiencia de Riboflavina. Tal deficiencia en el embarazo y la adolescencia induce anomalías del desarrollo, y se ha señalado como un factor de riesgo para la anemia, cáncer, enfermedad cardiovascular, y la neurodegeneración (Yonezawa and Inui, 2013), ha demostrado tener propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes (Sanches et al., 2014).

La Riboflavina se utiliza en muchos tipos de aditivos alimentarios y en suplementos multivitamínicos como colorantes y/o nutrientes para la salud humana (Sugimoto et al., 2014), también se encuentra presente en una amplia variedad de alimentos (Sanches et al., 2014), la mayoría de origen vegetal y animal contienen pequeñas cantidades de riboflavina en forma de coenzimas digestibles. Sin embargo, las fuentes principales de esta vitamina son el huevo, la carne, la leche, la espinaca, la lechuga, los espárragos, la col, el brócoli, las leguminosas y los cereales adicionados. En México la Secretaría de Salud establece la adición de 3mg/kg de hidroclorehidrato de riboflavina a las harinas de trigo y maíz (Aguilar and Gaona, 2012).

En cuanto a la salud mantiene además, la buena salud de la piel, las uñas y el cabello. Así mismo ayuda al sistema inmunológico manteniendo en buen estado las membranas mucosas que forman el aparato respiratorio y el digestivo. Conserva además el estado de las superficies húmedas del cuerpo como los ojos, la boca, la lengua (Nutrition, 1978) y la vagina.

Ayuda durante el embarazo a evitar la malformación ósea y los trastornos en el desarrollo cerebral del feto. Beneficia también a los ojos, ya que oxigena la córnea y alivia la fatiga de éstos (Bustillo, 2008).

1.6 POTENCIAL Z

Es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial requerido para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla. Por es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula (Yoval et al.).

La medición del potencial zeta es una técnica que proporciona la información suficiente de la distribución de carga superficial en la interfase sólido/agua (Mantilla et al., 2008).

Cuando una superficie sólida está en contacto con una solución acuosa, la formación de una carga interfacial causa el re arreglo de los iones libres locales en la solución para producir una región muy delgada de densidad de carga neta diferente de cero que está cercana a la interfase. El arreglo de cargas en la interfase sólido-líquido y el balance de los iones de carga contraria a la superficie sólida es lo que se refiere a la doble capa eléctrica (Carballo and Pedroza, 2011).

Según el modelo de la doble capa eléctrica, se pueden asumir la existencia de dos capas en la vecindad de la interfase sólido/solución; una capa en la cual se presenta un decaimiento lineal del potencial eléctrico y que permanece fija aun cuando las partículas se muevan, y una capa difusa con decaimiento exponencial. Esto implica la existencia de un plano de referencia entre la capa fija y la capa difusa y justo el potencial se denomina Potencial Z, o potencial electrodinámico (Mantilla et al., 2008).

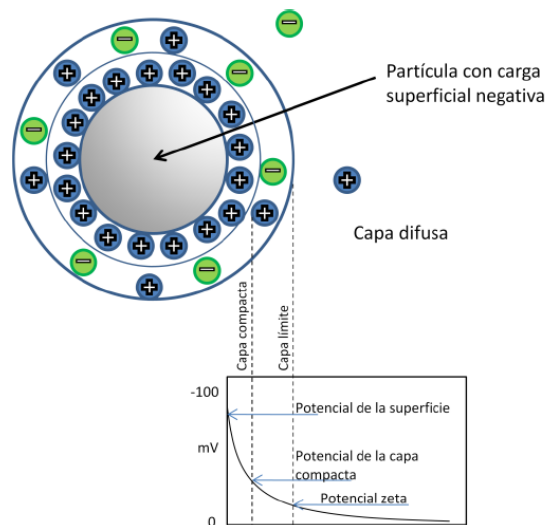


Figura 14 - Representación esquemática del potencial Z. (An introduction in 30 minutes” Malvern Instruments)

Cuando la concentración de ion determinante de potencia es tal que las actividades superficiales positivas y negativas son iguales. Esta concentración define el punto de carga cero o punto isoeléctrico y en el no hay doble capa eléctrica (Moreno et al., 1987).

Es en este sentido que el estudio del potencial superficial puede ser utilizado para la evaluación y conocimiento de los procesos de separación por flotación espumante (Mantilla et al., 2008).

Esta técnica se aplica a la industria de la fabricación de papel, la coagulación del agua y desagüe, productos de látex, comestibles, lácteos, químicos agrícolas, tecnología de polvos secos y tintes (Yoval et al.).

1.7 HOMOGENIZACIÓN

Uno de los objetivos más importantes de la homogenización es crear una solución dispersa la cual pueda producir compuestos uniformes e ideales según las necesidades previamente establecidas.

1.7.1 HOMOGENIZACIÓN POR ULTRASONIDO

Ultrasonido es un método que emplea ondas de alta intensidad que producen una fuerte cizalla y presión a través de una fase acuosa disminuyendo el tamaño el tamaño de gota debido a la cavitación y efectos de turbulencia (Porras, 2012). El método del ultrasonido en la ingeniería es utilizado para el ensayo de los materiales, es una técnica de ensayo no destructivo (Santos et al., 2005).

Emisión de ondas con un intervalo mayor que las frecuencias audibles (en general >20 kHz), e infrasonido, se refiere a ondas con frecuencia debajo de la audición humana y con intervalo audible de 20 Hz, hasta aproximadamente 20 Khz. El empleo del ultrasonido resulta seguro, no toxico y de bajo consumo energético (Kentish and Ashokkumar, 2011).

Las ondas sonoras son vibraciones mecánicas que viajan a través de un medio que puede ser un sólido, un líquido. En el método ultrasónico se utilizan instrumentos que transmiten ondas con ciertos intervalos de frecuencia y se aplican para detectar defectos como poros, fisuras, también para conocer las propiedades básicas de los líquidos y sólidos como la composición y estructura (Santos et al., 2005). En los últimos años las investigaciones sobre su uso en la industria alimentaria para el análisis y el procesamiento de los productos alimenticios ha aumentado considerablemente (Romero, 2009).

1.8 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)

SEM es un método para caracterizar morfológica, estructural y propiedades (Zorko et al., 2014) de la membrana en la superficie a una escala nanométrica, tanto cualitativamente (por ejemplo, la observación visual) y cuantitativamente (por ejemplo, tamaño de poro, poro forma y porosidad) (Syed Z. Abdullaha, 2014) las diversas técnicas de microscopía electrónica se ha convertido en un método de rutina en la ciencia de materiales y campos relacionados (Zorko et al., 2014).

Requerido para el estudio en ciencias biológicas y las ciencias de los materiales para examinar la topología y la composición elemental de la superficie del espécimen. Esta tecnología emplea un haz de electrones que explora a través de la superficie de la muestra en un patrón de trama.

Esta interacción emite radiación en forma de electrones y los rayos X que se procesan para formar una imagen de la superficie o para analizar la composición elemental de la muestra (Suga et al., 2014, Ezumi and Todokoro, 1999). En la preparación de muestras orgánicas se hace un recubrimiento de metal (Syed Z. Abdullaha, 2014).

Para la investigación relativa a los nanomateriales, es necesario observar la morfología y la composición de las muestras (Suga et al., 2014).

Como ventajas de este método de lectura microscópica es que no requieren extensa preparación de la muestra, no requieren ningún aplastamiento causando la destrucción mecánica de la muestra, permitiendo de este modo la información morfológica e información de la superficie (Suga et al., 2014).

1.9 ESPECTROFOTOMETRÍA FT-IR

Es evidente que el método de espectroscopia de infrarrojos, es un método rápido, no destructivo y no necesitan procedimientos complejos para la preparación de la muestra (Synytsya, 2003). Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier es un método adecuado para el seguimiento de los cambios químicos en las paredes celulares y, más específicamente los cambios en el grado de esterificación (Leal et al., 2008) y análisis de estructural (Synytsya, 2003).

La absorción de los diferentes tipos de grupos funcionales implicados (es decir, el grupo carboxilato de metilo y el grupo carboxilato) se encuentran en diferentes números de onda (Leal et al., 2008). El método de espectroscópico FT-IR es una herramienta valiosa no destructivas de análisis cualitativo (Synytsya, 2003) y cuantitativo (Leal et al., 2008, Ravin, 2000). Estos métodos espectroscópicos de vibración pueden ser también aplicadas en la detección de componentes menores integrados en la estructura de las muestras de pectina tales como proteínas, azúcares neutros o compuestos fenólicos (Synytsya, 2003).

1.10 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

En la caracterización de las nanoesferas se lleva a cabo un estudio de la estabilidad a la humedad, que llega a ser predominante en las condiciones de almacenamiento que se le va a dar a las muestras.

En el estudio, las muestras se colocaron en desecadores que contenían diversas soluciones de sal saturada a generar niveles deseados de humedad relativa, que van desde 33 hasta 93% de humedad relativa (Kuu et al., 1998, Kim et al., 2014).

De esta manera se obtiene el análisis del efecto a la humedad y la estabilidad de las nanoesferas bajo las condiciones de humedad que se le da (Kuu et al., 1998). Eso en cuenta hablamos a la estabilidad a la humedad, También se describen estudios de estabilidad microbiología en la que toman en cuenta la actividad acuosa (a_w) y el pH como entornos de resistencia (Trujillo et al., 2001)

1.11 LIBERACIÓN DEL ACTIVO

La liberación controlada está definida como el método mediante el cual uno o más agentes activos estarán disponibles en un sitio y/o tiempo determinado a una velocidad específica (Rodríguez, 2013).

Las sustancias poliméricas son la base de la formación de sistemas que controlan la liberación (Ramos et al., 2000), (Rodríguez, 2000). Una de las limitaciones que presenta la forma de liberación controlada se encuentra en su permanencia en el lugar de absorción o de acción durante un tiempo suficiente, es decir, poder localizarlas en un lugar concreto del organismo (Rodríguez, 2000).

Cuando se maneja un sistema de liberación controlada, el agente bioactivo es incorporado a un soporte que generalmente es un material polimérico o una combinación de varios (Ramos et al., 2000).

En el caso de nanoesferas, en las que el fármaco se encuentra uniformemente distribuido, su liberación se produce por difusión a través de la matriz degradable o de la degradación de la matriz. Si la difusión de la droga es más rápida que la degradación de la matriz, entonces el mecanismo de liberación es en gran parte controlado por un proceso de difusión. La liberación rápida se atribuye principalmente al débil enlazamiento o a la adsorción de los fármacos a la superficie, relativamente grande, de las nanopartículas (Oropesa and Jáuregui, 2012).

2 JUSTIFICACIÓN

La encapsulación es un proceso ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y de alimentos para proteger a una gran variedad de compuestos activos de interés, de factores ambientales como: pH, humedad, aire, luz, oxígeno; permitiendo aumentar la vida media de los productos.

Entre las diferentes técnicas de encapsulación destacan: secado por aspersión, extrusión, polimerización interfacial, gelación iónica, entre otros. Las técnicas anteriores se han empleado para producir micropartículas con tamaños que oscilan entre unos pocos milímetros. Sin embargo, actualmente se han desarrollado y adaptado estas técnicas para la producción de estructuras a escala “nano”. Las estructuras a escala nano han probado su efectividad en una gran variedad de áreas, entre las que se encuentran: tratamientos dirigidos para enfermedades crónicas, como cáncer; ingeniería de tejidos, biosensores, etc. Una de las ventajas que ofrecen este tipo de nanoestructuras es el aumento entre el área superficial de la nanopartícula con respecto a su volumen, mostrando una mayor reactividad al compararlas con las micropartículas.

En este contexto, cuando se trabaja con nanoestructuras, es posible que la información que se tiene del comportamiento de los materiales a nivel micro no sea válida. Por tal razón, un estudio detallado debe realizarse para analizar las propiedades morfológicas y fisicoquímicas de los materiales de cubierta: estabilidad, resistencia y funcionalidad cuando son expuestas a diferentes condiciones ambientales. Los principales materiales reportados, que serán estudiados en este trabajo son Quitosano, Alginato y Pectina, por sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad.

Con respecto al material activo a encapsular se tienen también diferentes opciones: antioxidantes, saborizantes, colorantes, proteínas, enzimas y vitaminas (hidrosolubles y liposolubles), por citar algunos. Cada ingrediente activo se comporta de forma diferente y es necesario crear un traje a su medida para protegerlo de los factores ambientales que puedan causar su degradación o descomposición. Por la importancia que tiene en el mantenimiento y buen funcionamiento de la piel, mucosas y la visión, además de participar en la síntesis de otras vitaminas, la vitamina B2 o Riboflavina fue seleccionada como molécula modelo en este trabajo.

La Riboflavina es altamente sensible a la luz por lo que es vital protegerla o encapsularla, para evitar su degradación en compuestos con baja funcionalidad para el organismo, dos de sus productos de fotodegradación principales son: la lumiflavina (LF) y el lumichrome (LC). Se transforma en LC al ser irradiada con rayos γ o luz UV, también en soluciones neutras o ácidas, y en LF en soluciones alcalinas (Pan et al., 2001). La longitud de onda a la que se promueve la degradación esta vitamina es de 445 nm con un 79,9 % de degradación tras 20 min de exposición a la luz.(Gallardo, 2011). Podemos encontrarla en alimentos como huevo, cereales y carnes entre otros.

Para la producción de nanoesferas, se utilizó un secador comercial el “Nano Spray Dryer Büchi B-90”, que permite obtener nanopartículas con tamaños homogéneos a escala piloto.

En general, esta investigación proporcionará información sobre el proceso de secado por aspersion a escala nano y la resistencia de los biopolímeros Quitosano, Alginato y Pectina para ser empleados como vehículos para la liberación controlada de la vitamina B2 a nivel nano.

3 OBJETIVOS

3.1 General

Estudiar la interacción existente entre biopolímeros para la encapsulación, caracterizar las propiedades que se adquieren en su formación y estudiar la liberación de Riboflavina.

3.2 Particulares

- Encapsular la Riboflavina en una matriz polimérica por la técnica de secado por aspersión.
- Evaluar la influencia de las variables de síntesis en la eficiencia de la encapsulación.
- Evaluar el tamaño, morfología y la homogeneidad en la formación de las nanoesferas.
- Estudiar por medio de espectroscopia IR la interacción de los polímeros en la formación de nanoesferas.
- Estudiar la estabilidad de las nanoesferas a diferentes humedades relativas por microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Analizar la velocidad de liberación de Riboflavina a través de matrices biopoliméricas degradables.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se detallan los materiales con los que se realizó la experimentación y la metodología empleada para la formulación de nanoesferas de Riboflavina encapsuladas en matrices de Quitosano, Alginato, Pectina y una combinación de ambos Alginato-Quitosano y Pectina-Quitosano. Se incluye una breve descripción de la metodología empleada para la caracterización de las nanoestructuras y el estudio de la liberación de Riboflavina, para el cumplimiento de los objetivos planteados en el capítulo anterior.

4.1 MATERIALES

Los materiales utilizados para la nanoencapsulación de Riboflavina fueron: Alginato de Sodio proveniente de algas pardas, proporcionado por SIGMA S.A. DE C.V. (México). Pectina extraída de cítricos, proveniente de ICN Biomedicals, Inc. Quitosano de baja densidad, proporcionado por SIGMA S.A. DE C.V. (México). Ácido Acético Glacial (ACS), proporcionado por Fermont (Productos Químicos Monterrey S.A DE C.V.). Como compuesto activo se utilizó la Riboflavina (vitamina B2) de SIGMA S.A. DE C.V. (México).

4.2 METODOLOGÍA

A continuación en la Tabla 1, se muestra una lista de los equipos que se utilizaron para la experimentación, todos ellos se encuentran en instalaciones del Centro de Investigación de Tecnología Avanzada “CICATA”.

Tabla 1 - Equipos utilizados y sus características

| NOMBRE DEL EQUIPO | CARACTERÍSTICAS GENERALES |
|--|--|
| Espectrofotómetro FTIR | Nombre: espectrofotómetro FT-IR Modelo: IRAffinity-1 Marca: Shimadzu Fabricante: Japón Rango de operación: 350 - 7800 cm ⁻¹ |
| Nano Zeta Sizer | Modelo: nano ZS Marca: Malvern Instruments Fabricante: Estados Unidos Rango de operación: 0.3nm-10.0 microns* (diámetro) |
| Sonicador | Nombre: unidad de limpieza ultrasónica Modelo: D-78224 Marca: ELMA Fabricante: Alemania Rango de operación: 25-45 Hz |
| Potenciómetro | Nombre: pH/ion meter Modelo: 450 Marca: CORNING Fabricante: Estados Unidos Rango de operación: 0 – 14 pH |
| Microscopio electrónico de barrido(SEM) | Modelo: GEM6390LB Marca: GEOL Fabricante: Japón Rango de operación:50x-300,000x |
| Parrilla con agitación magnética | Modelo: Cimarec SP131325 Marca: Thermolyne Scientific Fabricante: Estados Unidos Rango de operación: Temperatura (a partir del ambiente +5°C hasta 540°C) velocidad (60rpm-1200rpm) |

| | |
|--------------------------|--|
| Balanza analítica | Modelo: Explorer Analítica Marca: OHAUS Fabricante: Estados Unidos Rango de operación: 0.0001 g-210 g |
| Micropipeta | Marca: Transferpette Fabricante: Alemania Rango de operación: 10 µL-100 µL |
| Nano Spray Dryer | Modelo: Büchi -90 Marca: Büchi Fabricante: Suiza Rango de Operación: 300 nm-5 µm |

4.2.1 EXPERIMENTACIÓN PREVIA

4.2.1.1 SECADO POR ASPERSIÓN

La metodología de formación de nanoesferas se realizó en el equipo Nano Spray Dryer B-90 de la marca BÜCHI presentado en la (Büchi, 2006), para la encapsulación de la vitamina B₂. El equipo Nano Spray Dryer tiene la capacidad de secar por pulverización soluciones y suspensiones acuosas empleando aire comprimido como gas de secado. Las partículas que salen del Nano Spray Dryer B-90 se encuentran entre 300 nm - 5 µm, con un tamaño de gota de 8 a 21 µm esto lo hace un instrumento adecuado para encapsular partículas y nanopartículas a partir de una solución o una suspensión. Cuenta con caperuzas (microfiltros) de 4.0, 5.5 y 7.0 µm. El equipo maneja 4 velocidades de flujo de la bomba, que varían desde 1.25-22 ml/min.



Figura 15 - Nano Spray Dryer, Buchi B-90

Se trabajó con un diseño de experimentos factorial de 2³, resultando así 8 experimentos. Se usaron las variables de temperatura (mínima y máxima de 80 y 120 °C, respectivamente) y la concentración de Alginato y Pectina (variando de 0.125 y 0.25 entre ambas, claramente tomando la misma cantidad de concentración en cada uno de los experimentos para cada uno de los compuestos) con caperuzas de pulverización de 4.0 µm y de 7.0 µm.

Toda la experimentación se procedió con una velocidad de bomba de 7.5 ml/min y un porcentaje de Spray de 90% que se mantuvo constante durante la experimentación.



Figura 16 - Caperuza de pulverización (Nano Spray Dryer)

Antes de comenzar la experimentación se alimentó el equipo con agua desionizada para su previa limpieza durante 10 min. Al finalizar la experimentación se desmontó el equipo Nano Spray Dryer en su totalidad y se limpió el cilindro de pulverización con agua destilada.

4.2.2 VENTANA DE INTERACCIÓN

4.2.2.1 POTENCIAL ZETA

Se realizó el análisis por la metodología reportada por Porras (2012). Dicho estudio nos da a conocer el valor de pH en el cual los biopolímeros alcanzan una mayor fuerza de atracción, lo que hará que la matriz de la nanoesferas sea resistente y compacta en cuanto a su estructura.

Para el ajuste de pH se usó como acidificador de solución a el ácido clorhídrico (HCL) concentrado y como solución base, hidróxido de sodio (NaOH) de 2.6N. El equipo para este proceso fue el potenciómetro CORNING pH/ion meter, modelo 450 (CORNING Instruments, U.S.A.).

El procedimiento fue realizado para dar lectura de las cargas que poseen las soluciones a distintos pH, estos valores son adaptados a una Figura que se nombra ventana de interacción, se realizó la interacción para cada coacervado (Alginato-Quitosano y Pectina-Quitosano), ambas descritas en Gráficas separadas y se determinó la valor de máxima interacción entre ambos biopolímeros, originada por sus cargas electrostáticas inversas.

En la experimentación llevada a cabo, se hizo una solución de cada biopolímero disuelta en agua desionizada; en Alginato se usó 0.5% (p/p), la Pectina en 0.2 % (p/p), en el caso del Quitosano se usó 0.1% (p/p) y 1% (v/v) de ácido acético para su disolución. El potencial Z tomo lectura de las soluciones preparadas, en cada una de ellas se varió el pH en un intervalo de 3 a 4. Las lecturas corresponden al equipo Nano Zetasizer ZS, (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) que correspondiente a la Figura 17.



Figura 17 - Nano Zetasizer ZS, Malvern

4.2.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN

A partir de los resultados, se asignaron las variables que favorecieron a la experimentación. Por consiguiente se realizaron soluciones de cada uno de los biopolímeros (Quitosano, Alginato y Pectina) en concentración de 0.125% por separado, para luego ajustar al pH de interacción de cargas inversas para una de las combinaciones (Alginato-Quitosano y Pectina-Quitosano).

4.2.3.1 TRATAMIENTO POR ULTRASONIDO

Con la solución homogénea de la combinación de los biopolímeros, se hace el tratamiento de ultrasonido para cada combinación, empleándose el equipo ultrasonido de marca ELMA (Figura 18). Las condiciones de uso fueron a una frecuencia de 25 kHz y tiempo de exposición de 5 minutos por solución.



Figura 18 - Ultrasonido, Elma

Como paso final se agregó la vitamina B₂, con una concentración de 0.185 mM, bajo este proceso se logra la solución preparada para la formación de nanoesferas.

4.2.4 FORMACIÓN DE NANOESFERAS

De la experimentación del equipo Nano Spray Dryer, se tomaron como variables de proceso aquellas que dieron un tamaño de partícula homogéneo. Es así como la formación de las nanoesferas se realizaron con una caperuza de 4.0 μm , temperatura de 120°C y concentraciones de alta viscosidad. Bajo estas condiciones se realizó la formación de las nanoesferas en distintas combinaciones de biopolímeros como indica la Tabla 2.

Tabla 2 - Combinaciones propuestas

| No. | Concentraciones (% p/v) | | | |
|-----|-------------------------|---------|----------|------------------|
| | Alginato | Pectina | Qitosano | Riboflavina (mM) |
| 1 | 0.25 | - | - | - |
| 2 | - | 0.25 | - | - |
| 3 | - | - | 0.125 | - |
| 4 | 0.125 | - | 0.125 | - |
| 5 | - | 0.125 | 0.125 | - |
| 6 | 0.25 | - | - | 0.185 |
| 7 | - | 0.25 | - | 0.185 |
| 8 | - | - | 0.125 | 0.185 |
| 9 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.185 |
| 10 | - | 0.125 | 0.125 | 0.185 |

Después de la formación de las nanoesferas, se desmontó la torre de recolección de partículas y se lavó con agua destilada para su limpieza, de la misma forma la caperuza llevó el proceso de limpieza en el equipo de ultrasonido.



Figura 19 - Torre de recolección de nanoesferas

4.2.5 CARACTERIZACIÓN, MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA

4.2.5.1 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Para este análisis, cada tipo de nanoesferas procesadas de un solo polímero fueron alojadas en ambientes herméticamente sellados con soluciones salinas que corresponden a diferentes humedades para el estudio de estabilidad. En la Figura 20 **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los desecadores en los que se colocaron las nanoesferas de Quitosano, Alginato y Pectina, allí fueron hidratadas mediante la exposición a distintas humedades relativas de 33, 75 y 93%. La duración de este proceso para la lectura en el microscopio SEM fue de 24 horas.

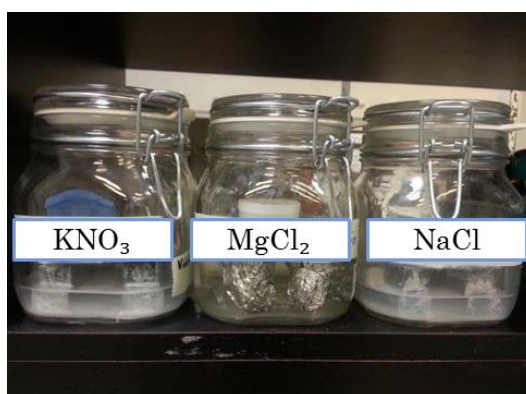


Figura 20 - Ambientes de humedad relativa

De la misma forma se hizo el estudio de las nanoesferas compuestas de Alginato-Quitosano y Pectina-Quitosano bajo las mismas condiciones.

4.2.5.2 ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)

La lectura de imagen y el tamaño de nanoesferas fueron visualizadas y obtenidas usando un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL modelo LV6300 con detector de rayos X Oxford. Como paso inicial se recubrieron las muestras con una capa de plata para dar mayor conductividad eléctrica y sean visibles.



Figura 21 - Microscopio Electrónico de Barrido

4.2.5.3 ESTUDIO FT-IR

Para conocer la interacción de las moléculas que participan en las nanoesferas procesadas se procedió a la lectura de espectros infrarrojos en el equipo SHIMADZU FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROPHOTOMETER IRAffinity-1 (Figura 22) en el rango de frecuencias de $350\text{--}7800\text{ cm}^{-1}$.

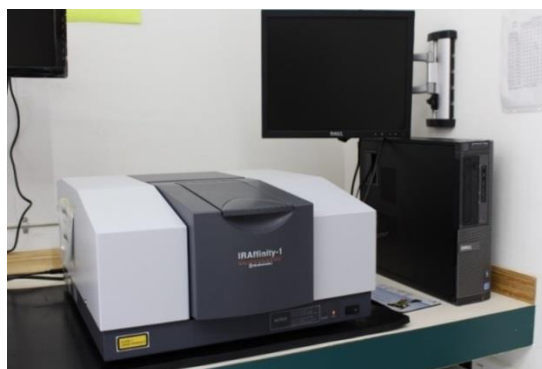


Figura 22 - Espectrofotómetro, IRAffinity-1

4.2.6 ESTUDIO DE LIBERACIÓN

Para esta metodología se tomó 0.015 grs de muestra de cada tipo de nanopartículas procesada y se incluyó dentro en una membrana de diálisis de 2000 daltons, con un diámetro de 11.5 mm, en un volumen de 2 ml de agua destilada (Figura 23). Se llevó a cabo la liberación del compuesto con un volumen externo de 50 ml a través de un sistema de liberación por osmosis.



Figura 23 - Sistema de liberación

Para las lecturas de absorción de la vitamina B₂ se trabajó en el equipo MULTISKAN GO de la marca Thermo Scientist (Figura 24), a una longitud de onda de 200-450 nm.



Figura 24 - Multiskan GO, Thermo Scientist

4.2.7 DISEÑO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la síntesis de nanoesferas, se realizó un diseño de experimentos factorial de mayor y menor rango, para conocer los factores significativos del equipo Nano Spray Dryer. Con el diseño factorial de 2^k con $k=3$, los factores y sus niveles se citan en la Tabla 3 - Diseño factorial de experimentos de con 3 variables Tabla 3. Se utilizó para conocer la cantidad adecuada de las concentraciones, tamaño de microfiltro y temperatura del cabezal de pulverización para un tamaño mínimo de partícula, manteniendo la velocidad de bomba constante en todos los tratamientos del diseño. Se utilizó el Software Design Expert versión 7.1.6, para el diseño de experimentación.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente capítulo hace referencia a los resultados en estudios experimentales que serán acompañados por tablas y/o gráficos que resumen aspectos cuantitativos y cualitativos. La discusión y comparación que contextualizan su importancia, así como las implicaciones prácticas y teóricas de los mismos.

5.1 SECADO POR ASPERSIÓN

Se procedió a la experimentación inicial para determinar las condiciones bajo la cuales se justifica el proceso de elaboración de las nanoesferas. Para ello como se mencionó en el punto 3.2.1.1

, se trabajó con un diseño de experimentos factorial de 2^3 . La experimentación procede con la variación de un máximo y un mínimo en las variables de mayor importancia que fueron: tamaño de microfiltro (caperuza) de 4.0 y 0.7 μm , temperatura de 80 y 120 $^{\circ}\text{C}$ y concentración de 0.25 y 0.5% p/v. En la Tabla 3 se presentan los resultados del diseño de experimentos. Para obtener el tamaño de nanopartícula se usó la técnica de microscopía SEM.

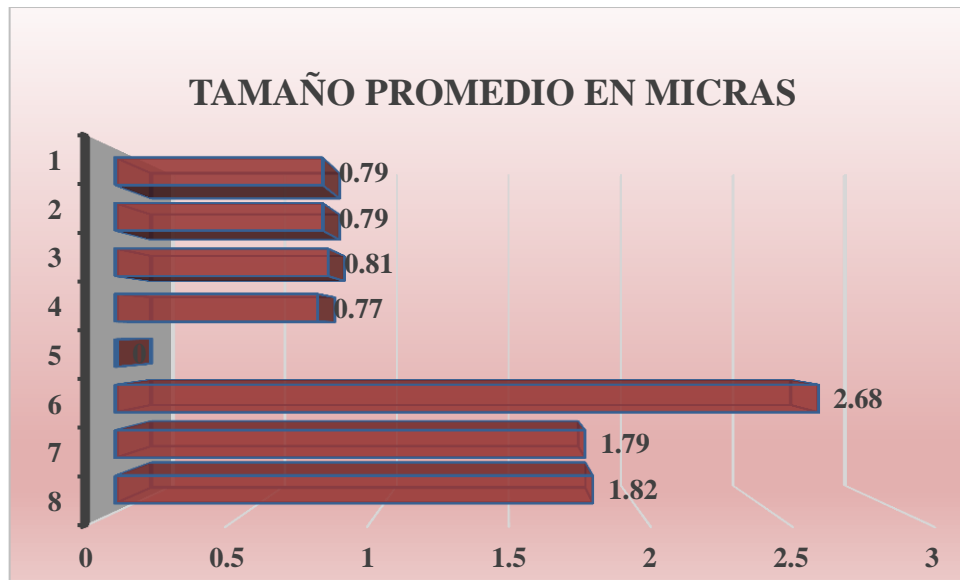
Burki et al. (2011) reportaron que la ventaja del secado por pulverización es que permite controlar el tamaño de partícula y la morfología mediante la variación de los parámetros del proceso y la formulación. De este modo podemos constatar que cuando el microfiltro empelado es de menor tamaño las nanopartículas serán más pequeñas y homogéneas. De acuerdo a Nguyen Van et al., Nguyen et al. (2013) las nanoesferas mostraron que el tamaño medio y la distribución de tamaños de las nanopartículas de Quitosano dependen directamente del diámetro del microfiltro utilizado y de las condiciones experimentales. En nuestro caso se observó que empleando la caperuza de 4.0 μm y concentraciones de 0.5% (p/v) de Pectina-Alginato se obtuvo un mayor rendimiento, sin embargo cuando la concentración es de 0.25%, los rendimientos disminuyeron (Tabla 3).

Tabla 3 - Diseño factorial de experimentos de con 3 variables

| N° | Temperatura (°C) | Filtro nm | Concentración (%) | Rendimiento (%) |
|----|---------------------|--------------|----------------------|--------------------|
| | | | Alginato + Pectina | |
| 1 | 120 | 4 | 0.50 | 28.60 |
| 2 | 80 | 4 | 0.50 | 18.60 |
| 3 | 120 | 4 | 0.25 | 22.19 |
| 4 | 80 | 4 | 0.25 | 18.80 |
| 5 | 80 | 7 | 0.25 | 0.29 |
| 6 | 120 | 7 | 0.25 | 23.30 |
| 7 | 80 | 7 | 0.50 | 44.86 |
| 8 | 120 | 7 | 0.50 | 72.58 |

De manera similar ocurre cuando se cambia a la caperuza de 0.7 μm , las concentraciones altas (0.5%) vuelven a tener rendimiento destacables caso contrario en concentraciones bajas (0.25%). Burki et al. (2011) reportaron que al separarse las partículas secas en un colector electrostático, se obtienen altas tasas de recuperación en cantidades de miligramos de muestra.

En cuanto a la combinación de las variables de funcionamiento del equipo de 80 °C, caperuza de 7.0 μm y concentración mínima de 0.25%, se formaron precipitados en el cilindro colector, por lo que fue difícil obtener muestra de esta prueba ya que las pocas nanoesferas que se formaron, se encontraban entre el precipitado que dejó la muestra en el cilindro colector. Esto se atribuye a que la solución no era lo suficiente viscosa para secarla a las condiciones en las cuales se llevó a cabo el proceso de nanosecado. En la Tabla 3 se presenta el tamaño promedio de las partículas obtenidas.



Gráfica 1 - Tamaño de Nanoesferas

En la Tabla 3 se comparan los tamaños promedio de partículas obtenidas en el Nano Spray Dryer Modelo B-90 en esta tesis con los reportados anteriormente. Como se puede observar, en esta investigación el tamaño de partícula fue casi del doble del obtenido previamente por otros investigadores Nguyen et al. (2013) con Quitosano al 0.1% (p/v), disuelto en 0.15% de ácido acético a un pH de 6.0, donde se obtuvieron tamaños de partícula de 420 - 970 nm. Esto se puede decir que se debe a la combinación de soluciones de biopolímeros (Pectina - Alginato)

Tabla 4- Comparación del tamaño de partícula obtenido por otros autores

| | Microfiltro | |
|---------------------|-------------|---------|
| | 4.0 µm | 7.0 µm |
| Teórico | 420 nm | 970 nm |
| Experimental | 783 nm | 2173 nm |

La estructura poco homogénea se debe a lo que Nguyen et al. (2013) nos dice que las partículas pequeñas se secan más rápido y el punto crítico de la formación de la corteza se alcanza poco después de la atomización. Para partículas más grandes, sin embargo, se necesita más tiempo para formar una costra, lo que da el tiempo de proteína a acumularse en la superficie, dando como resultado partículas arrugadas.

En base a los resultados obtenidos, se determinaron las mejores condiciones de secado a las cuales se elaborarán las nanoesferas en experimentos posteriores para obtener tamaños homogéneos. Burki et al. (2011) nos mostraron que el tamaño del microfiltro tiene un impacto significativo en el tamaño de partícula del polvo secado por pulverización. El uso de un tamaño más pequeño resultó en partículas más pequeñas. Las condiciones que mejores resultados dieron son: caperuza de 4.0 μm , temperatura de 120 °C y se trabajará a concentraciones de alta densidad.

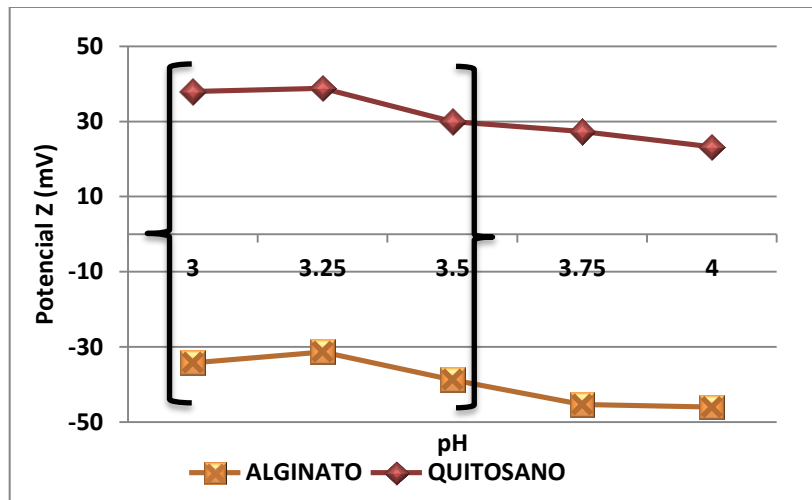
5.2 VENTANA DE INTERACCIÓN

Se trabajó con un potencial eléctrico de partículas en suspensión y la carga adquirida en (mV), reportada por Porras (2012). Los valores obtenidos por el potencial Z se hicieron en un intervalo de pH de 3.0 a 4.0, para cada dispersión biopolimérica por triplicado. Los resultados que se obtuvieron a través de la ventana de interacción.

El procedimiento como se indica en el punto 4.2.2 fue realizado para obtener un pH de máxima interacción entre Quitosano-Alginato (Gráfica 2) y Quitosano-Pectina (Gráfica 3), esta es originada por sus cargas electrostáticas.

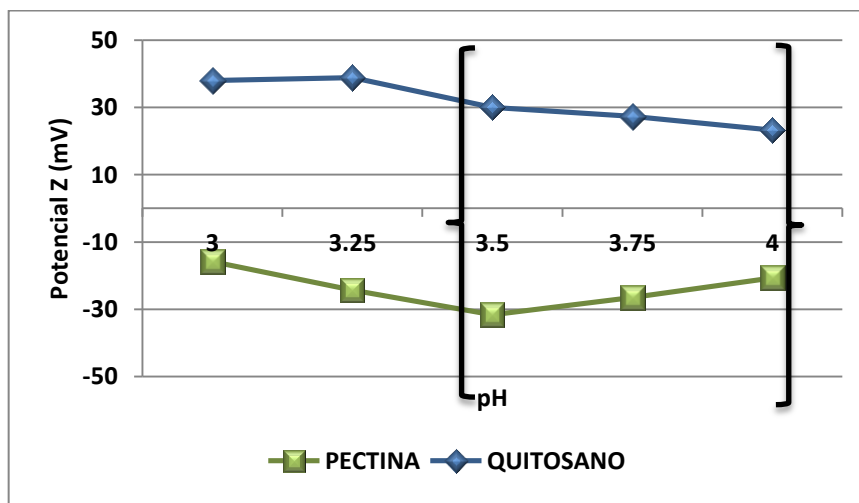
Dicho estudio nos permitió conocer el valor de pH en el cual los biopolímeros alcanzan una mayor fuerza de atracción, lo que hará que la matriz sea resistente y compacta en cuanto a su estructura.

Como se observa en Gráfica 2, el pH de máxima interacción entre Quitosano y Alginato ocurre en la región muy cercana al pH 3.3. La importancia de obtener información sobre las cargas parciales es obtener una equivalencia de las cargas opuestas de los biopolímeros que participan en esta adhesión en un potencial eléctrico de -35 mV en Alginato y 35mV en Quitosano, dando a conocer la información de la interacción entre macromoléculas expuestas al estudio de sus cargas.



Gráfica 2 - Alginato-Quitosano; Variación de cargas electrostáticas en función del pH

Una vez obtenidos los valores de cargas para cada pH de los compuestos, se determinaron las condiciones de máxima interacción de ambos biopolímeros, la magnitud de sus cargas (Gráfica 3) se encuentra en un intervalo de pH 3.5 a 4 en Quitosano y Pectina, lo que hará más afectiva la fuerza de atracción entre ellos. Siendo el punto de mayor interacción a un pH de 3.6 con un potencial de 29 mV para el Quitosano y -29 mV para la Pectina.



Gráfica 3 - Pectina-Quitosano; Variación de cargas electrostáticas en función del pH

Tomando como referencia los datos reportados por Carballo and Pedroza (2011) de potencial vs pH, se corroboran los resultados obtenidos. A pesar que el Quitosano es de 75% de grado de desacetilación la tendencia es similar al de la experimentación presentada.

5.3 ELABORACIÓN DE NANOESFERAS

A partir de las variables estudiadas en el diseño de experimentos, se elaboraron soluciones en concentraciones de 0,125% en Quitosano y el 1% en ácido acético para este compuesto. En Pectina y Alginato se usó concentraciones de 0,125% en cada uno, para la formación de nanoesferas de cada biopolímero. En caso que la concentración de polímeros aumentara, la solución viscosa precipitaría y no se formarían nanoesferas por la saturación del microfiltro.

Las condiciones de las variables del equipo que se manejaron fueron: 120°C de temperatura, 85% de aspersion, 38 bares de presión y un microfiltro de 4.0 μm .

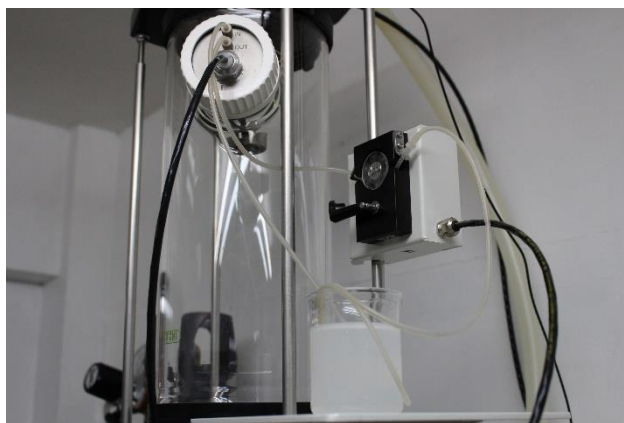


Figura 25 - Alimentación al equipo Nano Spray Dryer

En ambas interacciones de biopolímeros una vez sonicadas, se incorporó Riboflavina, en una concentración de 0.185 mM y se dejó en agitación hasta formar una solución homogénea. Posteriormente, se alimentó la solución en el Nano Spray Dryer.

5.4 CARACTERIZACIÓN, MORFOLOGÍA Y ESTABILIDAD

5.4.1 ANÁLISIS POR MICROCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) nos muestra la micrografía en la cual se observa una distribución y tamaño uniforme de las diferentes nanoesferas, con una estructura esférica definida.

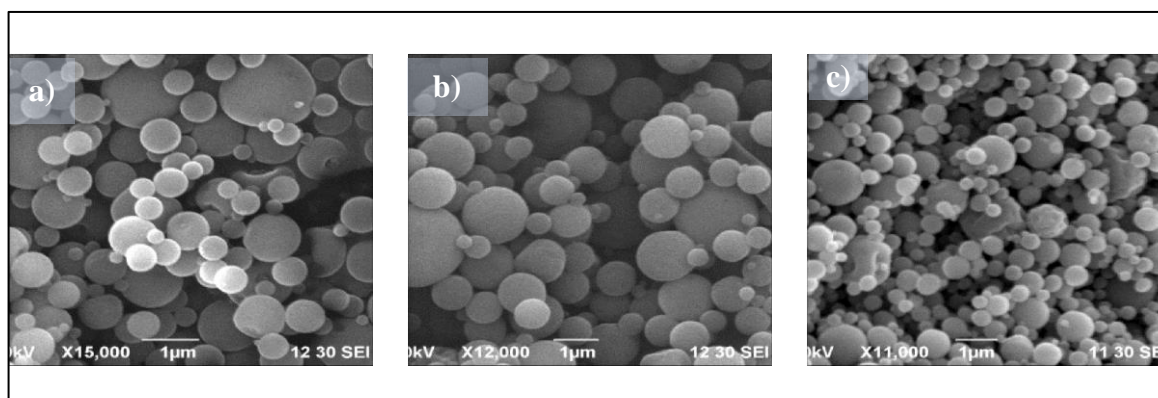


Figura 26 - Micrografías de Nanoesferas de a) Alginato, b) Pectina y c) Quitosano

Según la comparación que se hizo con Nguyen et al. (2013), se reportó que la distribución de tamaño de las nanopartículas de Quitosano tenían un promedio de 420 nm, utilizando un microfiltro de 4.0 µm con un rendimiento del 70%. En cuanto a las mediciones de la experimentación, el promedio de las nanopartículas fueron de 572.98 nm con una variación de 323.35 nm.

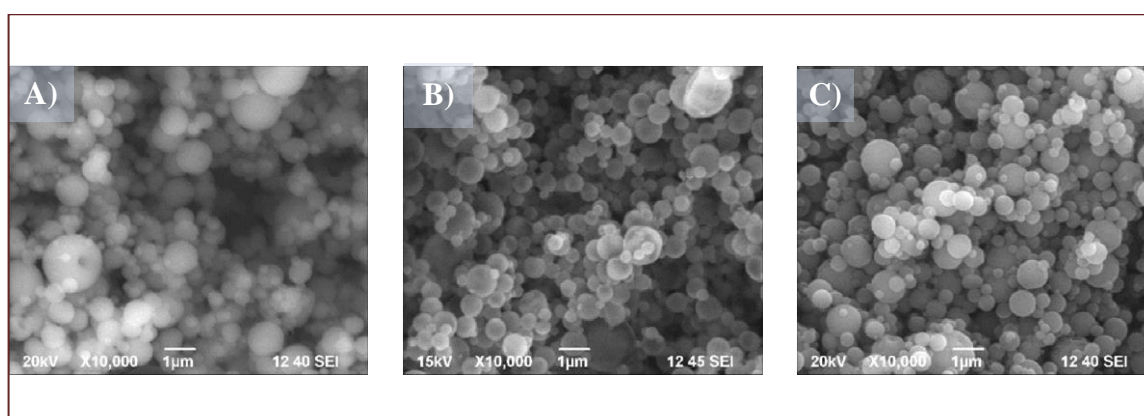


Figura 27 - Micrografías de Nanoesferas de A) Alginato + Riboflavina; B) Pectina + Riboflavina; C) Quitosano + Riboflavina

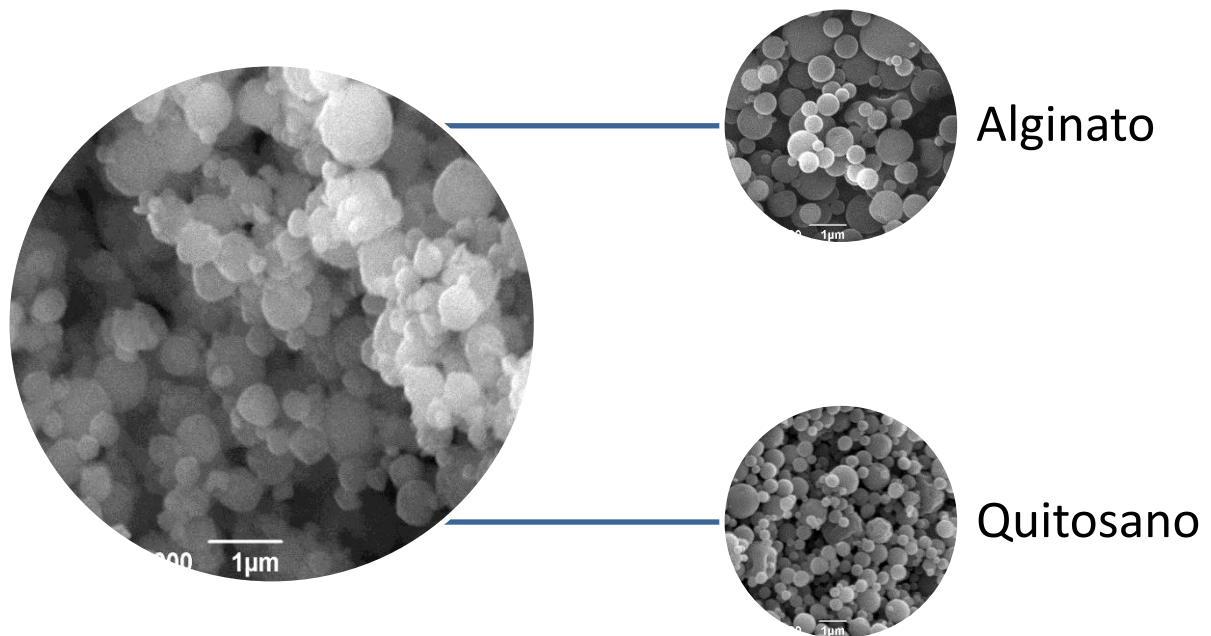


Figura 28 - Micrografía de Alginato-Quitosano

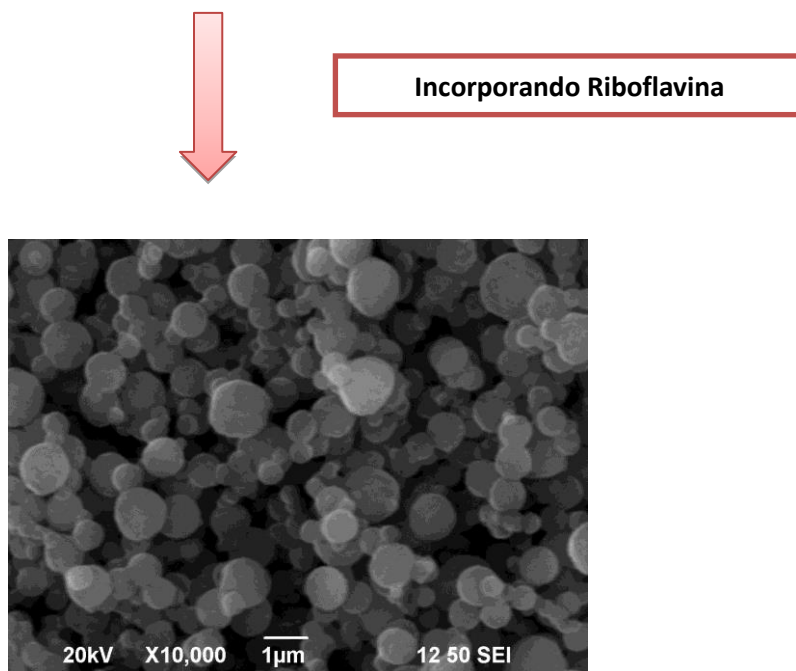


Figura 29 - Micrografía de Alginato-Quitosano incorporando Riboflavina

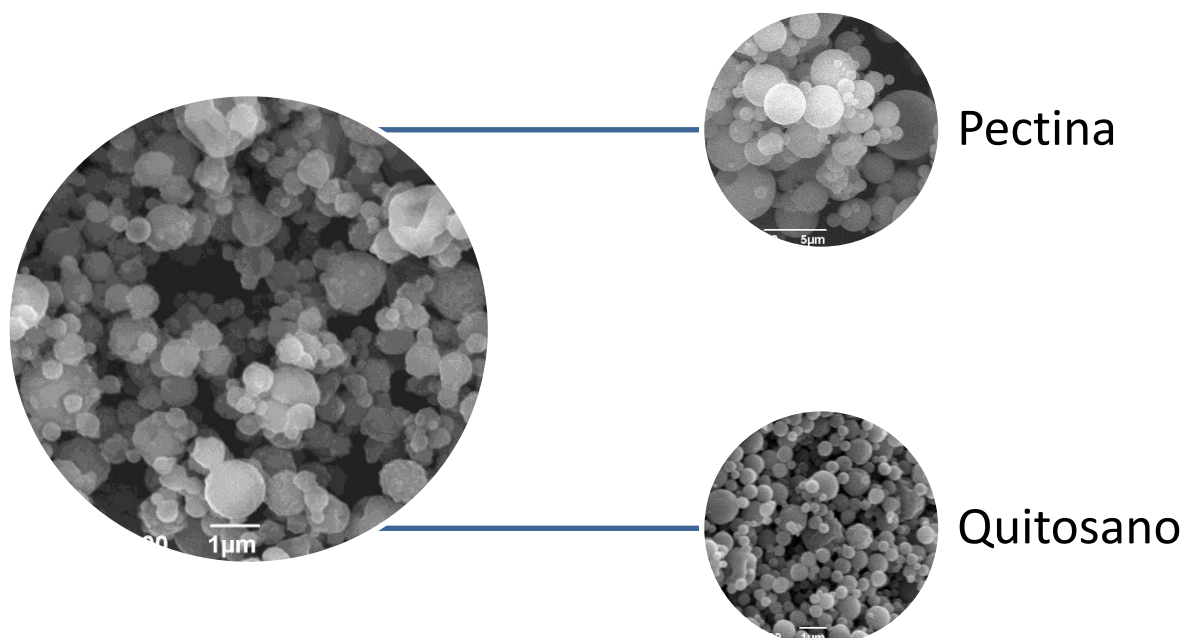


Figura 30 - Micrografía de Pectina-Quitosano

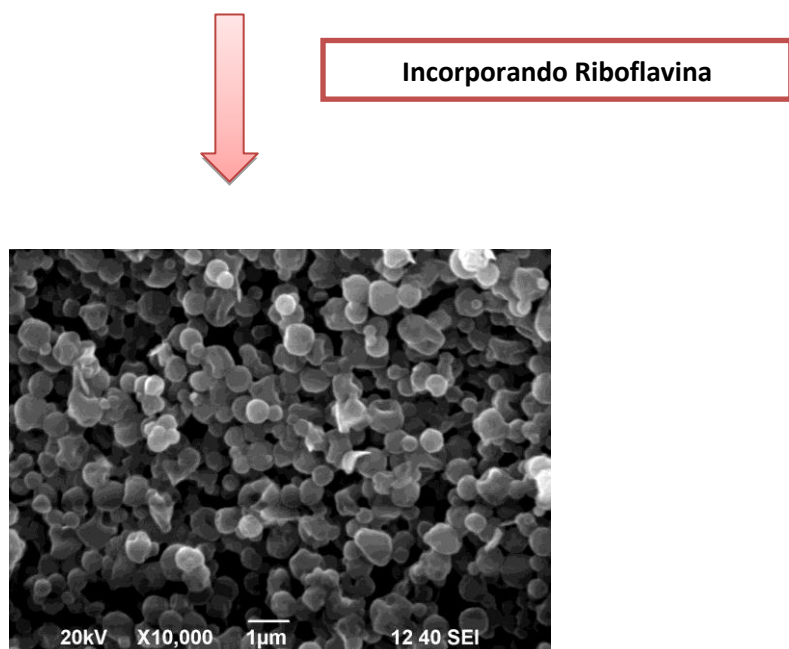


Figura 31 - Micrografía de Pectina-Quitosano incorporando Riboflavina

Sin embargo anteriormente se obtuvieron nanoesferas de forma esférica definida en comparación con las que se muestran en las Figuras 28 y 30. Se puede decir que el cambio de pH y la combinación de los biopolímeros hace que la estructura esférica sea irregular y amorfa, esto debido a su comportamiento en la unión de ambos.

En la Figura 32, se presenta el tamaño promedio de las nanoesferas por la técnica de SEM. Los tamaños varían dependiendo el polímero que se esté usando, se observa que al incorporar Riboflavina aumenta el tamaño de las nanoesferas de Quitosano y de Pectina, sin embargo con Alginato el tamaño disminuyó, esto puede ser debido a una mayor interacción de Riboflavina y Alginato desarrollándose nanoesferas más compactas después del secado.

Las nanoesferas de mayor tamaño son las del biopolímero de Pectina, es decir que la matriz de las esferas serán de mayor tamaño.

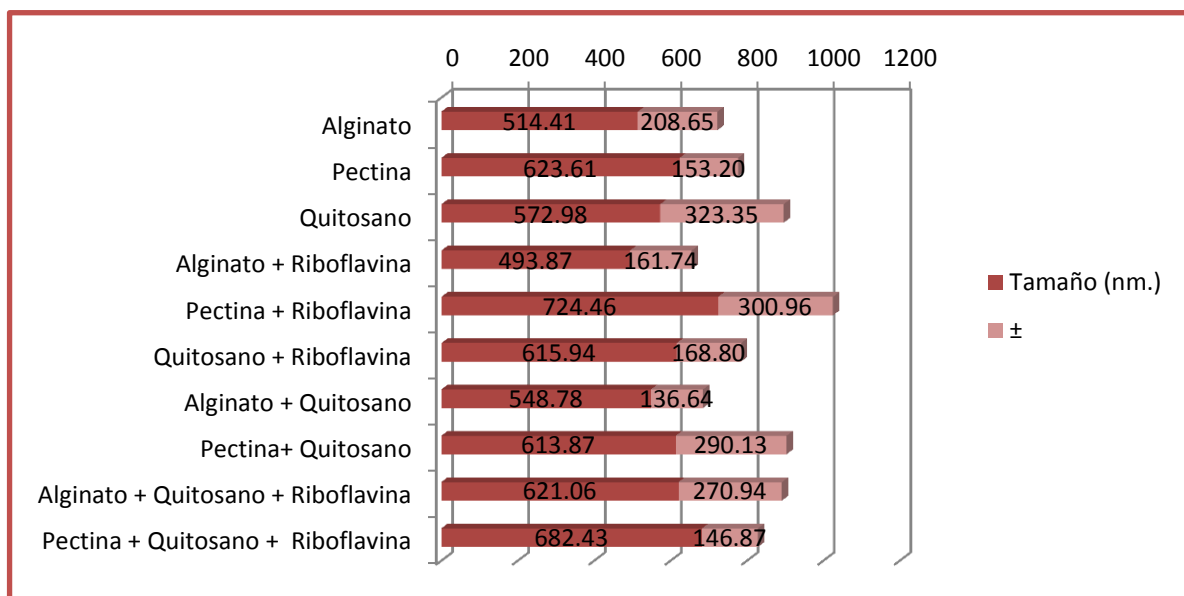


Figura 32- Tamaño de nanoesferas

5.4.2 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Para el estudio de estabilidad se observaron los cambios en el equipo SEM y este proceso se realizó, incorporando nanoesferas de Alginato, Pectina y Quitosano a distintos ambientes de humedades de 33, 75 y 93%, durante 24 horas. Como resultado de este experimento se demostró que el Alginato y el Quitosano son estables a humedades de 33 y 75%, al contrario de la Pectina que solo mostró estabilidad al ambiente de 33% de humedad (Figura 33).

Se puede observar en las micrografías de la Figura 3 las nanoesferas de Alginato se encuentran estables hasta un 75% de humedad en las primeras 24 horas de exposición, sin embargo a 93% de humedad las nanoesferas se hidrataron y se aglomeraron de tal forma que fue posible analizarlas por la técnica SEM.

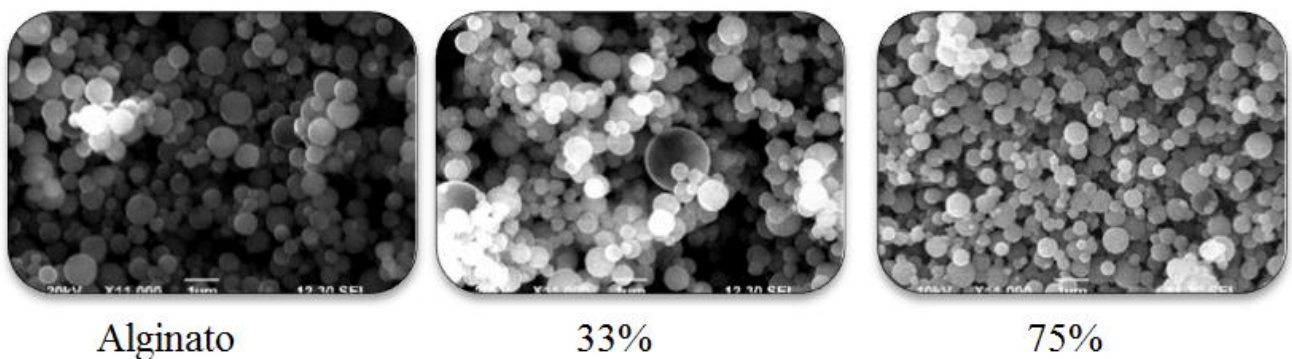


Figura 33 - Micrografías de Alginato

Las siguientes micrografías (Figura 4) muestran la vulnerabilidad que tiene la Pectina a la humedad, es el biopolímero menos resistente. La hidratación y aglomeración de las nanoesferas se observó a las 24 horas de exposición a una humedad del 75 y 93%.

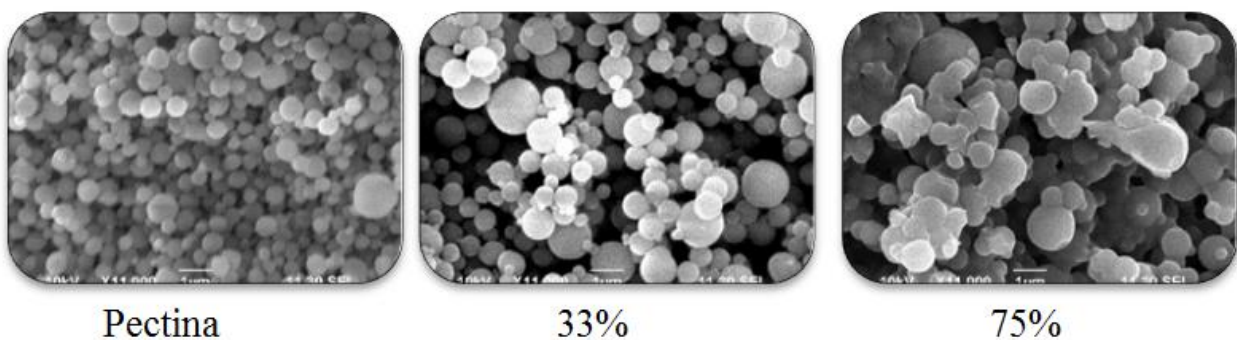


Figura 34 - Micrografías de Pectina

Cuando se empleó el Quitosano (Figura 5) en la formación de nanoesferas la morfología fue irregular, sin perder la forma esférica. El polímero mostró mayor estabilidad comparado con los anteriores. Sin embargo al 93% las nanoesferas se muestran hidratadas y aglomeradas.

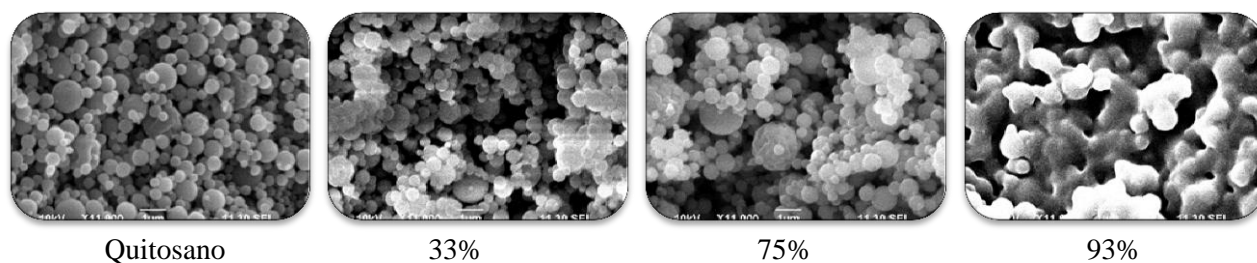


Figura 35 - Micrografías de Quitosano

5.4.3 ESTUDIO FT-IR

5.4.3.1 ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (ALGINATO-QUITOSANO)

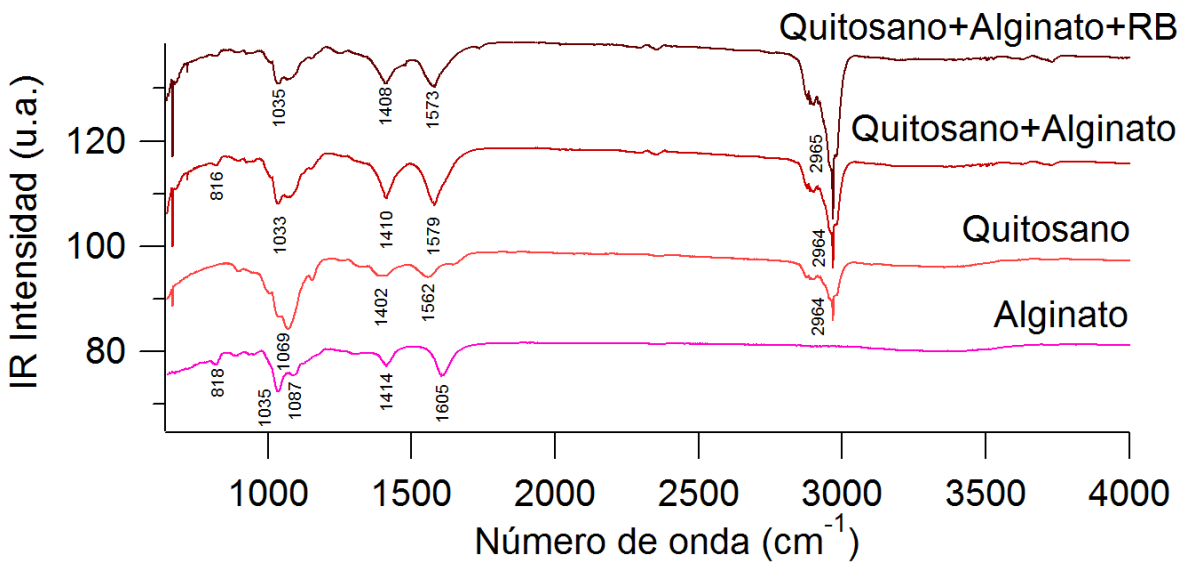
Está bien establecido que el grupo carboxilo (-COO) del polímero aniónico (Alginato) puede interactuar con el grupo amino (-NH₃⁺) del Quitosano y formar un complejo iónico entre los dos compuestos. Como consecuencia de estas interacciones, hay cambios en los espectros FTIR en la bandas de absorción de los grupos amino, grupos carboxilo y enlaces amida. la Gráfica 4 representa los espectros FTIR de Alginato, Quitosano y nanoesferas de Alginato-Quitosano.

En la figura se aprecian picos de carboxilo en el Alginato cerca de 1.605 cm⁻¹ (simétrica COO⁻ vibración de estiramiento) y 1,414 cm⁻¹ (COO asimétrica vibración de estiramiento) (Sarmiento et al., 2006).

El espectro FTIR de Quitosano muestra un pico amino protonado 1562 cm^{-1} (Sarmiento et al., 2006, Neiras et al., 2011), ya que se obtiene a partir de la N - desacetilación parcial de la Quitina. Sin embargo se aprecia que en la interacción de Quitosano/Alginato hay un desplazamiento de unos cm^{-1} en el grupo amino a 1569 cm^{-1} . Además, el pico que indica la vibración muestra la presencia de C=O (carbonilo) de estiramiento del alcohol primario C_6 en la banda 1069 cm^{-1} (Thawatchai Phaechamud, 2000).

En el estudio que reporta Sarmiento et al. (2006) se trabajó con Quitosano bajo condiciones de desacetilación del 75 % indicando que en la banda 1641 cm^{-1} se muestra un pico de enlace amida, esta banda no se presentó en los resultados obtenidos en esta tesis, esto puede ser debido a que el Quitosano empleado fue de 96.1 % de desacetilación, por lo tanto no se observan grupos amidas característicos de la quitina en el espectro.

La interacción de Quitosano-Alginato en las nanoesferas se hizo evidente por el pico en 1579 cm^{-1} , característico de los grupos amida que se forman entre ambos compuestos (Bigucci et al., 2008, Thawatchai Phaechamud, 2000).



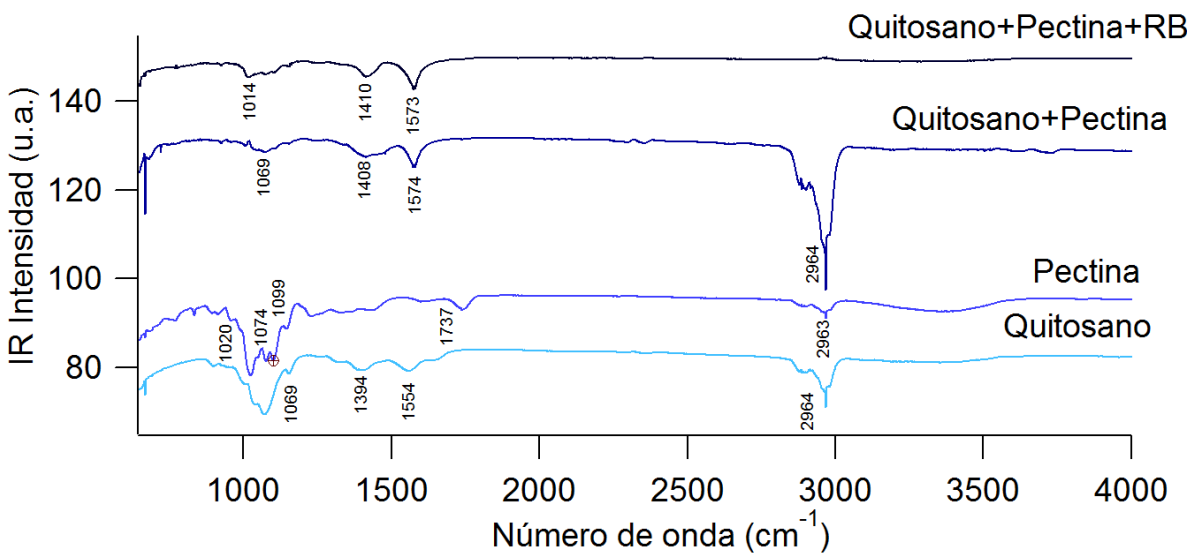
Gráfica 4 - Espectrofotómetro de Alginato-Quitosano

5.4.3.2 ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (PECTINA-QUITOSANO)

Thawatchai Phaechamud (2000) reportó anteriormente que la presencia de C-O estiramiento del alcohol primario C₆ en Quitosano, se observa en la banda de 1069 cm⁻¹.

En la pectina la banda de 2.963 cm⁻¹ (3,000 ± 2,800 cm⁻¹) se refieren a C=H absorción (Garcia, 2013). Estos incluyen CH, CH₂, y CH₃ de estiramiento y vibraciones de flexión.

La banda que aparece a 1737 cm⁻¹ (Bigucci et al., 2008, Garcia, 2013) presenta una frecuencia relativamente alta, característica de los grupos carbonilo de los ésteres (C=O). También entre los 1000-1200 cm⁻¹ se observan picos correspondientes a el grupo C-O (Gnanasambandam, 2000) (Gráfica 5).



Gráfica 5 - Espectrofotómetro de Pectina-Quitosano

5.5 ESTUDIO DE LIBERACIÓN

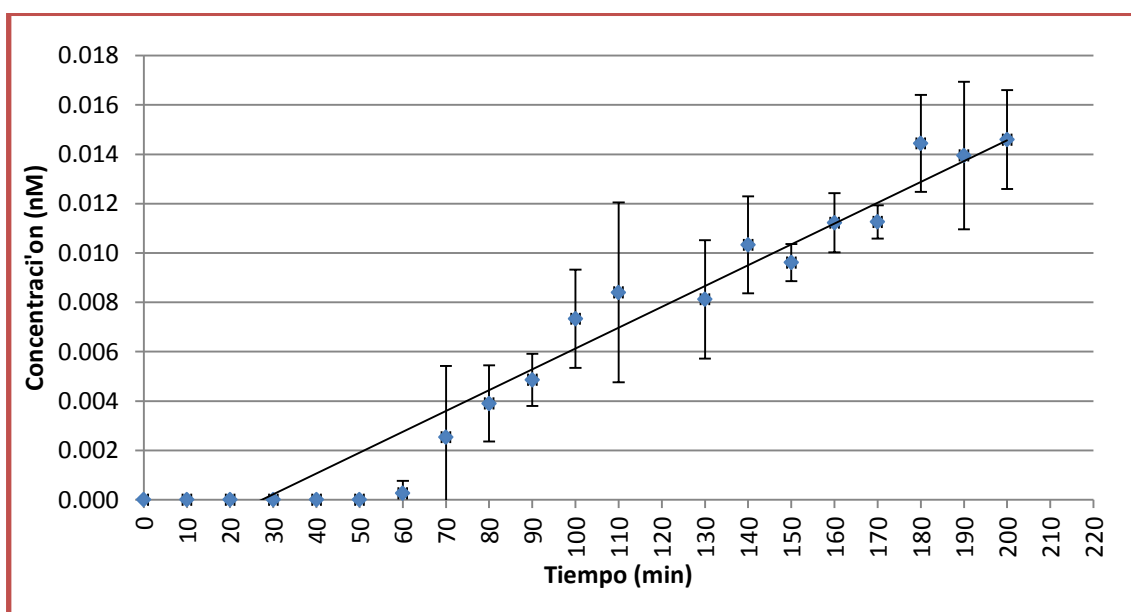
Se trabaja con un sistema de liberación por osmosis a través de una membrana de diálisis, se procede a la liberación de la Riboflavina de las nanoesferas y a continuación se obtienen los resultados de las mediciones.

Primeramente se hizo el análisis por espectroscopia Uv-vis de la Riboflavina a distintas concentraciones para graficar la curva de calibración y a través de ella se pueda definir las concentraciones. (Anexo 1)

5.5.1 LIBERACIÓN DE RIBOFLAVINA EN NANOESFERAS DE ALGINATO, PECTINA Y QUITOSANO

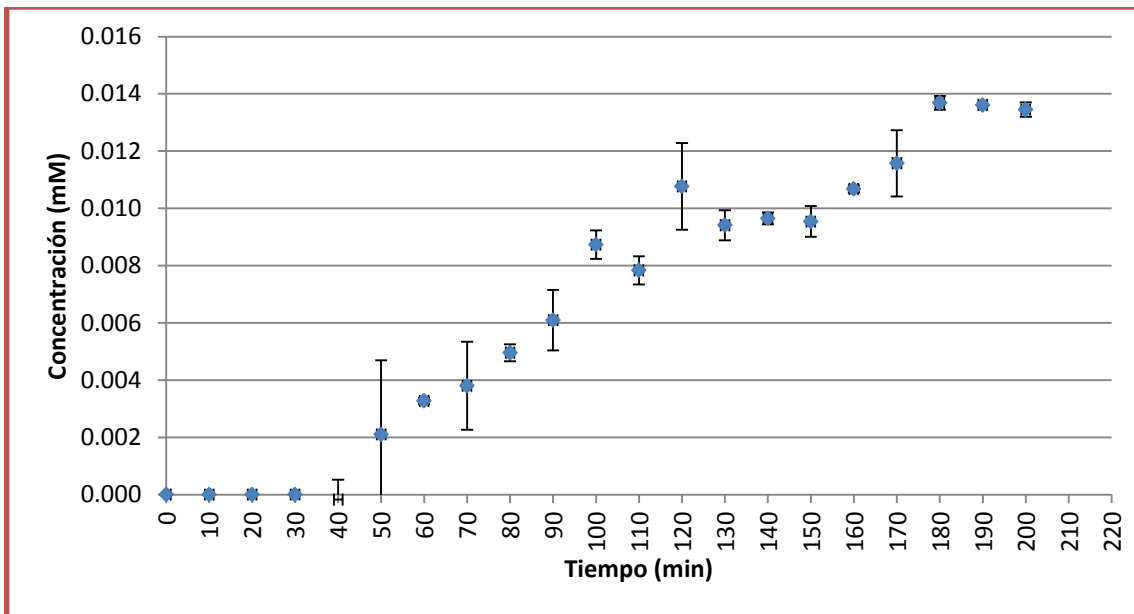
Los estudios de liberación se realizaron para cada biopolímero de forma independiente, la experimentación se llevó a cabo en agua destilada.

La liberación de Riboflavina en las nanoesferas de Alginato comienzan después de la primera hora, a partir de ello se logra apreciar una tendencia de liberación lineal de 1 hora. En la tercera hora no se encuentra cambio significativo de liberación, logrando una estabilidad en la concentración en la solución (Gráfica 6).



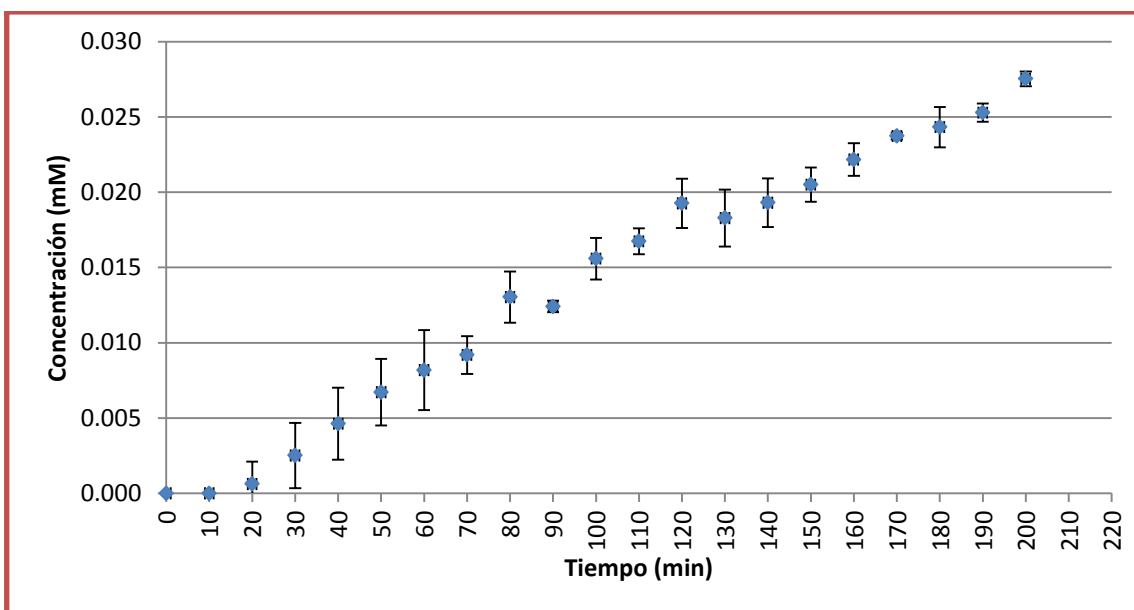
Gráfica 6 - Curva de liberación de Riboflavina en una matriz de Alginato

Sin embargo analizando la Gráfica 7 de liberación con nanoesferas de Pectina, a los 50 minutos comienza la liberación.



Gráfica 7 - Curva de liberación de Riboflavina en una matriz de Pectina

Las nanoesferas de Quitosano (Gráfica 8) se liberaron a los 20 minutos, mostrando ser un biopolímero de menor resistencia de liberación comparado con el Alginato y la Pectina que tuvieron un comienzo de liberación retardada.

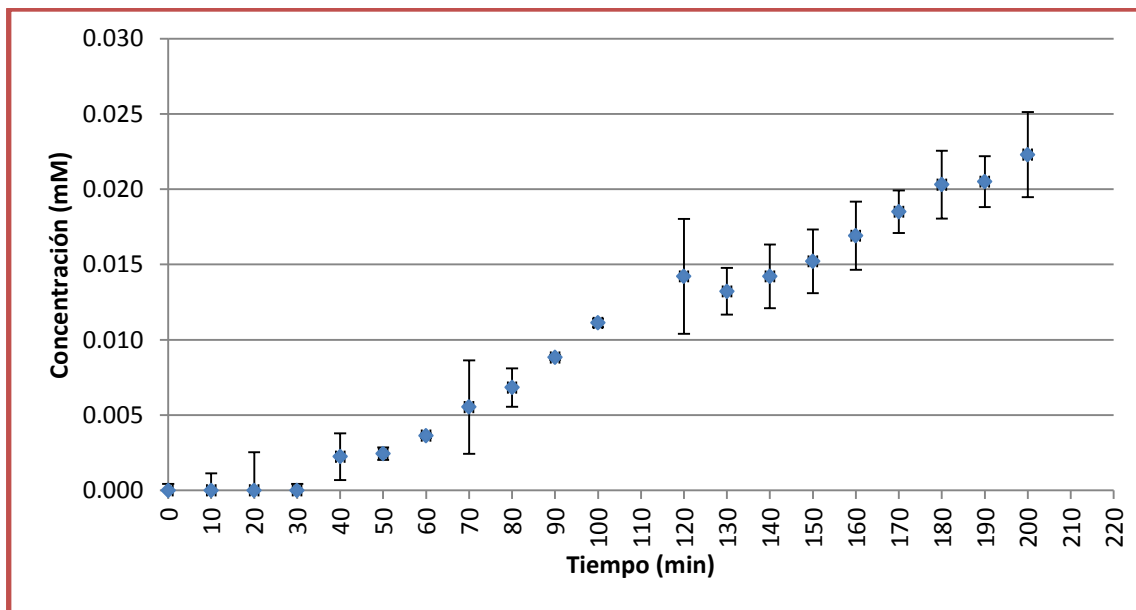


Gráfica 8 - Curva de liberación de Riboflavina en una matriz de Quitosano

5.5.2 LIBERACIÓN DE NANOESFERAS EN MATRICES COMBINADAS

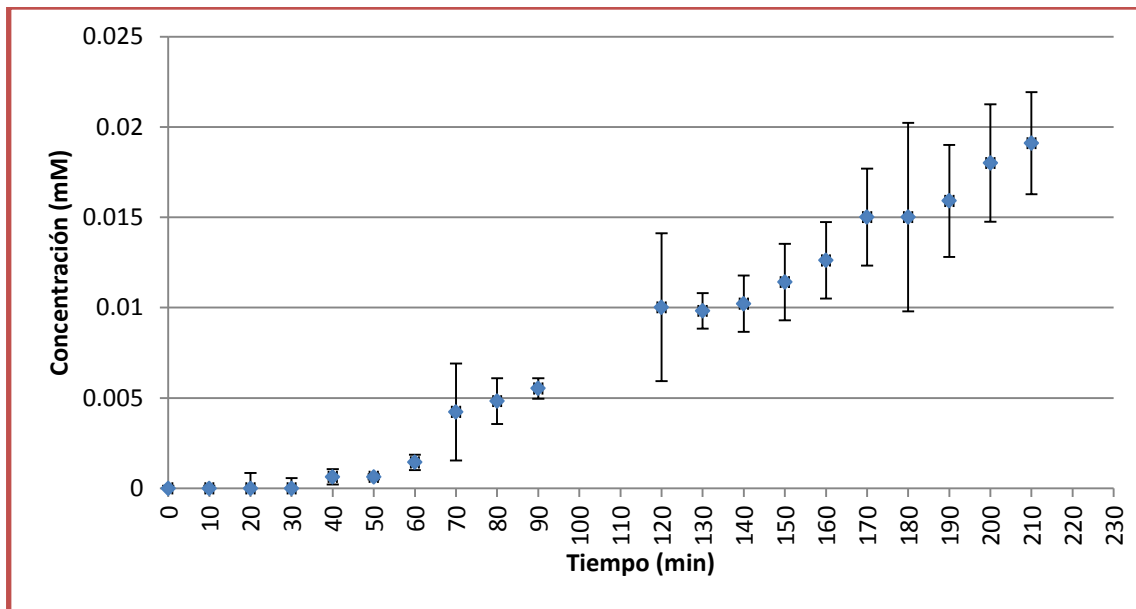
Este estudio se basa en obtener el tiempo de liberación de la Riboflavina en los diseños de nanoesferas propuestos, en este caso de Alginato-Quitosano y Pectina-Quitosano, aclarando que la concentración de Riboflavina es la misma en ambas combinaciones.

Se observa en la Gráfica 9, la liberación tiene una tendencia lineal a partir de los 30 minutos de exposición de la nanoesfera. En comparación con los anteriores resultados obtenidos para Alginato y de Quitosano, se tiene un tiempo intermedio de detección de Riboflavina en el medio acuoso.



Gráfica 9 - Curva de liberación Riboflavina en una matriz de Alginato-Quitosano

Sin embargo comparando la liberación de Pectina-Quitosano con la de Alginato-Quitosano la resistencia a la liberación es mayor, a los 50 minutos se detecta Riboflavina en el medio, por lo que la matriz de estas nanoesferas son de mayor resistencia.



Gráfica 10 - Curva de liberación de Riboflavina en una matriz de Pectina-Quitosano

A continuación en la Tabla 5 se resume la liberación que se obtuvo en los diferentes diseños de matrices, siendo la de mayor resistencia la matriz de Pectina-Quitosano en el diseño combinado y en las de biopolímeros simples la de más resistencia fue la de Pectina.

Tabla 5 - Velocidad de Liberación de Riboflavina en matrices de Alginato, Pectina y Quitosano

| Nanoesferas | mM/min |
|----------------------|--------------------|
| Alginato | 8×10^{-5} |
| Pectina | 8×10^{-5} |
| Quitosano | 1×10^{-4} |
| Alginato + Quitosano | 1×10^{-4} |
| Pectina + Quitosano | 7×10^{-5} |

De acuerdo a los resultados de liberación, anteriormente en el punto 4.4.1 se mencionó que las nanoesferas de Pectina fueron las de mayor tamaño, y con los resultados se tiene que la liberación de mayor tiempo la tuvo las matrices compuestas de Pectina, por lo que se puede decir que en la experimentación a mayor tamaño de nanoesfera, se tendrá un liberación retardada.

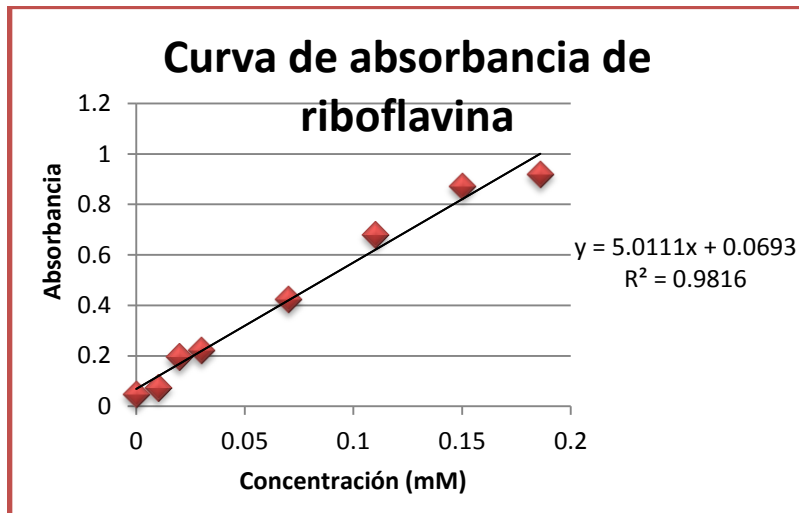
El objetivo del estudio fue determinar la matriz con mayor resistencia a la liberación por medio del ajuste de pH en los polímeros utilizados, la combinación de ambos hizo que la nanoesfera no llegue a una desestabilización, por lo que podemos concluir que la combinación de Pectina-Quitosa fue la que tuvo mejores resultados de resistencia. En cuanto a los resultados de concentración, las nanoesferas en promedio alcanzaron una estabilidad en concentraciones de 0.02 mM, a partir de este punto la liberación fue constante.

6 CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

Este trabajo de investigación se formó nanoesferas de Quitosano, Alginato y Pectina de tamaño homogéneo, efectivas para la encapsulación de Riboflavina, por la técnica de secado por aspersion a escala nano. En general se observó que:

- Las condiciones experimentales de secado que favorecieron la formación de nanoesferas fueron: una temperatura de 120 °C, 85% de aspersion, 38 bares de presión y un microfiltro de 4.0 µm Sin embargo, cuando se alimentan soluciones viscosas, estas precipitan y no se forman nanoesferas por la saturación del microfiltro.
- La distribución de tamaños de las nanoesferas obtenidas dependen directamente del diámetro del microfiltro utilizado y de las condiciones experimentales de secado. Nanoesferas con distribuciones homogéneas, en un intervalo de 500-700 nm, se obtuvieron empleado un microfiltro de 4.0 µm.
- El tamaño del microfiltro es la variable que impactó significativamente el tamaño de partícula. El uso de un tamaño más pequeño resultó en partículas más pequeñas, como se pudo observar con el microfiltro de 4.0 µm se obtuvieron valores de promedios de 800 nm y con el filtro de 7.9 µm valores promedio de 2 µm.
- En el diseño de experimentos, el rendimiento de las nanoesferas aumentó cuando se emplearon soluciones con una concentración elevada del biopolímero en 0.5%.
- La máxima interacción entre Quitosano y Alginato ocurre en la región muy cercana al pH 3.3, con un potencial eléctrico de -35 mV en Alginato y 35mV en Quitosano. Para el Quitosano y la Pectina, se encontró que a un pH de 3.6 se potencializa la fuerza de atracción entre ambos biopolímeros, con un potencial de 29 mV para el Quitosano y -29 mV para la Pectina.
- El cambio de pH y la combinación de los biopolímeros hace que la estructura de las nanoesferas sea esférica, irregular y amorfa, esto debido a la interacción que resulta de la combinación de los biopolímeros.

- Las nanoesferas combinadas de mayor tamaño fueron las elaboradas con Pectina con un tamaño promedio de 682 nm en comparación con las de Alginato que fueron de promedio de 620 nm.
- El biopolímero de Quitosano fue el que mostró mayor estabilidad a la humedad relativa, comparado con Alginato y Pectina. Sin embargo, para humedad altas (93%), las nanoesferas se mostraron hidratadas y aglomeradas en las primeras 24 horas.
- Del análisis de FTIR, la interacción de Alginato-Quitosano en la formación de nanoesferas se hizo evidente la formación entre ambos compuestos el grupos amida en el pico 1579 cm^{-1} .
- En la combinación de Pectina-Quitosano incorporando Riboflavina se pierde el grupo C=H
- En la liberación in vitro de vitamina B₂ encapsulada en matrices sencillas de Quitosano, Alginato y Pectina, las de Quitosano mostró una mayor velocidad de liberación de 0.028 mM a 3:20 horas, con un inicio de liberación de 30 minutos, comparado con el Alginato y la Pectina que tuvieron un comienzo de liberación retardada después de 40 minutos, y liberaron 0.015 y 0.013 mM respectivamente.
- En los diseños de matrices, la combinación de los biopolímeros que mayor resistencia ofrecieron a la liberación fue la matriz elaborada con y Pectina-Quitosano.
- Se obtuvieron nanoesferas de tamaño homogéneo que permitieron una liberación prolongada de Riboflavina, esta matriz puede ser utilizada para la aplicación en liberación de distintos compuestos.



8 BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR, L. & GAONA, V. G. 2012. Riboflavina (Vitamina B2).
- AIDA, T. M., YAMAGATA, T., WATANABE, M. & SMITH, R. L. 2010. Depolymerization of sodium alginate under hydrothermal conditions. *Carbohydrate Polymers*, 80, 296-302.
- ALLOWANCES, N. R. C. C. O. D., FOOD, N. R. C. & BOARD, N. 1980. *Recommended dietary allowances*, National Academies.
- ANDUEZA, I. 2012. *Desarrollo de un nanosistema para la liberación de un fármaco intravítreo*. Doctorado, Universidad Central de Venezuela.
- BALAN, V. & VERESTIUC, L. 2014. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *European Polymer Journal*, 53, 171-188.
- BATALLA, M. J., RODRÍGUEZ, F. P. & SAN MARTÍN, M. E. 2011. Identificación de células tumorales con nanopartículas semiconductoras (CdS) conjugadas con proteína Cry (*Bacillus thuringiensis*) y evaluación de su citotoxicidad.
- BIGUCCI, F., LUPPI, B., CERCHIARA, T., SORRENTI, M., BETTINETTI, G., RODRIGUEZ, L. & ZECCHI, V. 2008. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *Eur J Pharm Sci*, 35, 435-41.
- BÜCHI 2006. Manual de instrucción Nano Spray Dryer B-90. *In*: BUCHI (ed.).
- BURKI, K., JEON, I., ARPAGAU, C. & BETZ, G. 2011. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. *Int J Pharm*, 408, 248-56.
- BUSTILLO, M. C. A. R., CAMPOS ERICK ADALBERTO 2008. *Obtención de Riboflavina (vitamina B2) por procesos de fermentación sumergida en medio de producción de agua de cocimiento de maíz y aceite de soya utilizando como microorganismo productor "Saccharomyces cerevisiae"*. Universidad del Salvador.
- CARBALLO, M. & PEDROZA, R. R., M. 2011. *Estudio fisicoquímico comparativo de coacervados complejos obtenidos a partir de mezclas binarias y ternarias de biopolímeros*. Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa.
- CAREY, F. A., ARELLANO, J. A. V. & Y POZO, V. G. 1999. *Química orgánica*, McGraw-Hill.

- CASTAÑEDA, H., GEMIO, R., YAPU, W. & NOGALES, J. 2011. Microencapsulación, un método para la conservación de propiedades fisicoquímicas y biológicas de sustancias químicas. *Revista Boliviana de Química*, 28.
- CERÓN, M. G. I. 2012. *Purificación, fraccionamiento y formación de bionanocompuestos con flavonoides del maíz azul y efecto terapéutico sobre células tumorales de cérvix*. Doctorado, Institucional Politécnico Nacional.
- CLAVIJO, G. D., GARCÍA, M. G. A., MEJÍA, M. Ó., RUIZ, A., GARCÍA, C. A., CASADIEGO, T. C. A. & VITTORINO, M. M. 2007. La frontera entre la Biología molecular y la Nanotecnología: impacto en la Medicina. *Iatreia*, 20, pág. 297-307.
- CHEN, J., LIANG, R. H., LIU, W., LUO, S. J., LIU, C. M., WU, S. S. & WANG, Z. J. 2014. Extraction of pectin from *Premna microphylla turcz* leaves and its physicochemical properties. *Carbohydr Polym*, 102, 376-84.
- DELGADILLO, A. L. 2012. *Síntesis y efecto de nanoesferas que contienen urea en cultivo hidropónico de lechuga (Lactuca sativa)*. Maestría, Instituto Politécnico Nacional.
- EINHORN, S. U., KASTNER, H. & DRUSCH, S. 2014. Thermally induced degradation of citrus pectins during storage – Alterations in molecular structure, colour and thermal analysis. *Food Hydrocolloids*, 35, 565-575.
- ESTEVINHO, B. N., ROCHA, F., SANTOS, L. & ALVES, A. 2013. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 31, 138-155.
- EZUMI, M. & TODOKORO, H. 1999. Scanning electron microscope. Google Patents.
- FALLIC, A. & MONTERO, N. M., M. F. 2012. Importancia de los polímeros naturales en la preparación de sistemas de liberación controlada de fármacos. Síntesis y caracterización de nanopartículas basadas en mezclas de quitosano y albúmina. *Reduca*, 10, 134.
- FANGER, G. O. 1974. Microencapsulation: a brief history and introduction. *Microencapsulation*. Springer.
- FAWZY, A. S., NITISUSANTA, L. I., IQBAL, K., DAOOD, U., BENG, L. T. & NEO, J. 2013. Chitosan/Riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. *J Mech Behav Biomed Mater*, 17, 278-89.
- FLORES, I. A. & JIMÉNEZ, M. T. 2013. Microencapsulación de compuestos activos con quitosano.
- GALLARDO, C. 2011. Estabilización de disoluciones acuosas de riboflavina por solapamiento espectral. *Revista Cubana de Farmacia*, 45, 515-523.

- GARCIA, A. B. N. G. L. E. 2013. Equilibrio de biosorción de plomo (ii) y caracterización mediante ft-ir y sem-edax en pectina reticulada proveniente de cáscaras de naranja. *Revista Sociedad Química Peru*, 79.
- GENG, L., ZHOU, W., QU, X., CHEN, W., LI, Y., LIU, C., SUN, J., YU, X., WANG, H., ZHANG, Z., LI, J. & WANG, L. 2014. Optimization of the preparation of pectin from Aloe using a Box-Behnken design. *Carbohydr Polym*, 105, 193-9.
- GNANASAMBANDAM, R. A. 2000. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *ELSEVIER*, 68, 327-332.
- GÓMEZ, R. C. 2005. Coste-efectividad del tratamiento antifúngico con Ambisome (anfotericina B liposómica). *Rev Esp Econ Salu*, 4, 172-177.
- GONZÁLEZ, R., ML, HOLGADO, M., SANCHEZ-LAFUENTE, C., RABASCO, A. & FINI, A. 2002. Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 225-234.
- GOUIN, S. 2004. Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330-347.
- GRUNAUER, E. C. C. 2009. *Influencia del Secado sobre la captación de agua de pectina extraída a partir del citrus x aurantifolia swingle*. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- ISLAS, R. P. Alimentos Microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulacion de alimentos para larvas de Especies Acuáticas. 2012. Universidad Iberoamericana.
- KENTISH, S. & ASHOKKUMAR, M. 2011. The Physical and Chemical Effects of Ultrasound. 1-12.
- KIM, J.-Y., CHOI, Y.-G., BYUL KIM, S. R. & LIM, S.-T. 2014. Humidity stability of tapioca starch-pullulan composite films. *Food Hydrocolloids*.
- KUMAR, J. F. & BRISTOW, P. J. S., G. F. 2000. Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. *Polymer*, 41, 2157-2168.
- KUU, W.-Y., CHILAMKURTI, R. & CHEN, C. 1998. Effect of relative humidity and temperature on moisture sorption and stability of sodium bicarbonate powder. *International journal of pharmaceutics*, 166, 167-175.
- LACERDA, L., PARIZE, A. L., FÁVERE, V., LARANJEIRA, M. C. M. & STULZER, H. K. 2014. Development and evaluation of pH-sensitive sodium alginate/chitosan microparticles containing the antituberculosis drug rifampicin. *Materials Science and Engineering: C*, 39, 161-167.

- LARRASILLA, T. E. H., VITELA, C. E. M. & SALAS, B. V. 2010. Microencapsulación de acetato de triclosan por polimerización interfacial para aplicaciones textiles. *Revista Iberoamericana de Polímeros*.
- LEAL, D., MATSUHIRO, B., ROSSI, M. & CARUSO, F. 2008. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr Res*, 343, 308-16.
- LEE, Y. H., LEE, J., MIN, D. B. & PASCALL, M. A. 2014. Effect of riboflavin on the photo-oxidative stability of vegetable oil in salad dressing. *Food Chem*, 152, 349-54.
- LI, X., ANTON, N., ARPAGAUS, C., BELLETEIX, F. & VANDAMME, T. F. 2010. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: the Büchi nano spray dryer B-90. *J Control Release*, 147, 304-10.
- LIZAMA, O. V. 2005. *Diseño de soportes combinados a base de polímeros naturales y sintéticos para su evaluación en cultivos celulares y la liberación de principios activos*. Universidad de La Habana.
- LOPRETTI, M., BARRIERO, F., FERNANDES, I., DAMBORIARENA, A., OTTATI, C. & OLIVERA, A. 2011. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. *INNOTECH*, 19-23.
- LUPO, P. B., GONZÁLEZ, A. C. & MAESTRO, G. A. 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3, 130-151.
- MA, B., QIN, A., LI, X., ZHAO, X. & HE, C. 2014. Bioinspired design and chitin whisker reinforced chitosan membrane. *Materials Letters*, 120, 82-85.
- MADUEÑO, R., BLÁZQUEZ, M., PINEDA, T. & CAÑAVERAS, F. 2011. Formación de bioconjugados de nanopartículas de oro con la proteína albúmina.
- MANTILLA, C., PEDRAZA, J. & LAVERDE, D. 2008. Utilización de estudios de potencial zeta en el desarrollo de un proceso alternativo de flotación de mineral feldespático. *Dyna*, 75, 65-71.
- MARTINS, I. M., BARREIRO, M. F., COELHO, M. & RODRIGUES, A. E. 2014. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245, 191-200.
- MAUPOEY, P. F., GRAU, A. M. A., SOROLLA, A. M. A. & BAVIERA, J. M. B. 2001. *Introducción al secado de alimentos por aire caliente*, Ed. Univ. Politéc. Valencia.
- MORA-HUERTAS, C., FESSI, H. & ELAISSARI, A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142.

- MORA, H. C. E., FESSI, H. & ELAISSARI, A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142.
- MORENO, R., MOYA, J. S. & REQUENA, J. 1987. Electroquímica de suspensiones cerámicas. *Boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio*, 26, 355-365.
- MORRISON, R. T. & BOYD, R. N. 1998. *Química orgánica*, Pearson Educación.
- MOSTAFA, T. B. & DARWISH, A. S. 2014. An approach toward construction of tuned chitosan/polyaniline/metal hybrid nanocomposites for treatment of meat industry wastewater. *Chemical Engineering Journal*.
- NEIRAS, PINILLA, P. A. & HENAO, M. J. A. 2011. Arcilla bentonítica modificada con quitosano para materiales compuestos biodegradables. *Dyna*, 167, 59-65.
- NGUYEN, V. S., DINH, M. H. & NGUYEN, A. D. 2013. Study on chitosan nanoparticles on biophysical characteristics and growth of Robusta coffee in green house. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 289-294.
- NUTRITION, N. R. C. S. O. D. C. 1978. *Nutrient requirements of dairy cattle*, National Academies.
- OROPESA, N. R. & JÁUREGUI, H. U. J. 2012. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 43.
- PAN, Y. L., PINNICK, R. G., HILL, S. C., NILES, S., HOLLER, S., BOTTIGER, J. R., WOLF, J. P. & CHANG, R. K. 2001. Dynamics of photon-induced degradation and fluorescence in riboflavin microparticles. *Applied Physics B*, 72, 449-454.
- PATEL, M., VADLAPATLA, R. K., PAL, D. & MITRA, A. K. 2012. Molecular and functional characterization of riboflavin specific transport system in rat brain capillary endothelial cells. *Brain Res*, 1468, 1-10.
- PINZON, M. 2010. *Nanotecnología de Alimentos*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia "UNAD".
- PORRAS, G. M. R. 2012. *Coaservación compleja partir de WPI y CMC tratados con ultrasonido y su aplicación en la liberación de linadol*. Maestría, Instituto Politécnico Nacional.
- RAIMOND, B. S. & CHARLES, E. 2002. Introducción a la química de los polímeros. *Editorial Reverte SA Segunda Reimpresin*.
- RAMAKRISHNA, S., MURUGAN, R. & KUMAR, T. S. 2010. *Biomaterials: a nano approach*, CRC.

- RAMOS, P. D., CARRIL, G. M. & FERNÁNDEZ, M. D. N., DE LA FUENTE LEOPOLDO 2000. Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Rev. Cubana Farm*, 34(1), 7-70.
- RAO, J. P. & GECKELER, K. E. 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36, 887-913.
- RAVIN, G. A. 2000. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 68, 327-332.
- RAYMENT, P., WRIGHT, P., HOAD, C., CIAMPI, E., HAYDOCK, D., GOWLAND, P. & BUTLER, M. F. 2009. Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 1: characterisation. *Food hydrocolloids*, 23, 816-822.
- ROCKWELL, P. L., KIECHEL, M. A., ATCHISON, J. S., TOTH, L. J. & SCHAUER, C. L. 2014. Various-sourced pectin and polyethylene oxide electrospun fibers. *Carbohydr Polym*, 107, 110-8.
- RODRÍGUEZ, I. C., CEREZO, A., SALEM I.I. 2000. Sistemas de liberación Bioadhesivos. *Ars Pharmaceutica*, 1, 115-128.
- RODRÍGUEZ, T. A. P. 2013. *Estudio de liberación de quercetina en hexano desde microcapsulas elaboradas con inulina como agente encapsulante y capsul como inductor de poros*. Universidad de Chile.
- ROMERO, B. P. 2009. Efecto los campos magneticos y el ultrasonido sobre la calidad textural y las propiedades funcionales en una emulsion de carne de búfalo (*bubalus bubalis*).
- SANCHES, S. C., RAMALHO, L. N., MENDES-BRAZ, M., TERRA, V. A., CECCHINI, R., AUGUSTO, M. J. & RAMALHO, F. S. 2014. Riboflavin (vitamin B-2) reduces hepatocellular injury following liver ischaemia and reperfusion in mice. *Food Chem Toxicol*, 67, 65-71.
- SANTOS, D. L. C. E., CANCIO, V. N., YENQUE, D. J., RAMÍREZ, M. D. & PALOMINO, P. M. 2005. El ultrasonido y su aplicación. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial*, 8, 25-28.
- SARMENTO, B., FERREIRA, D., VEIGA, F. & RIBEIRO, A. 2006. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*, 66, 1-7.
- SCHAFROTH, N., ARPAGAU, C., JADHAV, U. Y., MAKNE, S. & DOUROUMIS, D. 2012. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 90, 8-15.
- SEIXAS, F. L., FUKUDA, D. L., TURBIANI, F. R. B., GARCIA, P. S., PETKOWICZ, C. L. D. O., JAGADEVAN, S. & GIMENES, M. L. 2014. Extraction of pectin from passion fruit peel

- (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloids*, 38, 186-192.
- SEYMOUR, R. B. & CARRAHER, C. E. 1995. *Introducción a la Química de los Polímeros*, Reverté.
- SHPIGELMAN, A., KYOMUGASHO, C., CHRISTIAENS, S., VAN LOEY, A. M. & HENDRICKX, M. E. 2014. Thermal and high pressure high temperature processes result in distinctly different pectin non-enzymatic conversions. *Food Hydrocolloids*, 39, 251-263.
- SHUKLA, S., VERMA, K., JAIN, D. & VERMA, S. 2011. Pectin-based colon-specific drug delivery. *Chronicles of Young Scientists*, 2, 83.
- SUGA, M., ASAHINA, S., SAKUDA, Y., KAZUMORI, H., NISHIYAMA, H., NOKUO, T., ALFREDSSON, V., KJELLMAN, T., STEVENS, S. M. & CHO, H. S. 2014. Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. *Progress in Solid State Chemistry*, 42, 1-21.
- SUGIMOTO, T., KATO, T. & PARK, E. Y. 2014. Functional analysis of cis-aconitate decarboxylase and trans-aconitate metabolism in riboflavin-producing filamentous *Ashbya gossypii*. *J Biosci Bioeng*, 117, 563-8.
- SYED Z. ABDULLAHA, P. R. B., DERRICK J. HORNEB 2014. SEM imaging of membranes: Importance of sample preparation and imaging parameters. *Journal membrane science*, 463, 113-125.
- SYNYTSYA, A. 2003. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 54, 97-106.
- THAWATCHAI PHAECHAMUD, T. K. B., GARNPIMOL C. RITTHIDEJ A 2000. Chitosan citrate as film former: compatibility with water-soluble anionic dyes and drug dissolution from coated tablet. *ELSEVIER*, 198, 97-111.
- TRUJILLO, F. R. M., PLÁ, S. L., TAVERA, V. R., TAPIA, M. S. & CAVA, R. 2001. Estudio de la estabilidad microbiológica del melón (*Cucumis melo* L) mínimamente procesado por impregnación al vacío. *Arch. latinoam. nutr*, 51, 173-179.
- VEGA, V. J. A. 2011. *Obtención y caracterización de inulina entrecruzada como agente encapsulante de α -TOCOFEROL*. Universidad de Chile.
- VEMMER, M. & PATEL, A. V. 2013. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67, 380-389.
- VILLAMIZAR, M. L. & MARTÍNEZ, F. 2009. Determinación de las condiciones de microencapsulación de un baculovirus entomopatógeno mediante coacervación con Eudragit S100®. *Vitae*, 15.

- VILLENA, M., MORALES, H. M. E., GALLARDO, L. V. & RUIZ, M. M. A. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*, 50, 43-50.
- VRIGNAUD, S., BENOIT, J. & SAULNIER, P. 2011. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 8593-604.
- WU, J., ZHAO, X., REN, L., XUE, Y., LI, C., YU, G. & GUAN, H. 2014. Determination of M/G ratio of propylene glycol alginate sodium sulfate by HPLC with pre-column derivatization. *Carbohydr Polym*, 104, 23-8.
- YAO, Y., YONEZAWA, A., YOSHIMATSU, H., OMURA, T., MASUDA, S. & MATSUBARA, K. 2013. Involvement of riboflavin transporter RFVT2/Slc52a2 in hepatic homeostasis of riboflavin in mice. *Eur J Pharmacol*, 714, 281-7.
- YONEZAWA, A. & INUI, K. 2013. Novel riboflavin transporter family RFVT/SLC52: identification, nomenclature, functional characterization and genetic diseases of RFVT/SLC52. *Mol Aspects Med*, 34, 693-701.
- YOVAL, L. S., PALACIOS, L. M., SOBERANIS, M. P. & GUZMÁN, L. O. S. Potencial Zeta como una Herramienta para Determinar la Aglomeración de las Partículas en la Reducción del Volumen del Lodo a Disponer. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*.
- ZORKO, M., JOZINOVIĆ, B., BELE, M., HODNIK, N. & GABERŠČEK, M. 2014. SEM method for direct visual tracking of nanoscale morphological changes of platinum based electrocatalysts on fixed locations upon electrochemical or thermal treatments. *Ultramicroscopy*, 140, 44-50.