



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

**UNIVERSIDAD DE SONORA**

---

---

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA**

**FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE UN SISTEMA  
DE NANOCÁPSULAS A BASE DEL  
BIOPOLÍMERO KAPPA-CARRAGENINA**

**TESIS**

**Que para obtener el título de:**

**INGENIERO QUÍMICO**

**Presenta:**

**LUZ MARIA LEON MARTINEZ**

**Hermosillo, Sonora**

**Enero de 2015**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## VOTOS APROBATORIOS

Hermosillo, Sonora, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 2015.

**DR. MARTÍN ANTONIO ENCINAS ROMERO**  
**JEFE DEL DEPARTAMENTO**  
**INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA**

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional "**FORMACIÓN ESTABILIDAD DE UN SISTEMA DE NANOCÁPSULAS A BASE DEL BIOPOLÍMERO KAPPA-CARRAGENINA**", presentada por:

**LUZ MARIA LEON MARTINEZ**

La han revisado y cada uno de los miembros del Jurado da su **VOTO APROBATORIO**, ya que cumple con los requisitos para la obtención del Título de:

**Ingeniero Químico**

_____ Fecha	_____ Dr. Aarón de Jesus Rosas Durazo Presidente
_____ Fecha	_____ Dr. Luis Alfonso Almazán Holguín Secretario
_____ Fecha	_____ Dr. Paul Zavala Rivera Vocal
_____ Fecha	_____ M.C. Jesús Leonel Servín Rodríguez Suplente

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente quiero agradecer a mi director de Tesis al Dr. Aarón de Jesús Rosas Durazo por todo su esfuerzo, paciencia, dedicación, motivación, apoyo y por todo lo recibido durante a lo largo de este proyecto, a los miembros del Jurado al Dr. Paul Zavala Rivera, al Dr. Luis Alonso Almazan Holguín y al M.C. Jesús Leonel Servín Rodríguez por todo su apoyo, por brindarme conocimientos y orientarme en este proyecto.

Un agradecimiento a Rubio Pharma y en especial a NICDET por permitirme el uso de sus instalaciones y brindarme la oportunidad de poder desarrollarme en mis prácticas profesionales así como en mi trabajo de tesis. Un agradecimiento a mis compañeros de NICDET, que estuvieron conmigo en todo momento y brindaron su apoyo, en especial a M.C. Sarai Rochin Wong por todo su apoyo, dedicación, transmitir tus conocimientos en el tema y por brindarme sabios consejos tanto en lo profesional como en lo personal.

Quiero agradecer a los maestros de la carrera de Ingeniería Química por los conocimientos impartidos desde el inicio de mis estudios universitarios, quienes me dieron las herramientas que me formaron profesionalmente para lograr este objetivo.

Quiero agradecer a mi querida Universidad de Sonora pero sobre todo al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, y por brindarme la oportunidad de estudiar esta gran carrera.

## DEDICATORIA

---

**A Dios** por guiarme y permitirme llegar a culminar mis estudios universitarios. Por darme la fuerza para afrontar todos los obstáculos que se presenten en la vida, por esa paz y amor que me acompaña cuando más lo he necesitado. Por darme lo necesario para seguir adelante y lograr concluir este proyecto.

**A mis Padres** por estar siempre a mi lado brindándome todo su amor y apoyo incondicional, por sus consejos, sus valores, por la motivación y enseñarme que la perseverancia y constancia hacen la diferencia, por su trabajo y sacrificio durante estos años para que yo pudiera culminar mis estudios. Por ser mi fuerza en los momentos en los cuales estuve a punto de caer y no dejarme rendir. Este logro no es nada más es mío si no de ustedes. Gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Sé que no se los recuerdo lo suficiente pero los agradeceré siempre y los amare toda la vida.

**A mis hermanos** gracias por ser mis cómplices y compartir cada momento de mi vida. Espero darles el mejor ejemplo. Los quiero mucho.

**A mis amigos** que han estado a mi lado durante estos años. Quiero agradecerles por su amistad por estar conmigo en los mejores y peores momentos. Por darme los más lindos y locos recuerdos en el transcurso de mi vida. Cada uno sabe la historia que tenemos y por qué es especial. Los llevo en mi corazón siempre. Quiero agradecer en especial a uno de mis mejores amigos que me diera la carrera Alfonso Reyes muchas gracias por ser la persona que eres y por brindarme tu amistad. Eres una persona extraordinaria. Gracias por cuidarme, escucharme y apoyarme en las buenas y malas. Ser mi fiel amigo. Gracias por todo.

**A mi novio** por ser mi compañero a lo largo de este camino recorrido. Por todo tu amor, dedicación, paciencia, comprensión y apoyo en todo momento. No fue fácil el camino pero siempre me motivaste para lograr este momento. Gracias por todo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO .....	I
INDICE DE FIGURAS .....	III
INDICE DE TABLAS.....	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN.....	VII
<b>I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO .....</b>	<b>1</b>
I.1. JUSTIFICACIÓN .....	2
I.2. OBJETIVO GENERAL.....	3
I.3. OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
II.1. BIOPOLÍMEROS .....	5
II.1.1 POLIELECTROLITO .....	6
II.1.2 KAPPA-CARRAGENINA .....	7
II.2. SURFACTANTES.....	10
II.2.1 SURFACTANTE CATIÓNICO .....	10
II.2.2 CLORURO DE DODECILTRIMETILAMONIO (DTAC) .....	11
II.2.3 APLICACIONES EN LA FARMACÉUTICA.....	12
II.2.4 COMPLEJO POLIELECTROLITO-SURFACTANTE (PE-S) .....	12
II.2.5 APLICACIONES .....	14
II.3 APLICACIONES DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA FARMACÉUTICA.....	14
II.4 NANOENCAPSULACIÓN.....	18
II.4.1 NANOENCAPSULACIÓN A BASE DE POLÍMEROS Y SUS APLICACIONES EN BIOMÉDICA FARMACÉUTICA .....	21

<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
III.1.	MATERIALES.....	25
III.2.	METODOLOGÍA.....	26
III.2.1.	PROCEDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS DEL SISTEMA DE PARTÍCULAS DE NANOEMULSIÓN (NE).....	26
III.2.2.	PROCEDIMIENTO PARA EL RECUBRIMIENTO DE PARTÍCULAS DE NE A BASE DE BIOPOLÍMERO $\kappa$ -CAR PARA LA GENERACIÓN DE UN SISTEMA DE NANOCÁPSULAS (NC).....	28
III.2.3	PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LAS PRUEBAS DE ESTABILIDAD PARA LOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS DE NANOEMULSIÓN (NE) Y NANOCÁPSULAS (NC) ..	30
<b>III.3.</b>	<b>MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN.....</b>	<b>32</b>
III.3.1.	DISPERSION DE LUZ DINAMICA (DLS) .....	33
III.3.2.	POTENCIAL ZETA ( ).....	34
III.3.3.	MICROSCOPIO DE FUERZA ATOMICA (AFM) .....	35
III.3.4	MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (SEM) .....	35
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
IV.1	Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Potencial Zeta ( ).....	37
IV.2	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) .....	48
IV.3	MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM) .....	50
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>52</b>
V.1	CONCLUSIONES .....	53
<b>VI.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>55</b>
VI.1	ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	56
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Unidad disacárida de repetición de los tres tipos conformacionales más importantes de la familia de la Carragenina.....	8
<b>Figura 2.</b> Diagrama de la clasificación general de los surfactantes.....	10
<b>Figura 3.</b> Fórmula de un compuesto cuaternario del grupo amonio ( $-NR_4^+$ )...11	
<b>Figura 4.</b> Estructura molecular del Cloruro de Dodeciltrimetilamonio (DTAC).....	11
<b>Figura 5.</b> Esquema de la estructura de autoensamblaje de un polielectrolito y un surfactante para la formación de un complejo.....	13
<b>Figura 6.</b> Aplicaciones de un complejo polielectrolito-surfactante (PE-S). Figura 6a (1-3) complejos con superficies de materiales; Figura 6a (1-3) complejos para microencapsulados.....	14
<b>Figura 7.</b> Aplicaciones de la nanotecnología en la biomedicina.....	16
<b>Figura 8.</b> Clasificación de estructuras de nanocápsulas: (a) núcleo líquido, (b) matriz polimérica y (c) principio activo.....	18
<b>Figura 9.</b> Procedimientos generales de los diferentes métodos de preparación de sistemas de nanocápsulas.....	20
<b>Figura 10.</b> Preparación de las nanocápsulas por el método de nanoprecipitación.....	21
<b>Figura 11.</b> Nanoencapsulación y su potencial aplicación en la biomédica.....	23
<b>Figura 12.</b> Diagrama de flujo para la elaboración de la nanoemulsión (NE).....	27
<b>Figura 13.</b> Diagrama de flujo para la elaboración de nanocápsulas (NC) recubiertas con $\kappa$ -CAR.....	29

<b>Figura 14.</b> Evolución del tamaño de partícula y Potencial Z ( $\zeta$ ), en función del factor de dilución en solvente acuoso a 25 °C para los sistemas de partículas de Nanoemulsión (NE).....	37
<b>Figura 15.</b> Evolución del tamaño de partícula y Potencial Z ( $\zeta$ ), en función del factor de dilución en solvente acuoso a 25 °C para los sistemas partículas de Nanocápsulas (NC), recubiertos con $\kappa$ -CAR.....	38
<b>Figura 16.</b> Evolución del Potencial Z ( $\zeta$ ), respecto a la concentración del biopolímero $\kappa$ -CAR, ambos en función del factor de dilución en solvente acuoso a 25 °C para los sistemas partículas de Nanocápsulas (NC).....	40
<b>Figura 17.</b> Esquemmatización de la interacción de la cadena del polielectrolito ( $\kappa$ -CAR) aniónico con la partícula de NE catiónica, para la formación de una partícula de NC.....	40
<b>Figura 18.</b> Evolución del tamaño de partícula y potencial Z ( $\zeta$ ) en buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C en función del tiempo para los sistemas de partículas de nanoemulsión (NE): a) Dilución 1:30, b) Dilución 1:75 y c) Dilución 1:110.....	42
<b>Figura 19.</b> Evolución de la distribución de tamaño (d.nm) de partícula para los sistemas de partículas de NE en el buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C en función del tiempo, para las diluciones: a) Dil 1:30, b) Dil 1:75 y c) Dil 1:110.....	43
<b>Figura 20.</b> Evolución del tamaño de partícula y potencial Z ( $\zeta$ ) en el buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C en función del tiempo para los sistemas de nanocápsulas (NC): a) Dilución 1:30, b) Dilución 1:75 y c) Dilución 1:110.....	44
<b>Figura 21.</b> Evolución de la distribución de tamaños (d.nm) de partícula para los sistemas de partículas de NC en el buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C en función del tiempo, para las diluciones: a) Dil 1:30, b) Dil 1:75 y c) Dil 1:110.....	46
<b>Figura 22.</b> Composición de los resultados del índice de polidispersidad (PDI), correspondientes a la evolución de los tamaños de partícula de NE y NC presentados para los estudios de estabilidad en el buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C de las Figuras 19 y 21, respectivamente.....	47

**Figura 23.** Imagen de AFM de la topografía de una partícula de NE. a) Dos dimensiones, 2D; b) Tres Dimensiones, 3D y c) Tres dimensiones con perspectiva de altura.....48

**Figura 24.** Imágenes de AFM de la topografía de los sistemas de partículas de NC a distintas diluciones: Dilución 1:30 (a-1 a a-3); Dilución 1:50 (b-1 a b-3); Dilución 1:75 (c-1 a c-3) y Dilución 1:110 (d-1 a d-3). 1) Dos dimensiones, 2D; 2) Tres dimensiones, 3D y 3) Tres dimensiones con perspectiva de altura.....49

**Figura 25.** Imagen SEM de partículas de NC a Dil 1:75.....50

**Figura 26.** Imagen SEM de partículas de NC a Dil 1:110.....51

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Grupos funcionales más comunes en polielectrolito.....	6
<b>Tabla II.</b> Sistemas de polielectrolito más comunes.....	7
<b>Tabla III.</b> Tipos de nanoestructuras utilizadas para aplicaciones en nanomedicina.....	17
<b>Tabla IV.</b> Relación de Nanoemulsión (NE), $\kappa$ -CAR y H <sub>2</sub> O para diferentes diluciones.....	29

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la síntesis y caracterización de nanocápsulas de posible aplicación potencial biomédica en la entrega y liberación específica de fármacos. Para tal efecto, se realizó una nanoemulsión que fue obtenida por el método de nanoprecipitación o emulsificación espontánea, la cual se compone por una fase orgánica que dará lugar a un núcleo oleoso estabilizado con un surfactante en una fase solvente-acuoso. Los sistemas de nanocápsulas, se obtuvieron a partir de diferentes diluciones de la nanoemulsión donde cada dilución se recubrió con una cantidad muy pequeña y fija del biopolímero kappa-carragenina ( $\kappa$ -CAR) a condiciones acuosas y temperatura ambiente. Para ambos sistemas, también les fueron realizadas pruebas de estabilidad en una solución y temperatura fisiológicos en función del tiempo.

Se utilizaron diferentes técnicas de caracterización, como Dispersión de Luz Dinámica (DLS), Potencial Zeta ( ), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) con el propósito de obtener una mayor información sobre el tamaño, carga superficial y estabilidad de los sistemas de nanoemulsión y de nanocápsulas.

Como resultado de tamaño de la nanoemulsión se obtuvo un promedio de ~240 nm y se obtuvieron nanocápsulas con un tamaño promedio ~250-330 nm. En potencial zeta ( ) de nanoemulsión se obtuvo una carga de +80 y de nanocápsulas una carga de -30 mV. Dichos parámetros variaron en función de la dilución y condiciones de ambiente fisiológicos.

## **I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO**

## **I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO**

## **I.1. Justificación**

La nanociencia es la encargada del estudio, la comprensión y el control de fenómenos, así como la manipulación de materiales a escala nanométrica. La nanotecnología es el campo donde todas las herramientas y tecnologías empleadas en el campo de la nanociencia. La nanotecnología es un campo de las ciencias aplicadas al control y manipulación de la materia a una escala menor que un micrómetro, es decir, la nanotecnología estudia, diseña, crea, sintetiza, manipula y aplica materiales, aparatos y sistemas que controlan la materia a nanoescala. Dentro de la nanotecnología se encuentra la Bionanotecnología, esta disciplina se encarga del estudio de la interacción entre los materiales nanométricos y los sistemas biológicos, desarrollando herramientas para prevenir y tratar enfermedades en el cuerpo humano.

La nanotecnología tiene grandes aportaciones en el área de la medicina y tiene los proyectos más avanzados en esta área, particularmente en lo relacionado al tratamiento de enfermedades infecciosas, el tratamiento de algunos tipos de cáncer y el transporte dirigido de fármacos.

Las nanocápsulas son sistemas nanométricos vesiculares conformados de un reservorio interno, que puede estar constituido por agua o aceite, rodeado y estabilizado de una cubierta polimérica. Las nanocápsulas pueden dividirse en dos grandes grupos dependiendo de los materiales empleados: materiales sintéticos y por biomateriales. Para este trabajo, se ha desarrollado y estudiado un sistema de nanocápsulas recubiertos por el biopolímero  $\kappa$ -CAR.

La finalidad de estos sistemas de nanocápsulas con un núcleo de aceite de oliva y recubiertos por  $\kappa$ -CAR son las de un posible uso en la medicina, particularmente relacionado con el transporte dirigido de fármacos, debido a las propiedades de biocompatibilidad que posee el biopolímero mencionado.

## **I.2. Objetivo general**

Desarrollar y caracterizar el tamaño y carga de un sistema de nanocápsulas a base de biopolímero kappa-carragenina. Los cuales pueden tener usos potenciales en biomedicina.

## **I.3. Objetivos Particulares**

Para lograr tal objetivo se plantean los siguientes objetivos particulares:

- Generar un sistema de nanocápsulas a base de un núcleo de aceite de oliva estabilizado con un surfactante y recubiertas por el biopolímero  $\kappa$ -CAR mediante la técnica de nanoprecipitación espontánea.
- Caracterizar la distribución del tamaño de partícula del sistema de nanocápsulas recubiertas con el biopolímero  $\kappa$ -CAR.
- Caracterizar el potencial de carga de la partícula del sistema de nanocápsulas recubiertas con el biopolímero  $\kappa$ -CAR.
- Realizar pruebas de estabilidad, monitoreando la distribución del tamaño y carga de partícula en un medio a pH y temperatura fisiológicos en función del tiempo.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

## II.1. Biopolímeros

La aplicación de los biopolímeros en el campo de la medicina y en la farmacéutica ha evolucionado a los avances en las tecnologías de síntesis, purificación y análisis, esto ha permitido desarrollar el tratamiento y vías de administración en los cuales los biopolímeros son parte de su composición. Este hecho que la ciencia de polímeros cada vez tenga mayor auge en el campo de la medicina y farmacéuticas. Los polímeros biocompatibles se pueden obtener de fuentes naturales o sintéticas y al ser introducidos en el sistema biológico se consideran biomateriales poliméricos o biopolímeros. [1]

Con el paso del tiempo ocurren cambios en las propiedades de los biopolímeros como el cambio en forma y color, todo esto debido al desgaste que es consecuencia de su interacción con la luz, químicos, calor y a otros agentes, conllevando a la degradación del biopolímero. Podemos realizar una clasificación dependiendo del tiempo de duración en el que se espera que mantengan su funcionalidad. [1][2]

- Carácter permanente: Se refiere a los biopolímeros cuya función principal es funcionar como reemplazo total o parcial de órganos o tejidos que han sufrido degradación o destrucción a causa de algunas anomalías. [3]
- Carácter temporal: Se refiere a los biopolímeros degradables que están diseñados para tener una duración específica, porque su funcionalidad lo requiere. [3]

Al utilizar un biopolímero es necesario tomar en cuenta dos aspectos que tienen un impacto en el funcionamiento y en la salud del paciente. El primer aspecto es el efecto que tiene el organismo al estar en contacto con el biopolímero y el segundo aspecto es el efecto que tiene el biopolímero en el organismo. Para la Ingeniería, representa un gran desafío el desarrollo de nuevos biopolímeros debido a las complicaciones que pueden surgir para que el producto final pueda cumplir su cometido. [3][4]

### II.1.1 Polielectrolito

De la manera más simple se puede definir un polielectrolito (PE) como un polímero que se disocia en especies cargadas en solución. Normalmente el término polielectrolito es empleado para sistemas polímeros que consisten de macroiones; es decir, macromoléculas que portan grupos iónicos unidos covalentemente a su estructura, los cuales a su vez deben ser compensados por contraiones de cargas contrarias para garantizar la electroneutralidad del sistema. [5]

Cualquier estructura química, macromolecular puede ser transformada en PE por medio de la unión covalente de un número razonable de grupos iónicos en la cadena polimérica. Sin embargo; los grupos funcionales capaces de ionizarse en medio acuoso que pueden ser introducidos a estas cadenas son relativamente pocos. En la Tabla I; se muestra los grupos funcionales que comúnmente son encontrados en PE, tanto del tipo aniónico como el tipo catiónico. [5]

**Tabla I.** Grupos funcionales más comunes en polielectrolito.

Aniónicos	Catiónicos
$-\text{COO}^-$	$-\text{NH}_3^+$
$-\text{CSS}^-$	$=\text{NH}_2^+$
$-\text{OSO}_3^-$	$\equiv\text{NH}^+$
$-\text{SO}_3^-$	$-\text{NR}_3^+$

Hoy en día se conoce una amplia gama de polielectrolito. La Tabla II muestra una lista de algunos de ellos.

**Tabla II.** Sistemas de polielectrolitos más comunes.

Polisacáridos Aniónicos y catiónicos
Ácidos Nucleicos
Gelatina
Ácidos Lignosulfónicos
Ácidos poliacrílicos y polimetacrílicos
Copolímeros del ácido y del anhídrido maléico
Acido poli(estirensulfónico)
Poli(etilénimina)
Poli(etilénaminas) y poli(amidaminas)
Poli(cloruro de dialil-dimetilamonio)
Homo y Copolímeros de esteres catiónicos del ácido acrílico

### II.1.2 Kappa-Carragenina

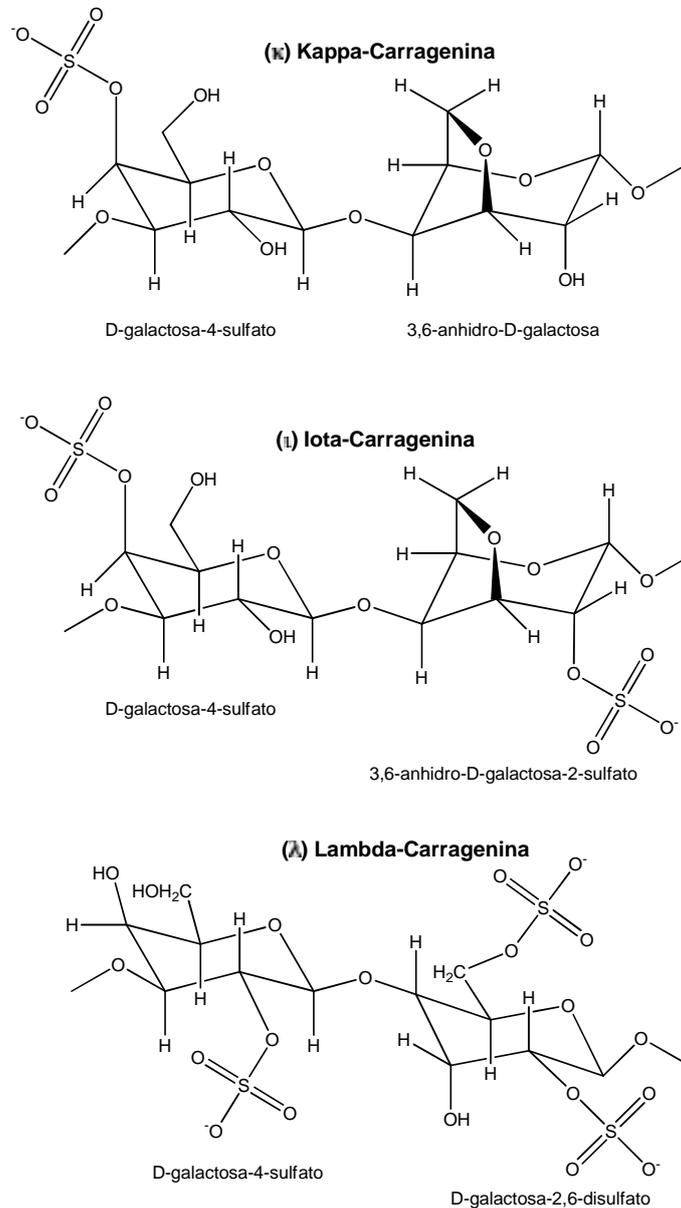
Los polisacáridos, se han utilizado ampliamente en la industria de alimentos como espesantes, gelificantes, entre otras. Recientemente están siendo muy aplicados en la industria farmacéutica para la administración de fármacos. [6]

En los últimos años, se ha investigado más sobre los microorganismos marinos tales como bacterias, microalgas y algas marinas; los cuales han manifestado poseer materiales de propiedades relevantes. Entre ellos, las algas marinas son las fuentes más abundantes de polisacáridos tales como Carragenina y Alginato. [9]

La Carragenina es el nombre genérico para una familia de polisacáridos sulfatados de alto peso molecular, un hidrocoloide extraído de algas marinas rojas de las especies *Gigartina*, *Hypnea*, *Eucheuma*, *Chondrus* y *Iridaea*. Se compone de unidades de galactosa y anhidrogalactosa unidas por uniones glicosídicas. [8]

Las diferencias principales que influyen en las propiedades del tipo de carragenina son el número y posición de los grupos éster de sulfato, así como

el contenido de 3,6-anhidro-galactosa (3,6-AG). Los tres tipos más importantes de carragenina (importantes desde el punto de vista comercial) son kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) y lambda ( $\lambda$ ), y sus estructuras se presentan en la Figura 1.



**Figura 1.** Unidad disacárida de repetición de los tres tipos conformacionales más importantes de la familia de las Carrageninas.

Los mayores niveles de éster sulfato implican una menor fuerza de gelificación. La carragenina tipo kappa contiene de 25% a 30% de éster sulfato y de 28% a 35% de 3,6-AG. La carragenina tipo iota contiene de 28% a 35% de éster

sulfato y de 25% a 30% de 3,6-AG. La carragenina tipo lambda contiene de 32% a 39% de éster sulfato y no contiene 3,6-AG. [6,16]

Todas las fracciones de la carragenina son solubles en agua, que es insoluble en disolventes orgánicos, aceite o grasas. Sin embargo; su solubilidad en agua depende esencialmente de los niveles de grupos sulfato (muy hidrófilos) y en sus cationes. Los principales cationes ionizables que se encuentran en la carragenina son sodio, potasio, calcio y magnesio, pero también otros iones pueden ocurrir en frecuencia más baja. En consecuencia, la proporción de fracciones de sulfato y el equilibrio de los cationes en solución acuosa determinan la viscosidad de las soluciones y la fuerza de geles, que representan las principales características exploradas por las industrias alimentarias y farmacéuticas en el uso de la carragenina como espesante, gelificante y agentes estabilizantes.

Las últimas aplicaciones de la carragenina en los sistemas de administración de fármacos, basándose en las características especiales de la carragenina tales como la fuerte carga negativa y de gelificación, se ha utilizado como agente gelificante para la liberación controlada de fármacos y de retención prolongada.

Algunas de las principales aplicaciones de la carragenina y sus derivados en diversos sistemas de administración de fármacos son en las tabletas orales de liberación prolongada, mezcla de polímero como la matriz de liberación prolongada por vía oral tabletas, como agente gelificante, como microsistemas/nanopartículas basados en carragenina para administración de fármacos.

Las nanopartículas a base de carragenina se pueden obtener en un entorno acuoso en condiciones muy suaves basadas en la interacción electrostática, evitando el uso de disolventes orgánicos u otros procesos agresivos. [9]

## II.2. Surfactantes

Los surfactantes son generalmente moléculas orgánicas anfífilas que en medios acuosos migran hacia su superficie orientándose de tal manera que su componente hidrosoluble permanezca dentro de la fase acuosa y el hidrófobo quede fuera. Tal organización y agregación de las moléculas de surfactante en las interfaces agua-aire o agua-aceite afecta a las propiedades superficiales. [10]

Las propiedades inusuales de las soluciones acuosas de surfactantes se pueden atribuir a la presencia de grupo de cabeza hidrófilo y cadena hidrófoba (o cola) en la molécula. El grupo de cabeza polar o iónico normalmente interactúa fuertemente con un ambiente acuoso. [11] De hecho, es la naturaleza del grupo de cabeza polar que se utiliza para clasificar los surfactantes, tal y como se ilustra en la Figura 2.

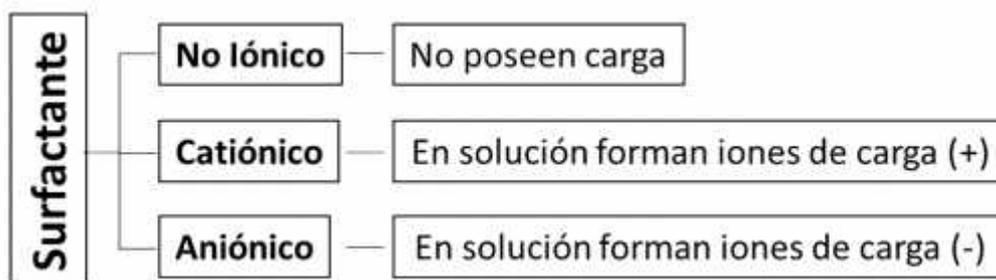
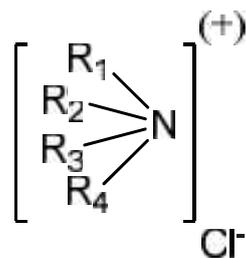


Figura 2. Diagrama de la clasificación general de los surfactantes.

### II.2.1 Surfactante Catiónico

Son aquellos que en solución forman iones, resultando cargado positivamente el grupo hidrófobo de la molécula. En general, son compuestos cuaternarios de amonio o una amina grasa en medio ácido. [12]

El término "surfactante catiónico" se refiere a los compuestos que contienen por lo menos una cadena de 8 a 25 átomos de carbono, derivada de un ácido graso o de un derivado petroquímico y un nitrógeno cargado positivamente, el anión suele ser un Cl<sup>(-)</sup>, Br<sup>(-)</sup>, OH<sup>(-)</sup> y SO<sub>4</sub><sup>(-2)</sup>.

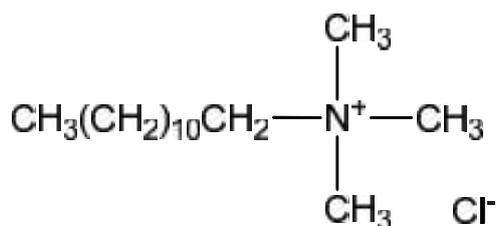


**Figura 3.** Fórmula de un compuesto cuaternario del grupo amonio ( $-NR_4^+$ ).

La mayoría de los agentes catiónicos están constituidos por una cadena larga de sales de amonio cuaternarios o sales de alquilaminas. La cadena larga constituye el grupo hidrofóbico, en tanto que el hidrofílico pequeño y altamente ionizado. Estos surfactantes son de menor interés que los agentes aniónicos y no-iónicos pero reside su importancia por su eficiencia bactericida, germicida, algicida, capacidad para formación de micelas, etc. En el catión, el radical (R), representa la cadena larga; los otros radicales pueden estar reemplazados por átomos de hidrógeno u otros radicales alquílicos.

### II.2.2 Cloruro de Dodeciltrimetilamonio (DTAC)

El Cloruro de Dodeciltrimetilamonio (DTAC) es un surfactante catiónico, el cual posee dos propiedades importantes. Primero se absorben sobre una superficie cargada negativamente, y segundo muchos de ellos tienen propiedades bactericidas. En su carácter catiónico, tiene la característica de disminuir la tensión superficial y además tiene la capacidad de formar micelas en medios acuosos y no acuosos. La Figura 4 se muestra la estructura molecular del DTAC.



**Figura 4.** Estructura molecular del Cloruro de Dodeciltrimetilamonio (DTAC).

### **II.2.3 Aplicaciones en la Farmacéutica**

La absorción, distribución y metabolismo de los surfactantes, es un tema de estudio muy relevante para una mejor comprensión de los mecanismos por los cuales estas sustancias interactúan en los medios biológicos sobre los cuales son utilizados. [13]

Los surfactantes intervienen de dos maneras en la formación de emulsiones; por una parte reducen la tensión superficial entre los líquidos inmiscibles; por otro lado, forman una película entre el líquido disperso (fase interna) y el medio continuo (fase externa), actuando como una barrera protectora que retarda o impide la separación de dos líquidos inmiscibles. El tipo de emulsión a formarse ya sea agua-en-aceite (W/O) y/o aceite-en-agua (O/W), depende del tipo de surfactante utilizado, de la naturaleza química de los otros constituyentes del sistema y de la proporción relativa de las fases inmiscibles.

La función emulsionante de los surfactantes es probablemente la más importante para aplicaciones farmacéuticas y cosmetológicas, debido a que las emulsiones presentan ventajas considerables sobre otros tipos de preparaciones: son fáciles de aplicar, relativamente económicas (gracias a su gran proporción de agua), y permiten el uso simultáneo de sustancias hidrosolubles y liposolubles. [13] Las emulsiones aplicadas en la farmacéutica son utilizadas para la administración de medicamentos. El tipo de emulsión empleada (W/O y/o O/W) está restringida en dependencia de la vía de administración del fármaco. [14] Unos de los retos que presentan las emulsiones aplicadas para la administración de fármacos es la biocompatibilidad de los medicamentos que depende de diversos factores como la repartición del principio activo entre las fases inmiscibles, tamaño de partícula, viscosidad de la fase externa, entre otras.

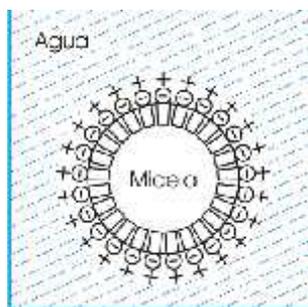
### **II.2.4 Complejo Polielectrolito-Surfactante (PE-S)**

En muchas aplicaciones industriales se utilizan espumas y emulsiones que deben mantenerse estables durante tiempos prolongados y los complejos polielectrolito (como en el caso de Carragenina) - surfactante han demostrado

ser útiles para alcanzar la estabilidad deseada. [15,16] Los complejos PE-S exhiben características conformacionales, estructurales y dinámicas muy diferentes a la de sus componentes puros y poseen una amplia gama de aplicaciones y han sido objeto de varios estudios. [17]

Las interacciones entre los polielectrolito con cargas opuestas y surfactante son bastante fuertes y pueden inducir la formación de complejos, resultando a menudo en estructuras altamente ordenadas. Ambas interacciones electrostáticas entre los componentes cargados y de las interacciones hidrófobas entre la estructura polimérica y las cadenas del surfactante son importantes en la conducción de la auto-ensamblaje de moléculas para formar estructuras ordenadas (Figura 5). Estas estructuras bien definidas de polielectrolito y complejos surfactantes manifiestan propiedades mecánicas, ópticas, eléctricas y biológicas, que podrían ser muy útiles en cosméticos, alimentos, pinturas, revestimientos, medicina y otras tecnologías. [18]

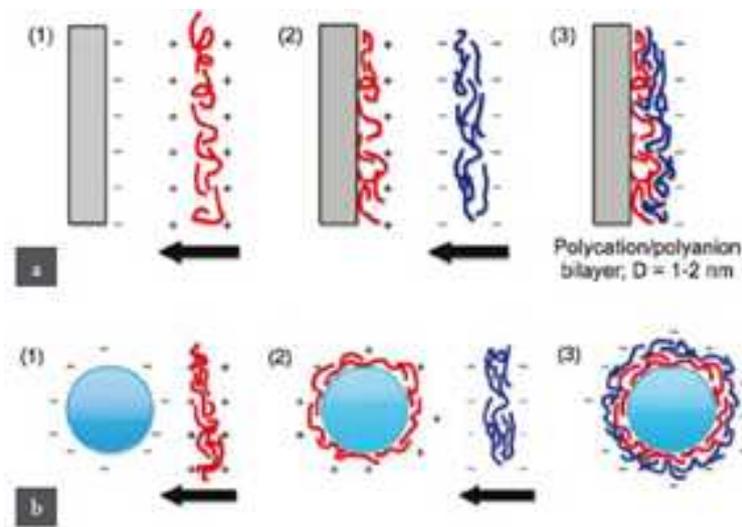
Hay métodos generalizados para la producción de materiales poliméricos ordenados. Sin embargo, la formación de complejos de polielectrolito de carga opuesta a través el proceso de auto-ensamblaje ofrece una serie de ventajas: son fáciles de sintetizar y aislar; poseen una organización controlable para la construcción de una amplia variedad de estructuras ordenadas. Por lo tanto, es posible manipular las estructuras supramoleculares en una escala nanométrica con el fin de diseñar funciones específicas entre el polielectrolito y surfactante (complejos PE-S). [18] Al añadir una solución de polielectrolito a una solución de surfactante de carga opuesta o viceversa.



**Figura 5.** Esquema de la estructura de autoensamblaje de un polielectrolito y un surfactante para la formación de un complejo.

## II.2.5 Aplicaciones

Los complejos PE-S, exhiben características conformacionales, estructurales y dinámicas muy diferentes a la de los componentes en estados puros, las cuales son aprovechadas en una amplia gama de aplicaciones en la biotecnología y medicina, entre otros. En estos campos los complejos PE-S, son aplicados con fines de microencapsulación de fármacos, enzimas, células, microorganismos, generación de multicapas como biosensores, inmovilización de proteínas por formación del complejo y complejos en donde se utilizan como vectores en terapia génica Figura 6b(1-3).



**Figura 6.** Aplicaciones de un complejo polielectrolito-surfactante (PE-S). Figura 6a (1-3) complejos con superficies de materiales; Figura 6a (1-3) complejos para microencapsulados.

## II.3 Aplicaciones de la nanotecnología en la farmacéutica

La nanotecnología se considera cada vez más como la tecnología del futuro, en esta disciplina los científicos están adquiriendo habilidades para comprender y manipular materiales a la escala de átomos y moléculas.

La investigación en nanotecnología ha desarrollado grandes avances en las áreas de la comunicación, la ingeniería, la química, la física, la robótica, la biología y la medicina. En la medicina, la nanotecnología ha sido utilizada para

la administración de fármacos terapéuticos y el desarrollo de tratamientos para una variedad de enfermedades y trastornos. Por lo tanto, hay avances muy significativos en estas disciplinas.

Los sistemas de administración de fármacos han atraído cada vez una mayor atención, cuyo objetivo es ofrecer medicamentos de impacto a un lugar específico y en períodos de tiempo definidos. El objetivo de esta administración es transportar cantidades adecuadas de medicamentos a los sitios deseables (sitios blancos), tales como tumores, tejidos enfermos, etc.; mientras que minimizan los efectos secundarios no deseados de los fármacos administrados de maneras tradicionales. [19]

En los últimos años, los sistemas de micro y nano escala pueden aumentar la eficiencia de los tratamientos terapéuticos de numerosas maneras, ya que tienen la capacidad de detectar y responder a los enfermedades directamente en el sitio, afectar a las células y tejidos dañados debido a una enfermedad y fisiológicamente mejorando así la calidad de vida de un paciente rápidamente. [20]

Los sistemas micro y nano escala son una nueva clase de agentes terapéuticos inteligentes y son sistemas de suministro que están diseñados para realizar funciones de detección, aislamiento y/o liberación de agentes terapéuticos para tratamiento de enfermedades.

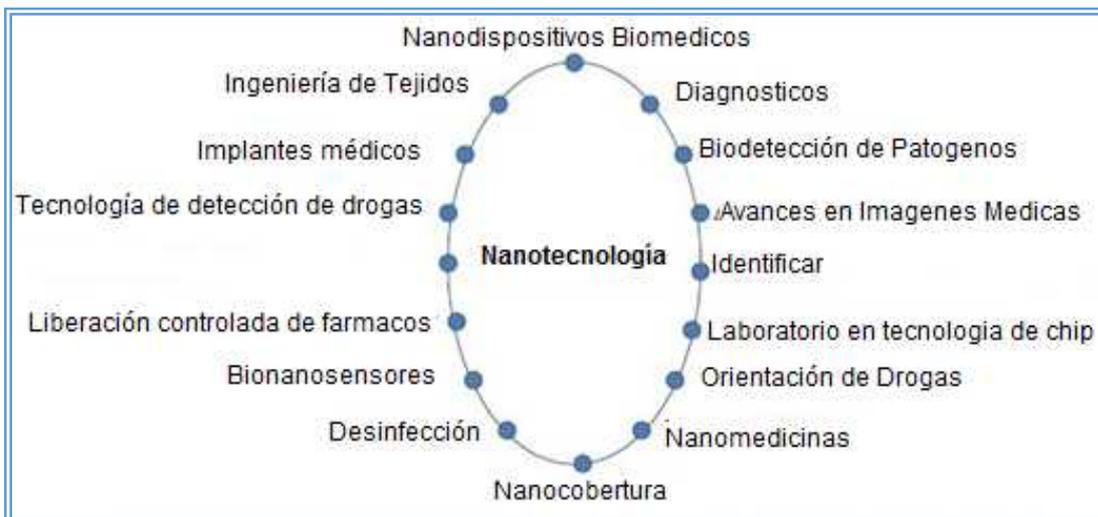
En los biomateriales el área de las nanoestructuras poliméricas tales como los polímeros ramificados, dendrímeros y micelas poliméricas han tenido un gran crecimiento en la ciencia debido a sus propiedades y gran potencial para la administración de fármacos. [21]

Para utilizar un polímero para la administración de un medicamento tiene que ser biocompatible, biodegradable, no-tóxico, etc. Como resultado de su capacidad de degradación además de la difusión del fármaco a través del material polimérico contribuyen a la liberación del fármaco.

Las micelas poliméricas, se caracterizan por ser nanométricas (>100 nm), conformadas de polímeros en bloque anfífilicos con una estructura de núcleo-corteza. De esta manera las nanopartículas poliméricas están conformadas de

núcleos de polímeros hidrófobos biodegradables protegidas por un polímero que estabiliza su dispersión en medios acuosos. El agrupamiento de núcleo-corteza, los hacen atractivos para su uso en sistemas de administración de fármacos en aplicaciones clínicas, especialmente para medicamentos hidrófobos caracterizados por su muy baja solubilidad en agua. [19]

Las nanopartículas metálicas, se han utilizado en diversas aplicaciones biomédicas, incluyendo sondas para microscopía electrónica para visualizar los componentes celulares, la administración de fármacos (vehículo para la administración de fármacos, proteínas, péptidos, plásmidos, ADN, etc.), detección, diagnóstico y tratamiento (dirigida y no dirigida).



**Figura 7.** Aplicaciones de la nanotecnología en la biomedicina.

Se espera que los avances en nanomedicina puedan proporcionar soluciones a muchos de los problemas de la medicina moderna. Se discute la comercialización de la nanomedicina, concentrándose sólo en desarrollos de productos que se encuentren en los ensayos clínicos o que ya han sido aprobados para su uso. Además las nanopartículas pueden ser incorporadas dentro de nanocompositos y recubrimientos, por lo cual deben ser acotadas en otra clasificación. Caso específico, en la actualidad ya existe un alto nivel de

investigación y desarrollo comercial de formulaciones que incluyen liposomas y emulsiones a nanoescala como plataformas de liberación de fármacos. [22]

**Tabla III.** Tipos de nanoestructuras utilizadas para aplicaciones en nanomedicina.

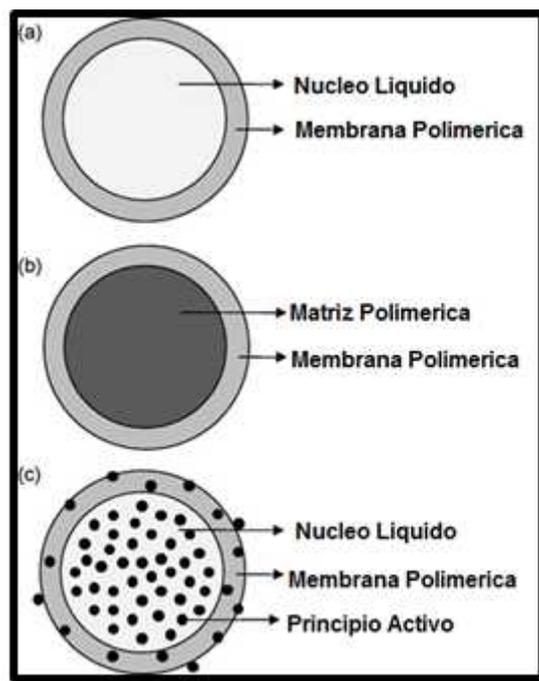
Nanocomponente	Investigación			Comercial		
	Terapéutico	Dispositivo	Total	Terapéutico	Dispositivo	Total
NP firme	3	12	15	0	28	28
Nanodispersión	5	0	5	1	1	2
NP Polimérica	23	0	23	9	0	9
NP Proteica	4	0	4	2	0	2
Liposoma	53	0	53	7	1	8
Emulsión	18	1	19	9	0	9
Micelas	8	0	8	3	1	4
Dentrímeros / Flexímeros	2	2	4	0	3	3
Virosoma	6	0	6	2	0	2
Nanocomposito	0	0	0	0	18	18
NP Recubierta	0	2	2	0	6	6
Material Nanoporoso	0	3	3	0	2	2
Nanopatrones	0	2	2	0	2	2
Puntos Cuánticos	0	1	1	0	4	4
Fulerenos	0	1	1	0	0	0
Hidrogel	0	0	0	0	1	1
Nanotubos de Carbono	0	1	1	0	0	0
<b>Totales</b>	<b>122</b>	<b>25</b>	<b>147</b>	<b>53</b>	<b>67</b>	<b>100</b>

La Tabla III presenta un desglose de tipos de nanoestructuras utilizados como productos en nanomedicina. Las diversas formas de nanopartículas eran las categorías más prevalentes, con números significativos en ambos productos comerciales y aplicaciones en investigación. [22]

## II.4 Nanoencapsulación

Las nanocápsulas son un sistema vesicular que están constituidas por un núcleo y un material de pared que envuelve el núcleo, donde el núcleo es un producto sólido, líquido o gaseoso, que está envuelto por el material de pared sólido, por lo general polímero. Se han encontrado con un potencial prometedor como vía de administración de fármacos eficaces para la administración de fármacos.

En este trabajo se desarrolló un modelo de nanocápsulas que están compuestas por un núcleo oleoso, surfactante y una capa hidrófila compuesta por un biopolímero. Se han encontrado con un potencial prometedor como vía de administración de fármacos eficaces para la administración de fármacos.



**Figura 8.** Clasificación de estructuras de nanocápsulas: (a) núcleo líquido, (b) matriz polimérica y (c) principio activo

Las nanocápsulas se pueden obtener por medio de diferentes métodos de preparación como: la nanoprecipitación, emulsión de difusión, doble emulsión, emulsión de coacervación, polímero de recubrimiento y la de capa por capa. [23] Se debe de realizar un análisis de las nanocápsulas de tamaño, carga

(Potencial Z), pH, espesor, eficiencia de encapsulación, la liberación de la sustancia activa, estabilidad y realizar pruebas farmacológicas *in vivo*.

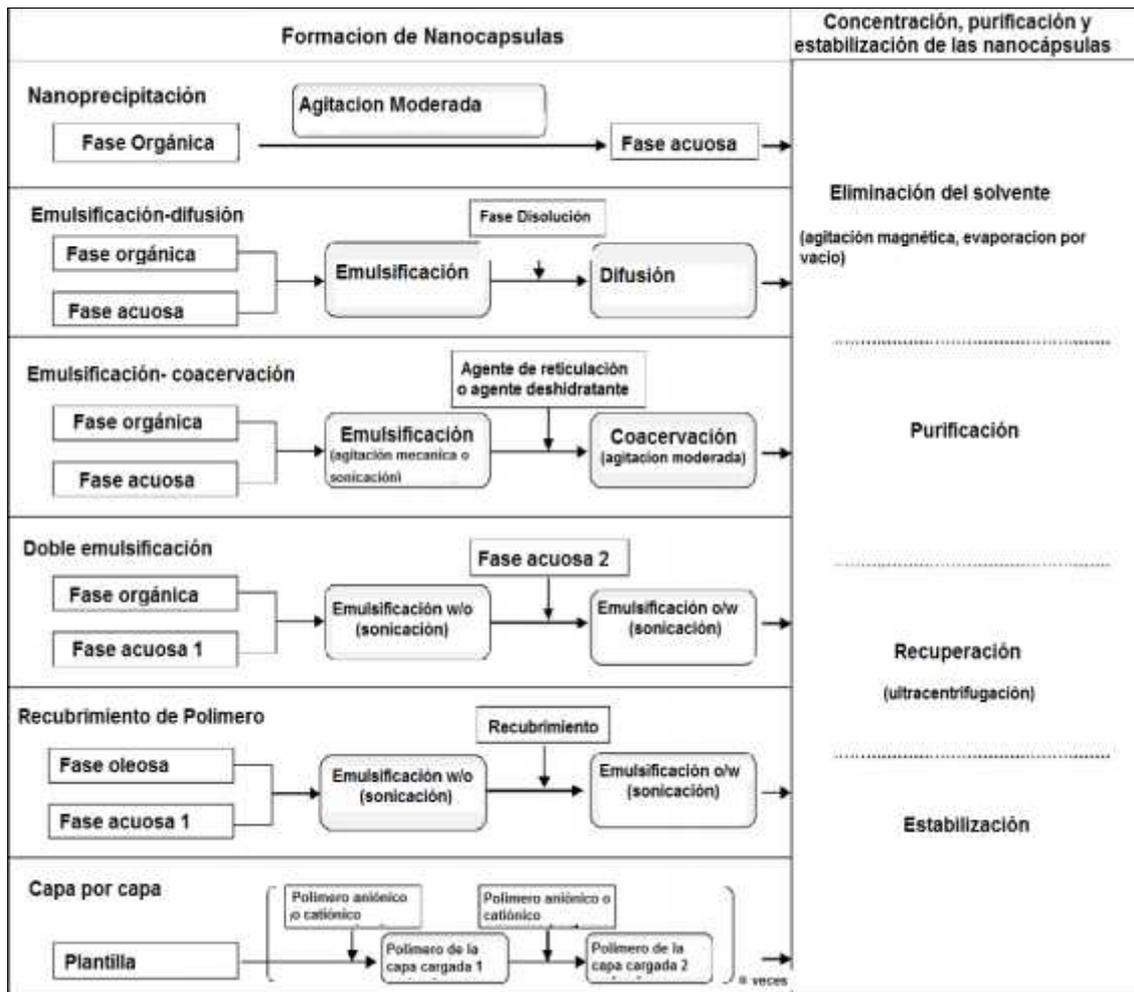
Existen numerosos métodos para la elaboración de nanopartículas que permiten la encapsulación de moléculas hidrófobas o hidrófilas.

Para la formación de las nanocápsulas independientemente del método que se haya seleccionado se deben de seguir los siguientes pasos: \*Eliminación de solvente (agitación magnética moderada, evaporación por vacío, ultrafiltración), \*Purificación (lavado con agua), \*Recuperación (ultra-centrifugación) y \*Estabilización (secado-pulverización).

La emulsión por evaporación de solvente consiste en formar una emulsión a partir de dos fases inmiscibles. Una fase acuosa y una fase orgánica que contiene el principio activo y el polímero destinado a la formación de la nanopartículas. [24] Una vez formada la emulsión, el solvente orgánico es evaporado, por lo que debe ser suficientemente volátil. La principal ventaja de este método es la alta eficiencia de encapsulación de principios activos de carácter hidrófobo.

En la Figura 9, se muestran los diferentes métodos para la formación de las nanocápsulas y sus mecanismos fundamentales.

Para la formación de un sistema de nanocápsulas utilizando el método de nano precipitación, para la síntesis de nanocápsulas es necesario tener dos fases una de disolvente y otra de no disolvente, también se les puede nombrar como fase orgánica y acuosa respectivamente. La fase de disolvente consiste en una solución que contiene un disolvente (medio orgánico) o mezcla de disolventes (etanol, acetona, hexano, etc.), el aceite, el surfactante, la sustancia activa y el polímero. En cambio, en la fase de no disolvente consiste en un no disolvente o una mezcla de no disolventes, por lo general se utiliza agua. [23,25]

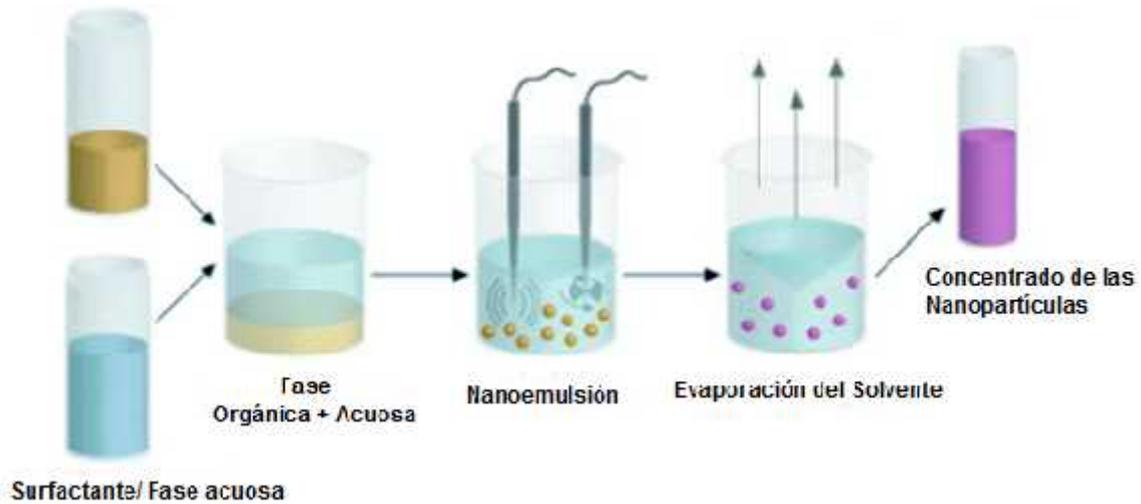


**Figura 9.** Procedimientos generales de los diferentes métodos de preparación de sistemas de nanocápsulas. [23]

Los polímeros biodegradables son los mayormente utilizados en el método de nanoprecipitación; sin embargo, también es bien conocido el hecho de que los polímeros sintéticos poseen una mayor pureza y mejor reproducibilidad que en el caso de los biopolímeros. Además los componentes como la sustancia activa, el aceite y el surfactante son elegidos teniendo en cuenta la solubilidad, toxicidad y degradación del polímero. Como solventes la acetona y el etanol son los más utilizados. [26]

Durante el método de nanoprecipitación (Figura 10), las nanocápsulas se obtienen como una suspensión coloidal que se forma cuando se añade la fase orgánica lentamente y la fase acuosa con una agitación moderada. Del mismo

modo, las características de las nanocápsulas están influenciadas por la naturaleza y concentración de sus componentes.



**Figura 10.** Preparación de las nanocápsulas por el método de nanoprecipitación.

#### **II.4.1 Nanoencapsulación a base de polímeros y sus aplicaciones en biomédica farmacéutica**

El concepto de nanoencapsulación polimérica para el diseño de nuevos sistemas de liberación de fármacos surgió hace unos años, y los avances recientes en la nanotecnología han ofrecido una gran cantidad de nuevas oportunidades para el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades. [27] El gran desarrollo de las nanocápsulas como una herramienta para permitir la entrega y liberación específica de fármacos con aplicaciones biomédicas en humanos y en animales.

El uso de biopolímeros en el área biomédica está llamado a convertirse en una disciplina revolucionaria dado sus múltiples aplicaciones a escala macro, micro y nano en medicina humana, las cuales dependen de la naturaleza de los polímeros, sus funcionalidades químicas reactivas, su nanoestructura, morfología, técnica utilizada y propiedades físico-químicas. [28]

Las partículas de tamaño controlado a micro o nano escala, compuestas de una cubierta mono o multicapa del biopolímero, tienen las siguientes características: otorgan protección al principio activo encapsulado, aumentan su biodisponibilidad, ofrecen mayor facilidad en la incorporación y permiten disponer de diferentes vías de administración, etc. A su vez, la creación de micro o nano partículas con múltiples capas se proyecta como un sistema de encapsulación aún más interesante de explorar ya que aumentaría la biodisponibilidad del compuesto encapsulado, mejoraría la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación del agente y retrasaría la erosión de las partículas en el medioambiente. [28]

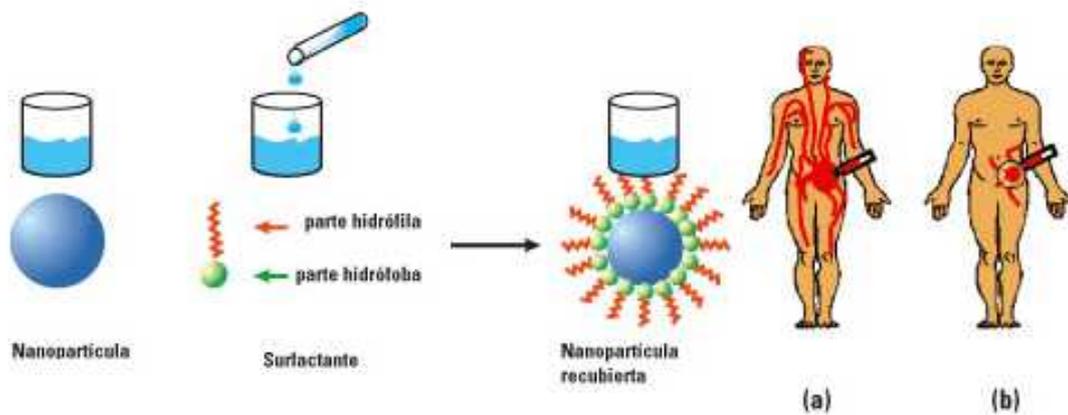
Existen parámetros a considerar para lograr las características necesarias para un efecto terapéutico exitoso. Estos parámetros son a) Tamaño, b) Distribución de tamaños, c) Forma (esfericidad), d) Dureza, e) Estabilidad física y química, f) Evaluación química, g) Velocidad de liberación del fármaco, h) Porcentaje de encapsulación del fármaco.[29]

El objetivo de nanoencapsulación es proteger el material del núcleo y subsecuentemente liberarlo en el momento y lugar que se requiera. Las aplicaciones para esto incluyen:

- Dirigir a los sistemas de administración de fármacos que liberan el fármaco sólo cuando el bioactivo ha llegado al sitio del cuerpo donde se requiere.
- Suministro de liberación temporizada del fármaco donde el material del cual está conformada la nanocápsula, permita su difusión pausada y dosificada (sea el caso) en el cuerpo. El material de revestimiento puede ser personalizado para determinar la velocidad de la entrega.
- El aumento de la vida útil y la estabilidad de los productos como las vitaminas.

En la Figura 11 podemos observar que el recubrimiento en las partículas se realiza adicionando un surfactante, que posee una zona hidrófila y otra zona hidrófoba, a una suspensión de nanopartículas. De esta forma, una de las zonas del surfactante se adhiere a la partícula resultando en un recubrimiento: (a) Las nanopartículas recubiertas se distribuirían en todo el organismo por

medio del sistema circulatorio. (b) La aplicación y la medicación es conducida y fijada hacia la zona afectada reduciendo el efecto sobre el resto del organismo y aumentando la eficiencia del tratamiento.



**Figura 11.** Nanoencapsulación y su potencial aplicación en la biomédica.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### III.1. Materiales

Para el desarrollo de un sistema de nanocápsulas a base del biopolímero kappa carragenina se utilizaron los siguientes reactivos:

1. Surfactante DTAC (Cloruro de Dodeciltrimetilamonio) “grado reactivo”, Sigma-Aldrich, Japón.
2. Aceite de Oliva “grado reactivo”, Sigma-Aldrich, E.U.A.
3. Alcohol Etílico (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) “grado reactivo”, Faga Lab.,
4. Acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) “grado reactivo”, Faga Lab,
5. H<sub>2</sub>O calidad MiliQ (18.2 MΩ.cm a 25 °C)
6. EL biopolímero Kappa Carragenina (κ-CAR) “grado reactivo”, Carbomer Inc., San Diego, E.U.A., fue donada por el Dr. Waldo Arguelles Monal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD.
7. Buffer Fosfato Salino (PBS) “grado reactivo”: 0.01 M PBS, NaCl 0.0138 M y KCl 0.0027 M (pH 7.4 a 25 °C), Sigma-Aldrich, E.U.A.

## III.2. Metodología.

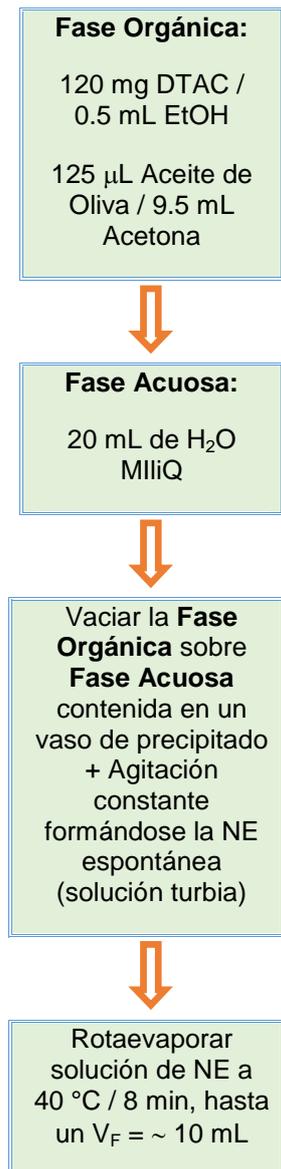
### III.2.1. Procedimiento para la síntesis del sistema de partículas de nanoemulsión (NE).

Las partículas de nanoemulsión (NE) de núcleo oleoso estabilizadas con DTAC y recubiertas posteriormente con  $\kappa$ -CAR, se prepararon de acuerdo con el procedimiento publicado de Rosas-Durazo y col. 2011, [29] el cual a su vez fue adaptado del original Calvo y col., para nanocápsulas de quitosano-lecitina.

Para la síntesis de las partículas NE, se prepararon siguiendo el procedimiento mencionado en el párrafo anterior de la siguiente manera:

1. Para la formación de la solución orgánica, primeramente se disuelve en un tubo de ensaye de 13 x 100, 120 mg de DTAC (Cloruro de Dodecil Trimetil Amonio) en 0.5 mL de EtOH absoluto.
2. Seguidamente se agrega 125  $\mu$ L de Aceite de Oliva disuelto en 9.5 mL de acetona.
3. Inmediatamente después, esta solución orgánica se vertió a un vaso de precipitado de 50 mL que contiene 20 mL de agua MiliQ (fase acuosa) en agitación constante a 25 °C; formándose de manera espontánea una solución turbia (efecto Tyndall): formación espontánea de nanogotas de Aceite de Oliva estabilizadas por el surfactante anfifílico DTAC.
4. Se obtiene una muestra con un volumen de alrededor de ~ 30 mL, la cual será rotaevaporada a 40 °C / ~ 8 - 10 min / 100 rpm. Eso con el fin de eliminar los solventes EtOH, Acetona y H<sub>2</sub>O, llevando idealmente a un volumen final de solución de ~10 mL.

El diagrama de flujo para la elaboración de la nanoemulsión (NE) se puede observar en la Figura 12.



**Figura 12.** Diagrama de flujo para la elaboración de la nanoemulsión (NE)

### **III.2.2. Procedimiento para el recubrimiento de partículas de NE a base de biopolímero $\kappa$ -CAR para la generación de un sistema de nanocápsulas (NC).**

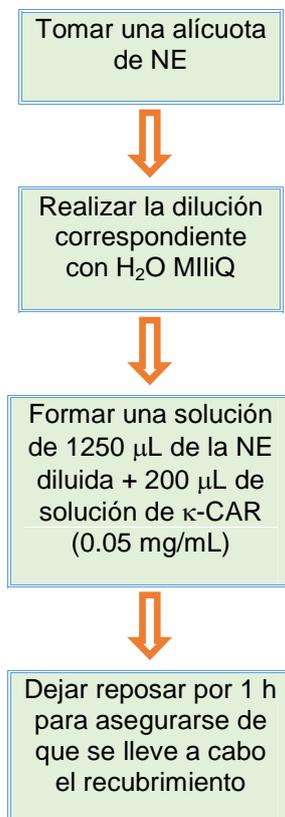
Para el recubrimiento del sistema de nanopartículas a base de biopolímero  $\kappa$ -CAR, se desarrollaron los siguientes pasos:

1. De la muestra de la nanoemulsión con un volumen de 10 mL, se toma una pequeña cantidad para realizar las siguientes diluciones: 1:25, 1:30, 1:50, 1:75, 1:100, 1:110, 1:120 y 1:130. Todas las diluciones se realizaron en solvente H<sub>2</sub>O MiliQ. Las diluciones fueron colocadas en tubos tipo Falcon de 15 mL. La cantidad de nanoemulsión y de agua dependerá del volumen total que se desee realizar. La Tabla IV, recopila las cantidades volumétricas utilizadas para la fabricación de las diluciones.
2. Utilizando una placa de pozos múltiples con 24 pozos con tapa de la marca Corning CellBIND, se mezclan vigorosamente 1250  $\mu$ L de la dilución de nanopartículas y 200  $\mu$ L de  $\kappa$ -CAR (0.05 mg/mL) con una micropipeta. En esta etapa es donde se están recubriendo las partículas de NE.
3. Dejar reposar la muestra por 1 h, para asegurar un efectivo recubrimiento.
4. Repetir los pasos anteriores pero variando los volúmenes de nanoemulsión y agua sin cambiar el volumen final de  $\kappa$ -CAR (0.05 mg/mL) agregado (Tabla IV).

**Tabla IV.** Relación de Nanoemulsión (NE),  $\kappa$ -CAR y H<sub>2</sub>O para diferentes diluciones.

Diluciones	Nanoemulsión NE (~L)	$\kappa$ -CAR (~L) [0.05 mg/mL]	H <sub>2</sub> O MilliQ (~L)
1:25	80	200	1920
1:30	66	200	1934
1:50	40	200	1960
1:75	27	200	1973
1:100	20	200	1980
1:110	18	200	1982
1:120	17	200	1984

El diagrama de flujo para la elaboración de NC, se puede observar en la Figura 13.



**Figura 13.** Diagrama de flujo para la elaboración de nanocápsulas (NC) recubiertas con  $\kappa$ -CAR.

### **III.2.3 Procedimiento para realizar las pruebas de estabilidad para los sistemas de nanopartículas de nanoemulsión (NE) y nanocápsulas (NC)**

Las pruebas de estabilidad a las partículas de nanoemulsión (NE) y partículas de nanocapsulas (NC) a distintas diluciones, fueron realizadas en medio buffer de PBS (Phosphate Buffered Saline) a un pH 7.4 y 37 °C. Se escogió el buffer de PBS, ya que es muy semejante al pH del líquido extracelular de los mamíferos. Los parámetros a caracterizar serán el tamaño promedio y su distribución, además de la carga superficial de la partícula (potencial Zeta,  $\zeta$ ) con respecto al tiempo. Los tiempos que se establecieron fueron: 0, 15, 30, 45, 60 y 120 min.

Para realizar las pruebas de estabilidad de los sistemas, se desarrollaron los siguientes pasos:

1. Se prepara una solución de buffer PBS siguiendo las instrucciones del proveedor SIGMA con lote SLBB7882. Un paquete de buffer de PBS se disuelve en 1 L de H<sub>2</sub>O MiliQ y se producirá buffer de fosfato salino (PBS) de composición: 0.01 M; NaCl 0.0138 M; KCl 0.0027 M a un pH de 7.4 y 25 °C.
2. Colocar el buffer PBS en una incubadora a 37 °C.
3. Tomar una alícuota de ~2 mL de la muestra de NE y se coloca en un vial de 2 mL. Colocar el vial con la NE en una centrifuga a 14,500 rpm / 1 h 30 min / 15 °C.

Para el caso del sistema de NC a cada dilución de NE se le realizo un recubrimiento con el biopolímero ( $\kappa$ -CAR). Se toma 1250  $\mu$ L de la dilución y 200  $\mu$ L de la solución de  $\kappa$ -CAR (0.05 mg/mL). Mezclar bien la dilución con el biopolímero y dejar reposar ~ 1 h esto con el fin de asegurar un mejor recubrimiento. Colocar el vial con la NE en una centrifuga a 14,500 rpm / 1 h 30 min / 15 °C.

4. Para ambas soluciones de NE y NC, se retira el sobrenadante y se preparara con él una solución stock con el solvente buffer de PBS previamente incubado a 37 °C, esto con el fin de obtener un volumen inicial suficiente para realizar las diluciones correspondientes: Dil 1:30, 1:75 y 1:110.
5. Preparar 6 viales por cada dilución (875 µL de buffer y 125 µL de la solución stock), para cada uno de los tiempos (0, 15, 30, 45, 60 y 120 min).
6. Medir tamaño de partícula y potencial zeta a cada tiempo de 0, 15, 30, 45, 60 y 120 min.

### **III.3. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN**

### III.3.1. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

La técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS), es también conocida como Espectroscopia de Fotocorrelación (PCS), la cual es de especial importancia para la caracterización de nanopartículas y macromoléculas en solución. La cual puede proveer información acerca del peso molecular, tamaño y polidispersidad de las partículas. Las partículas en suspensión se rigen bajo el movimiento Browniano. Esto debido a que su constante movimiento, provoca que la luz dispersada en ellas se torna en fluctuaciones dependientes del tiempo. La intensidad de la luz dispersada es una función del tamaño de partícula y de su habilidad para dispersar la luz. El análisis de la intensidad de las fluctuaciones permite determinar el coeficiente de difusión,  $D$ , el cual es una propiedad del material que relaciona el flujo de la materia con el gradiente de concentración. Una vez establecido el  $D$ , el radio hidrodinámico ( $R_H$ ) de las partículas, se puede derivar vía la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_H = \frac{k_B T}{6f\eta_0 D},$$

donde:  $R_H$  es el radio hidrodinámico: es el radio de la esfera que se difunde a la misma velocidad que la partícula dada,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\eta_0$  es la viscosidad de la suspensión. [30]

Las muestras tanto de nanoemulsión como de nanocápsulas deben ser ligeramente turbias, sin ser opacas o completamente claras. Deben estar a temperatura ambiente (25 °C). Se utilizó el kit de celdas y tapón de poliestireno con dimensiones 10x10x45 mm con lote DTS0012 de la marca Malvern. La celda deberá ser llenada con un mililitro de la muestra ya sea de la nanoemulsión como de la nanocápsulas. Se inserta la muestra en el DLS. El equipo que se utilizó fue ZetaSizer Nano ZS, En los laboratorios NICDET de Rubio Pharma. Se puede determinar el tamaño y la distribución de tamaño de la nanoemulsión como de las nanocápsulas.

En las pruebas de estabilidad se toma 1 mL de la solución que se encontraba incubándose en el buffer de PBS a 37 °C. Los tiempos que se establecieron

fueron: 0, 15, 30, 45, 60 y 120 min. La muestra fue puesta en una celda para DLS que previamente fue insertada en el equipo ya antes mencionado.

### III.3.2. Potencial Zeta ( $\zeta$ )

El valor del Potencial Zeta ( $\zeta$ ) de partículas puede ser determinado a partir de mediciones de movilidad electroforética. Cuando un campo eléctrico es aplicado a través de una celda de medición llena con un electrolito, las partículas cargadas suspendidas en el medio comienzan a moverse hacia el electrodo de carga opuesta. La viscosidad del medio tiende a oponerse a este movimiento. Las partículas en un campo eléctrico se mueven a una velocidad constante cuando ocurre un equilibrio entre las fuerzas eléctrica y viscosa. La movilidad electroforética (velocidad por unidad de campo) de una partícula depende de su constante dieléctrica, viscosidad del medio y el potencial zeta, la cual esta relacionada con la movilidad electroforética de las ecuaciones de Henry and Smoluchowski:

$$U_E = \frac{2v' f(|a)}{3\eta},$$

la ecuación de Henry referente a la movilidad electroforética en donde:  $U_E$  es la movilidad electroforética,  $v'$  es el potencial zeta,  $v$  es la constante dieléctrica,  $\eta$  es la viscosidad y  $f(|a)$  es la función de Henry. La unidad de  $|a)$ , se refiere a la longitud de Debye, la cual es reciproca a la longitud  $|^{-1}$  la cual refleja el grosor de la doble capa eléctrica.  $f(|a)$  se toma como un valor estándar de 1.5, el cual se refiere a una aproximación de Smoluchowski. Por lo tanto, el cálculo del potencial zeta a partir de la movilidad está ligado directamente al modelo Smoluchowski. [31]

Las muestras de nanoemulsión y de nanocápsulas para el potencial zeta ( $\zeta$ ) deben estar completamente claras. El equipo debe de estar a una temperatura de 25 °C. Se utilizaron celdas capilares desechables Zetasizer Nano Series con lote DTS1070 de la marca Malvern. La celda para el potencial zeta deberá ser llenado con un poco más de un mililitro de la muestra. El equipo que se utilizo fue Zetasizer Nano ZS, en los laboratorios NICDET de Rubio Pharma. En las

pruebas de estabilidad se realizó el mismo procedimiento antes mencionado, solo que la muestra es puesta en una celda de potencial zeta a 37°C. Con el potencial zeta se puede determinar la carga de la partícula.

### **III.3.3. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)**

Se prepararon las muestras para el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) de la siguiente manera. Un porta muestra de vidrio de 1 cm<sup>2</sup> es limpiado con EtOH y secado para evitar una contaminación. Luego colocar 10 µL de la muestra y se disemina por todo el porta muestra. La muestra es puesta a secar durante 24 h al vacío en un desecador. Teniendo la muestra seca es colocada en el Microscopio de Fuerza Atómica de la marca Veeco de Innova que se encuentra en los laboratorios NICDET de Rubio Pharma. Se permite el análisis superficial y visualización de muestras a dimensiones nanométricas, bajo los siguientes parámetros: 256 (líneas de escaneo), velocidad de escaneo (1.0000 Hz) y un área de escaneo (2 µm). Para llevar a cabo el análisis de las muestras se utilizó el software NanoScope Analysis.

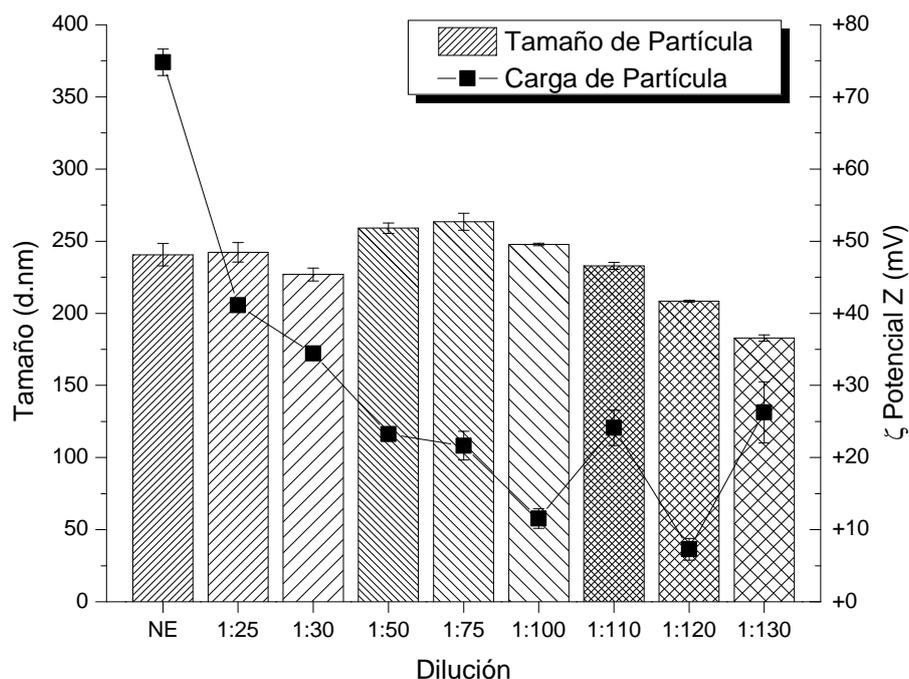
### **III.3.4 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)**

El equipo permite la observación y caracterización de la muestra. Por medio de un haz de electrones permite formar una imagen más clara de la superficie de la muestra. La preparación de la muestra es relativamente sencilla, se colocó la muestra en el Cressington Sputter Coater 108 auto donde se realizó el recubrimiento de la muestra con una capa fina de Au para otorgarle propiedades conductoras: la deposición se realizó a 5 A / 10 s, obteniéndose una capa de ~ 2 nm de espesor. El equipo realiza estudios de los aspectos morfológicos a alta resolución de las nanopartículas. El equipo que se utilizó fue un SEM Pemtron SS-300 con una resolución de 300,000x; equipado con un Backscatter (BSD) Robinson y un Bruker EDS, en los laboratorios NICDET de Rubio Pharma.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### IV.1 Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Potencial Zeta ( )

Tal y como se ha observado en la sección de antecedentes, la formación de los nanosistemas a partir de un proceso de nanoemulsión espontánea, es una metodología que puede adaptarse a distintas fases oleosas y moléculas estabilizadoras-surfactantes, lo cual abre un amplio espectro de aplicaciones principalmente en el área biomédica, farmacológica, cosmética, entre otros; los cuales ya han sido abordados en secciones anteriores. De ahí su importancia y relevancia el poderlo abordar y estudiar en el presente trabajo de tesis. En la Figura 14, se presenta el tamaño promedio y carga de partículas de nanoemulsión (NE) “sin recubrimiento”, en función de las distintas diluciones en solvente acuoso a 25 °C.

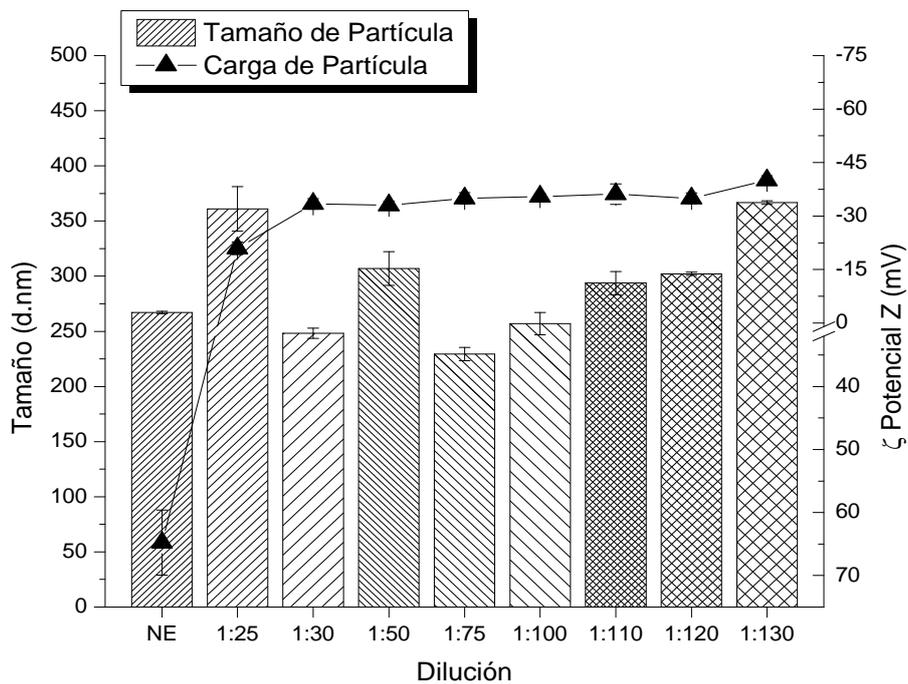


**Figura 14.** Evolución del tamaño de partícula y Potencial Z ( $\zeta$ ), en función del factor de dilución en solvente acuoso a 25 °C para los sistemas de partículas de Nanoemulsión (NE).

Se observa un comportamiento de tamaño de partícula oscilando en valores de entre ~182 a 265 nm, los cuales no siguen un patrón lineal hasta la Dil 1:75 en donde se observa un decaimiento del tamaño a medida que aumenta el grado de dilución. Sin embargo, se puede apreciar claramente una caída del potencial de carga (Potencial Z,  $\zeta$ ), de la partícula catiónica el cual originalmente posee

un valor de  $\sim +75$  mV debido a la cabeza polar del surfactante DTAC ( $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ ), el cual hasta la Dil 1:30 sigue estando en valores estables, a partir de la Dil 1:50 los valores de  $\zeta$  se encuentran en la región metaestable del potencial zeta ( $\pm 30$  mV). Tal comportamiento puede ser debido a la inestabilidad de las partículas sistema en el solvente, en términos de posibles interacciones espontaneas entre ellas, las cuales no afectan al tamaño como se ha advertido; sin embargo si ocurre con la superficie de carga, reflejándose en un decaimiento del  $\zeta$ .

En la Figura 15, se observa el comportamiento del tamaño y carga de partículas de nanoemulsión catiónicas recubiertas por el biopolímero aniónico  $\kappa$ -CAR. De manera general ocurre una interacción de la cadena del polielectrolito aniónico ( $\kappa$ -CAR) con la superficie de la partícula de nanoemulsión catiónica debido a la cabeza polar del surfactante (DTAC). [29]

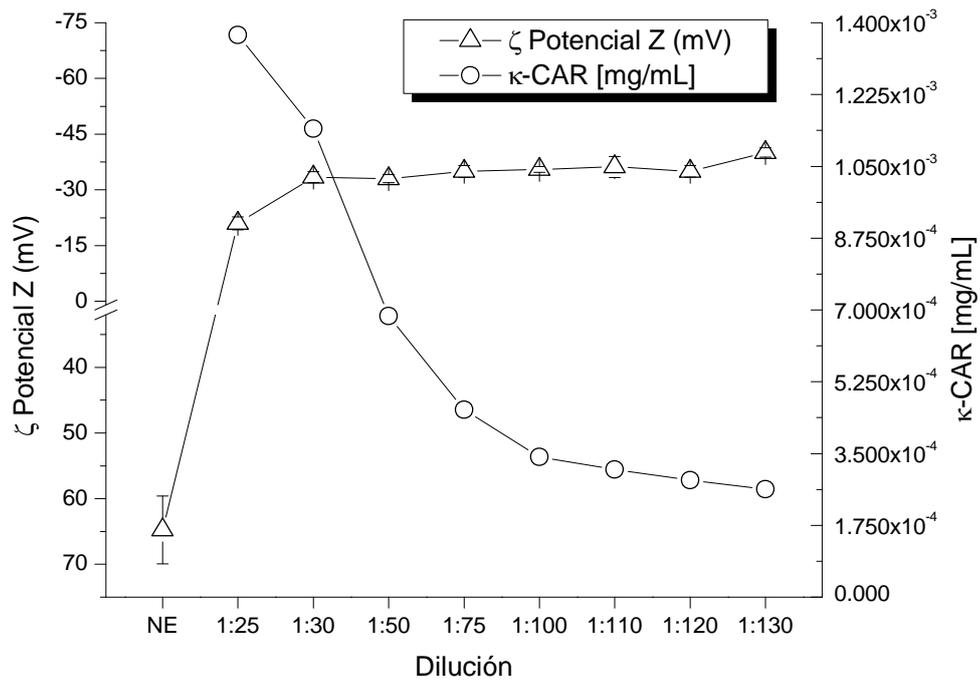


**Figura 15.** Evolución del tamaño de partícula y Potencial Z ( $\zeta$ ), en función del factor de dilución en solvente acuoso a 25 °C para los sistemas partículas de Nanocápsulas (NC), recubiertos con  $\kappa$ -CAR.

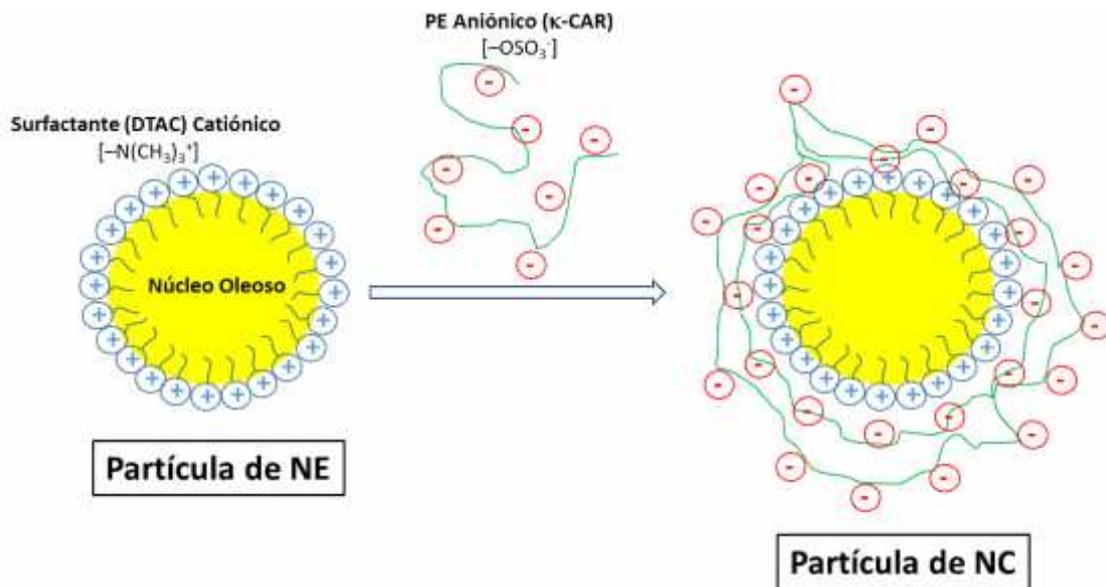
Para fines de llevar una secuencia comparativa, se estudiaron las mismas diluciones presentadas en la Figura 14 pero con la variante de la adición de  $\kappa$ -CAR. Tal como se puede observar en la Figura 15 para el caso de la Dil 1:25, en donde ocurre un cambio drástico de la carga hacia un  $\zeta$  negativo (zona metaestable), comparado con la NE sin el biopolímero (Figura 14). Lo anterior, se explica en términos de una interacción parcial entre  $\kappa$ -CAR – DTAC, tal y como se observó en lo publicado por Rosas-Durazo y col (2011). [29]

Es de hacer notar el hecho, de que a partir de la Dil 1:30 hasta Dil 1:130, el  $\zeta$  se mantuvo en un plateau de valores relativamente constantes de  $\sim -30$  mV, fuera de la zona metaestable ( $\pm 30$  mV), lo cual también soporta el hecho de que a lo largo de todas estas diluciones, las cadenas del biopolímero  $\kappa$ -CAR se encuentran lo suficientemente extendidas espacialmente hablando, derivando en una mayor disponibilidad de sus grupos ( $-\text{OSO}_3^-$ ), los cuales interaccionan de manera más eficiente con los grupos ( $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ ) de las pequeñas moléculas de surfactante DTAC, pudiéndose llevar a cabo un recubrimiento más eficiente de toda la partícula catiónica.

La Figura 16, plasma lo mencionado anteriormente; es de hacer notar el hecho de que inclusive al bajar sensiblemente la concentración total de la solución de  $\kappa$ -CAR en el sistema, hasta en un orden de magnitud respecto al inicial, el potencial de carga de superficie coloidal se mantiene prácticamente constante, confirmando así la disponibilidad espacial de los grupos ( $-\text{OSO}_3^-$ ) de la cadena del biopolímero ya que se encuentran en su solvente ( $\text{H}_2\text{O}$ ) ideal y así para poder interaccionar y recubrir a la partícula de NE catiónica por completo. La Figura 17, esquematiza más claramente lo mencionado anteriormente, en cuanto al recubrimiento de la partícula catiónica por la cadena del biopolímero aniónico, a través de interacciones electrostáticas entre los grupos amino cuaternarios ( $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ ) de la cabeza polar de DTAC de la superficie del coloide con los grupo sulfato ( $-\text{OSO}_3^-$ ) de la cadena de  $\kappa$ -CAR.



**Figura 16.** Evolución del Potencial Z ( $\zeta$ ), respecto a la concentración del biopolímero  $\kappa$ -CAR, ambos en función del factor de dilución en solvente acuoso a 25 °C para los sistemas partículas de Nanocápsulas (NC) de la Figura 15.

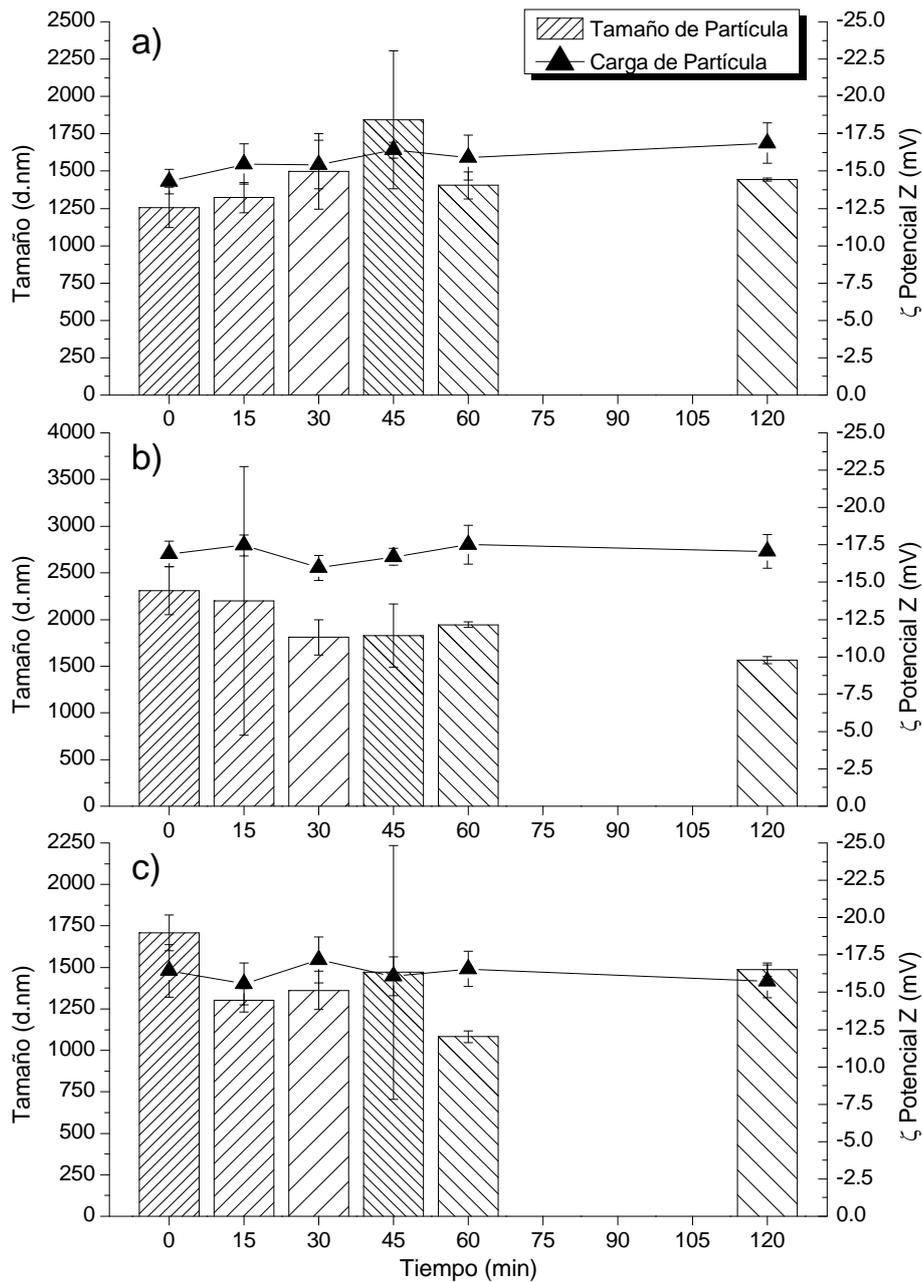


**Figura 17.** Esquemización de la interacción de la cadena del polielectrolito ( $\kappa$ -CAR) aniónico con la partícula de NE catiónica, para la formación de una partícula de NC.

Uno de los principales objetivos de este trabajo de tesis, es el estudiar las aplicaciones potenciales de estos nanosistemas en ambientes fisiológicos, por lo que se estudiaron la estabilidad del tamaño y  $\zeta$  de los sistemas de partículas de NE y NC a Diluciones 1:30, 1:75 y 1:110 en un buffer de fosfato salino (PBS a pH 7.4) a 37 °C, en un intervalo de tiempo de 2 h.

En la Figura 18a - 18c, se presentan los resultados de los estudios de las estabildades para los sistemas de partículas de NE; en el caso de la Dil 1:30 (Figura 18a) se aprecia un tamaño de partícula entre ~1250 a 1300 nm, lo cual a lo largo del periodo de 2 h alcanza un máximo a  $t = 45$  min (~1800 nm); para la Dil 1:75 (Figura 18b), se observa una sensible disminución del tamaño partiendo de  $t = 0$  min (~1750 nm) hasta  $t = 60$  min (~1125 nm) y para el tiempo  $t = 120$  min recuperando un tamaño de ~1500 nm; en el caso de la Dil 1:110 (Figura 18c), se puede observar un tamaño oscilante a lo largo del tiempo ~1250 a 1750 nm. Para los tres sistemas, es evidente la desestabilización en cuanto al tamaño de partícula; lo cual se asocia a varios fenómenos como son estados de agregación inter-partículas debido a la presencia iónica significativa del buffer PBS.

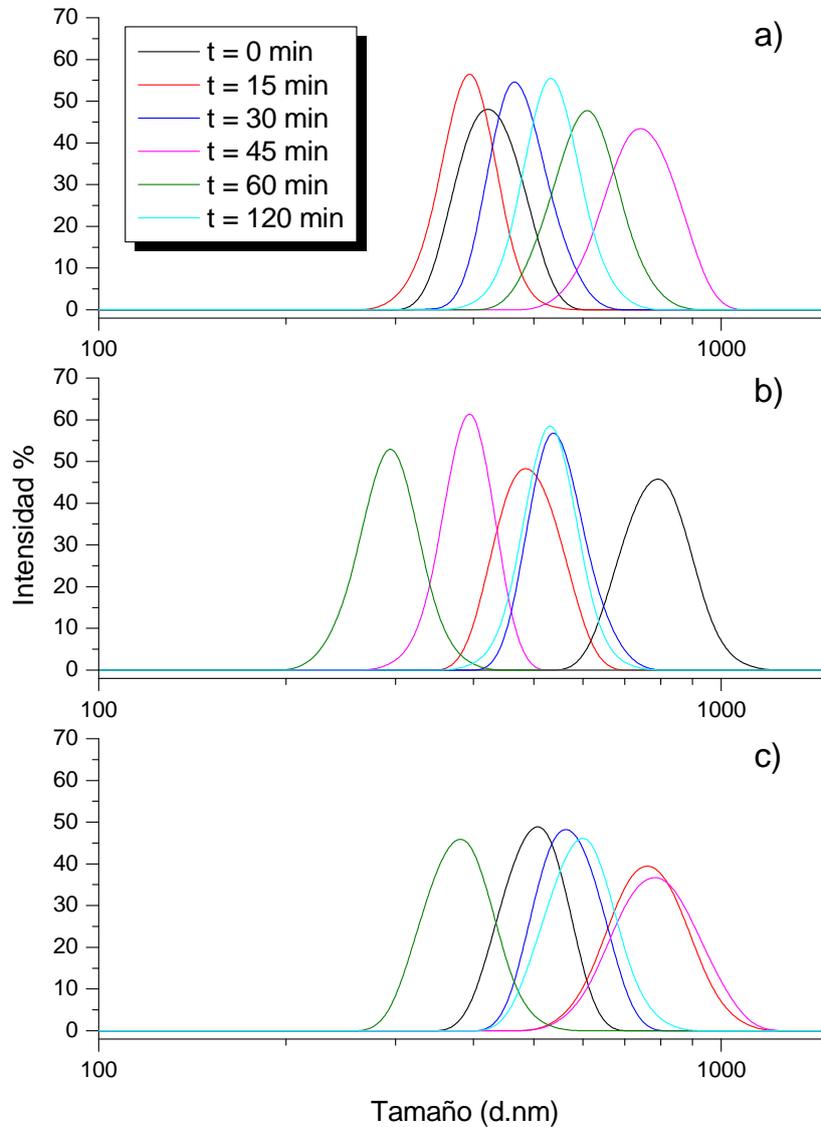
Ahora los resultados de  $\zeta$  para las 3 diluciones, manifiestan una consistencia en la carga en la zona metaestable de ~ -15 y -17 mV, dicho resultado confirma también el hecho de una posible agregación de varias partículas de NE, pero también este cambio drástico en la carga que originalmente es de un sistema de partículas catiónicas, se puede adjudicar a un fenómeno que ocurre debido a que el buffer de fosfatos (PBS), involucra su disociación en solvente acuoso hacia especies aniónicas principalmente, las cuales estarán en altas concentraciones disueltas en el solvente, presentándose un fenómeno el cual repercute de una manera directa la carga superficial del coloide catiónico, conllevando a un cambio sensible en el  $\zeta$ . [32-35]



**Figura 18.** Evolución del tamaño de partícula y potencial Z( $\zeta$ ) en buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C en función del tiempo para los sistemas de partículas de nanoemulsión (NE): a) Dilución 1:30, b) Dilución 1:75 y c) Dilución 1:110.

La Figura 19a - 19c, presenta el resultado de las curvas de distribución de tamaño de partícula correspondientes a los sistemas de partículas de NE de la Figura 18a – 18c para las diluciones 1:30, 1:75 y 1:110, respectivamente. Una inspección más detallada de las mismas, revelan amplias curvas tipo gaussianas de distribuciones monomodales, las cuales no siguen un patrón de aumento en el tamaño progresivo en función del tiempo; sin embargo, es de hacer notar que inclusive a un tiempo total del experimento de 2 h son

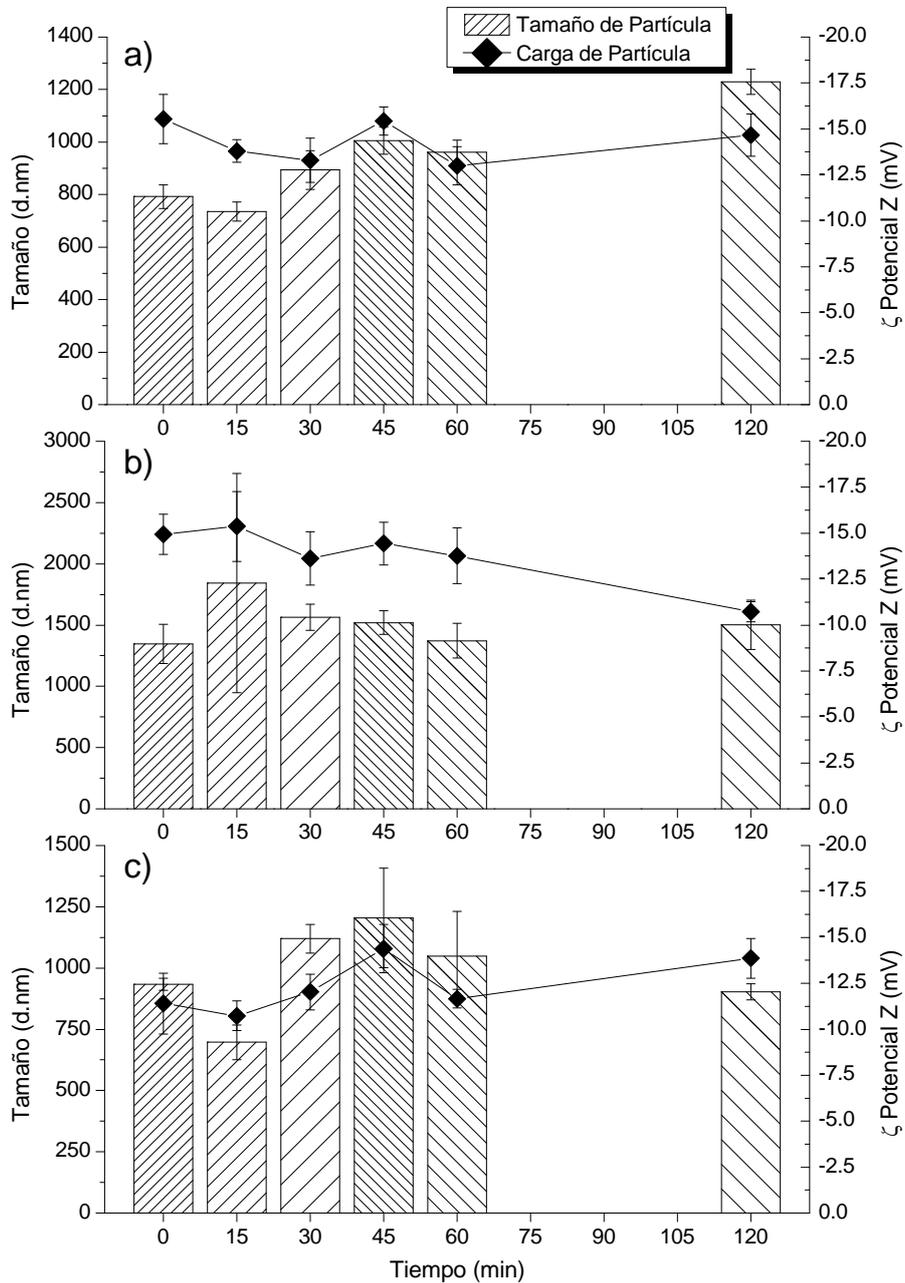
persistentes los grupos de asociaciones de partículas en patrones del tipo floculado, lo cual ya fue denotado en la descripción de la Figura 18a - 18c.



**Figura 19.** Evolución de la distribución de tamaño (d.nm) de partícula para los sistemas de partículas de NE en el buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C en función del tiempo, para las diluciones: a) Dil 1:30, b) Dil 1:75 y c) Dil 1:110.

En la Figura 20a - 20c, se presentan los resultados de los estudios de las estabildades para los sistemas de partículas de NC. Como una primera observación es de hacer notar el hecho de que los tamaños de partícula para las tres diluciones (1:30, 1:75 y 1:110) son menores (~ 500 a 1000 nm, aproximadamente) respecto a sus diluciones homólogos de los sistemas de

partículas de NE (Figura 18a - 18c), lo cual pueden advertirse como sistemas más estables a presentar fenómenos de desestabilización como los mencionados anteriormente.

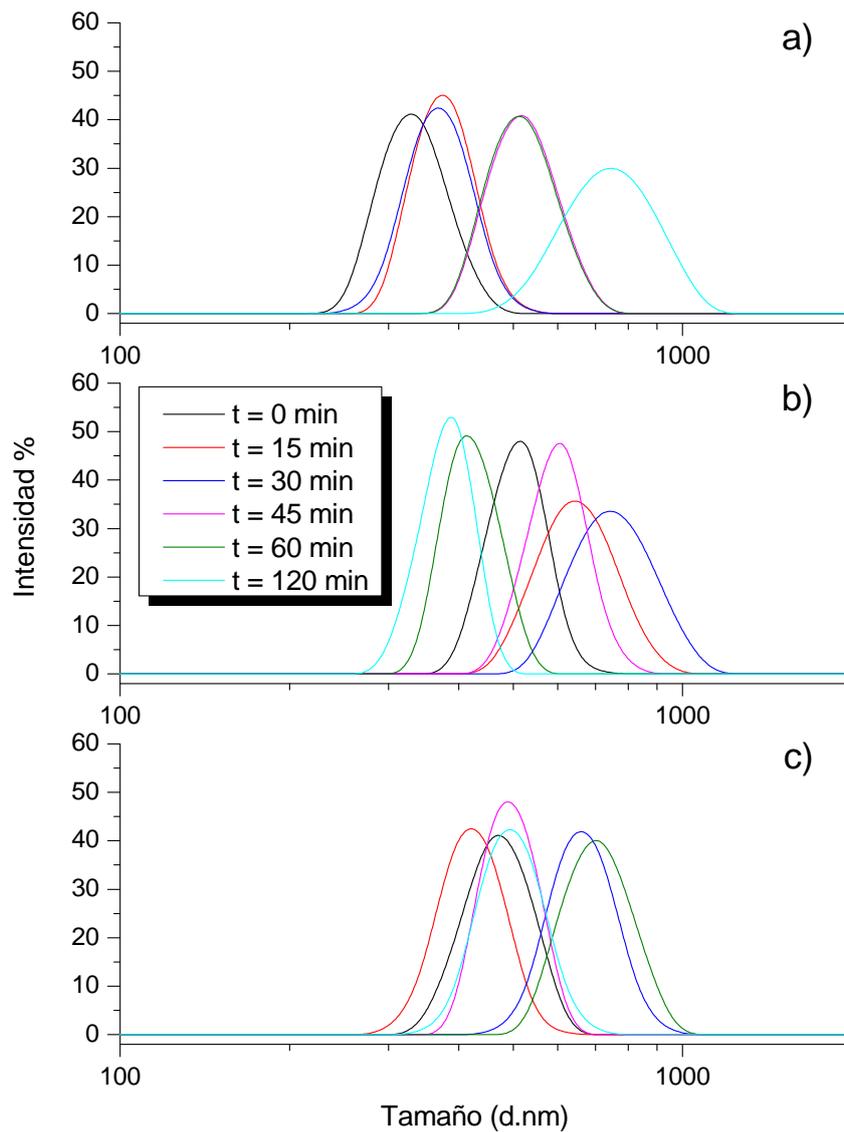


**Figura 20.** Evolución del tamaño de partícula y potencial Z ( $\zeta$ ) en el buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C en función del tiempo para los sistemas de nanocápsulas (NC): a) Dilución 1:30, b) Dilución 1:75 y c) Dilución 1:110.

A su vez en el caso específico de las Dil 1:75 (Figura 20b), se observó un incremento en el tamaño de partícula respecto a Dil 1:30 y 1:110 (Figura 20a y 20c, respectivamente). En cuanto a sus valores de potencial de carga,  $\zeta$ ; se aprecia que estos se mantuvieron relativamente constantes en la zona metaestable de  $\sim -14$  mV, los cuales se pueden apreciar como una disminución sensible del potencial comparados con sus homólogos en solución acuosa a 25 °C (Figura 15). Dicha disminución del potencial es debida a la interacción de especies catiónicas provenientes de la disociación del buffer PBS en agua, lo que conlleva a una saturación de iones reflejándose en una disminución del potencial de carga,  $\zeta$ . [32-35]

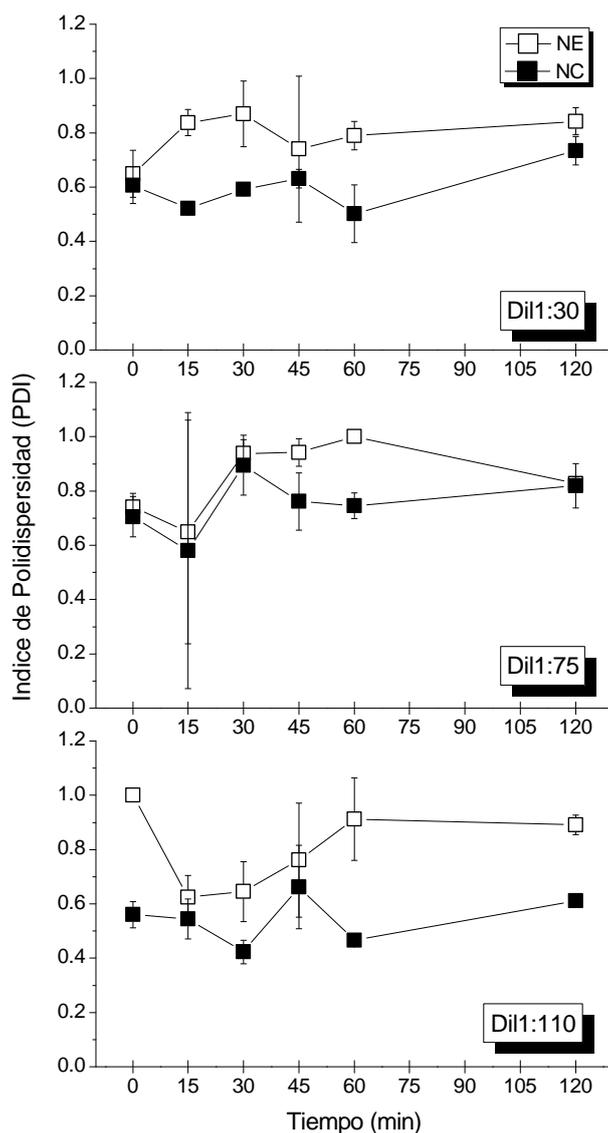
La Figura 21a - 21c, representa el resultado de las curvas de distribución de tamaño de partícula correspondientes a los sistemas de partículas de NC de la Figura 20a - 20c para las diluciones 1:30, 1:75 y 1:110, respectivamente. Se observa que dichas distribuciones Gaussianas son amplias y monomodales. Sin embargo, en la Dil 1:30 (Figura 20a) se observa una cinética ascendente en el tamaño de partícula en función del tiempo, en las Dil 1:75 y Dil 1:110 (Figura 21b y 21c, respectivamente) no se aprecia una distribución en ascenso en función del factor de dilución, pero es claro el hecho de que dichos tamaños son debidos a fenómenos de desestabilización en los tres casos.

Un parámetro importante para analizar el comportamiento y/o estabilidad de una solución de nanopartículas es el Índice de Polidispersidad (PDI). El PDI, se deriva del Principio de la Polidispersidad, el cual es un reflejo de la existencia de varios grupos de partículas de distintos tamaños, manifestándose en la amplitud del área de las curvas Gaussianas de tamaño. En otras palabras el PDI, es el resultado de la mono- y/o poli-dispersidad de tamaños en un sistema coloidal, manejándose un estándar de a valores  $< 0.05$ , en donde se estaría refiriendo a un sistema completamente mono-disperso y a valores  $> 0.7$ , se estaría manifestando un sistema con una amplia distribución de distintos tamaños de partícula (lo cual se interpretaría a varios fenómenos de desestabilización como floculación, coalescencia, etc.). [35]



**Figura 21.** Evolución de la distribución de tamaños (d.nm) de partícula para los sistemas de partículas de NC en el buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C en función del tiempo, para las diluciones: a) Dil 1:30, b) Dil 1:75 y c) Dil 1:110.

La Figura 22, recopila los resultados del índice de polidispersidad (PDI) de los sistemas de nanopartículas de NE y NC correspondientes a las curvas de distribución de tamaño de las Figuras 19 y 21, respectivamente.



**Figura 22.** Composición de los resultados del índice de polidispersidad (PDI), correspondientes a la evolución de la distribución de tamaños de partícula de NE y NC presentados para los estudios de estabilidad en el buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C de las Figuras 19 y 21, respectivamente.

Para el caso de los resultados en el sistema de partículas de NE para las tres diluciones (1:30, 1:75 y 1:110), se observan valores de PDI > 0.7, lo que refleja sistemas muy polidispersos, posiblemente debido a fenómenos de desestabilización inherentes al medio buffer, tiempo y temperatura de incubación, los cuales fueron discutidos a detalle en los resultados mostrados de las curvas de distribución de tamaño de la Figura 19. En cuanto a los resultados de PDI para los sistemas de nanopartículas de NC, las Dil 1:30 y 1:110, mantuvieron valores relativamente < 0.7, lo cual se interpreta como

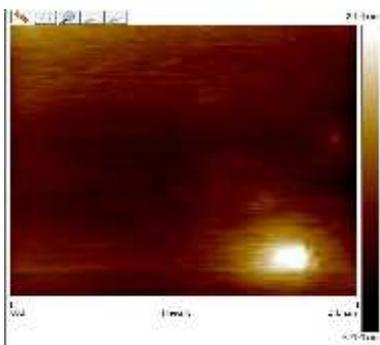
sistemas en rangos de polidispersión aceptables y constantes en función del tiempo, caso contrario se observó en Dil 1:75; la cual si presento distribuciones más amplias y siendo acordes a valores de PDI > 0.7.

## IV.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

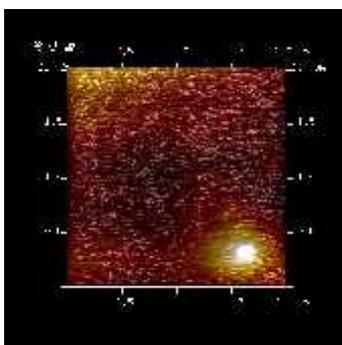
En el análisis de partículas individuales y en grupos, la microscopía AFM suele ser una herramienta de alto impacto. En el escaneo de superficies, la técnica de AFM permite topológicamente hacer una distinción que permite evidenciar la presencia de las partículas, dando una caracterización de tamaño relativo con respecto a la superficie que se encuentre ya sea de manera superficial y/o embebida, según sea el caso, en modo de 2D y 3D.

En la Figura 23, se observa claramente una partícula de NE, la cual tiene una dimensión aproximada de ~200 nm, lo cual es acorde a lo evidenciado en los resultados de radio hidrodinámico ( $R_h$ ) observados en la sección de DLS (Figura 14); además de evidenciarse una altura de la partícula de aproximadamente ~20 nm, lo que hasta cierto punto nos hace constar que se trata probablemente de una partícula individual.

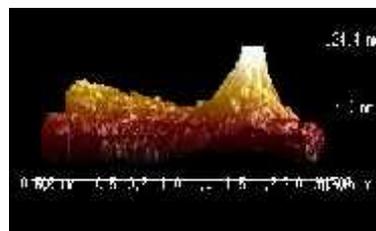
a) 2D



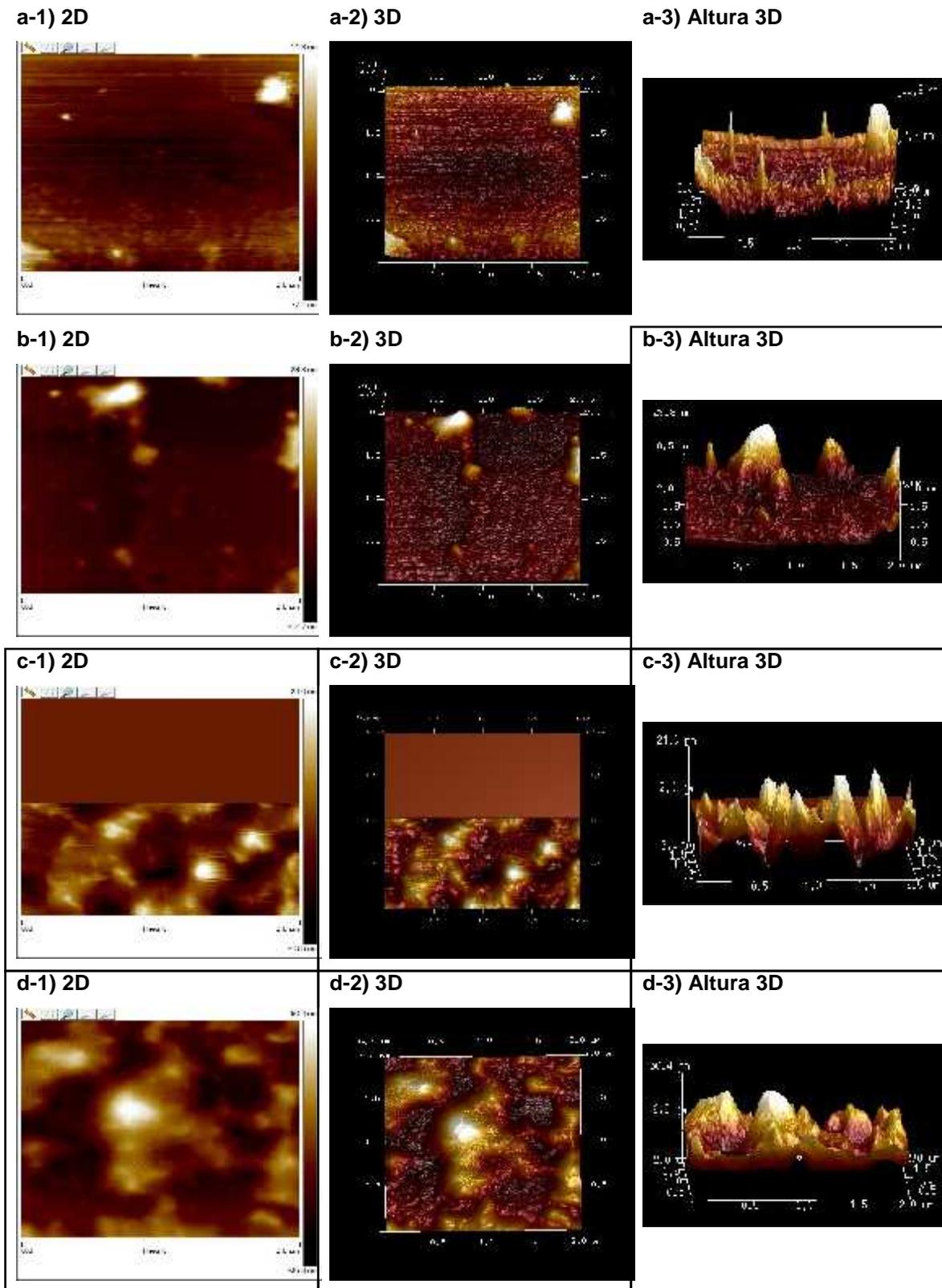
b) 3D



c) Altura 3D



**Figura 23.** Imagen de AFM de la topografía de una partícula de NE. a) Dos dimensiones, 2D; b) Tres Dimensiones, 3D y c) Tres dimensiones con perspectiva de altura.



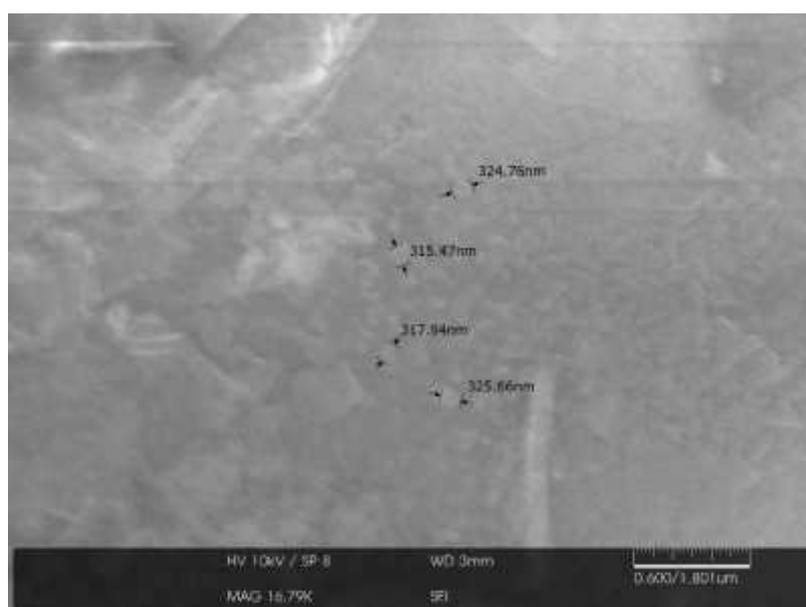
**Figura 24.** Imágenes de AFM de la topografía de los sistemas de partículas de NC a distintas diluciones: Dilución 1:30 (a-1 a a-3); Dilución 1:50 (b-1 a b-3); Dilución 1:75 (c-1 a c-3) y

Dilución 1:110 (d-1 a d-3). 1) Dos dimensiones, 2D; 2) Tres dimensiones, 3D y 3) Tres dimensiones con perspectiva de altura.

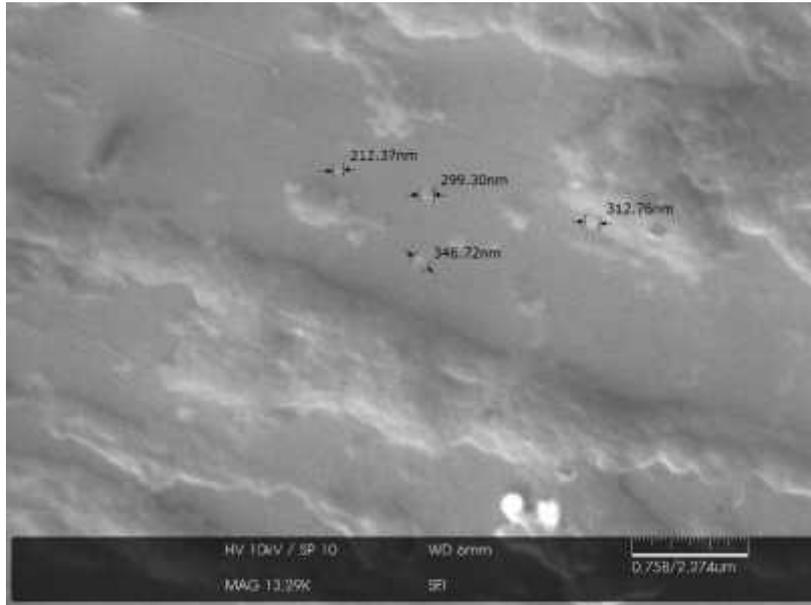
Cabe acotar que en el caso de las diluciones 1:30, 1:50 y 1:75, se observa alturas menores a los 20 nm, lo cual nos permite poder aseverar el hecho de que se tratan de partículas individuales; mas no fue el caso de la Dil 1:110, en donde se observan alturas mayores a los 30 nm, manifestando probablemente cúmulos de por lo menos dos partículas de NCs.

### IV.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El análisis de microscopia electrónica de barrido se realizó para obtener imágenes más claras de los sistemas de partículas de NC. Los resultados de las observaciones realizadas se muestran las Figuras 25 y 26, donde se aprecian la morfología y tamaño de los sistemas de partículas a diluciones 1:75 y 1:110, respectivamente. Realizando una inspección más detallada de ambas figuras; se observa que para la Dil 1:75 (Figura 25), se observan tamaños de partícula ~200 a 300 nm y para la Dil 1:110 (Figura 26) un tamaño relativo de ~200 nm. Dichos tamaños, son acordes a los resultados de  $R_h$  observados por DLS en la Figura 15.



**Figura 25.** Imagen SEM de partículas de NC a Dil 1:75.



**Figura 26.** Imagen SEM de partículas de NC a Dil 1:110.

## **V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## V.1 Conclusiones

- ▶ Se desarrolló un sistema de nanocápsulas a base de un núcleo de aceite de oliva y recubiertos por el biopolímero  $\kappa$ -CAR.
- ▶ Se demostró mediante la caracterización por Dispersión de Luz Dinámica (DLS), la distribución de tamaño de partícula para los sistemas de partículas de nanoemulsión (NE) y de nanocápsulas (NC), estas últimas recubiertas por el biopolímero ( $\kappa$ -CAR), los cuales se encontraron en el rango nanométrico acorde y reportado en investigación en nanofarmacia  $\sim 250$  nm.
- ▶ Se demostró mediante el Potencial  $\zeta$ , la carga superficial de la partícula, con lo cual se pudo confirmar el sistema de partículas de nanoemulsión estabilizadas con el surfactante DTAC dando como resultado un  $\zeta$  (+) y una vez recubiertas por  $\kappa$ -CAR resultando un  $\zeta$  (-).
- ▶ Fue muy notable la estabilidad del potencial de carga superficial ( $\zeta$ ) de los sistemas de partículas de NC, los cuales en un rango de Dil 1:30 hasta Dil 1:130, se mantuvieron en un  $\zeta = \sim -30$  mV, fuera de la zona metaestable lo que denota ausencia de fenómenos de desestabilización como floculación, coalescencia, entre otros.
- ▶ Mediante las pruebas de estabilidad en medio buffer PBS a 37 °C, se observó una distribución de tamaño y carga de la partícula a un pH fisiológico en función del factor de dilución y del tiempo para los sistemas de NE y NC; dando como resultado sistemas más estables en el caso de los de partículas de NC, respecto a los de NE.
- ▶ Se evidenció mediante imagenología por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) y Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) la presencia de las partículas, resultando en tamaños relativamente similares a los registrados en DLS.

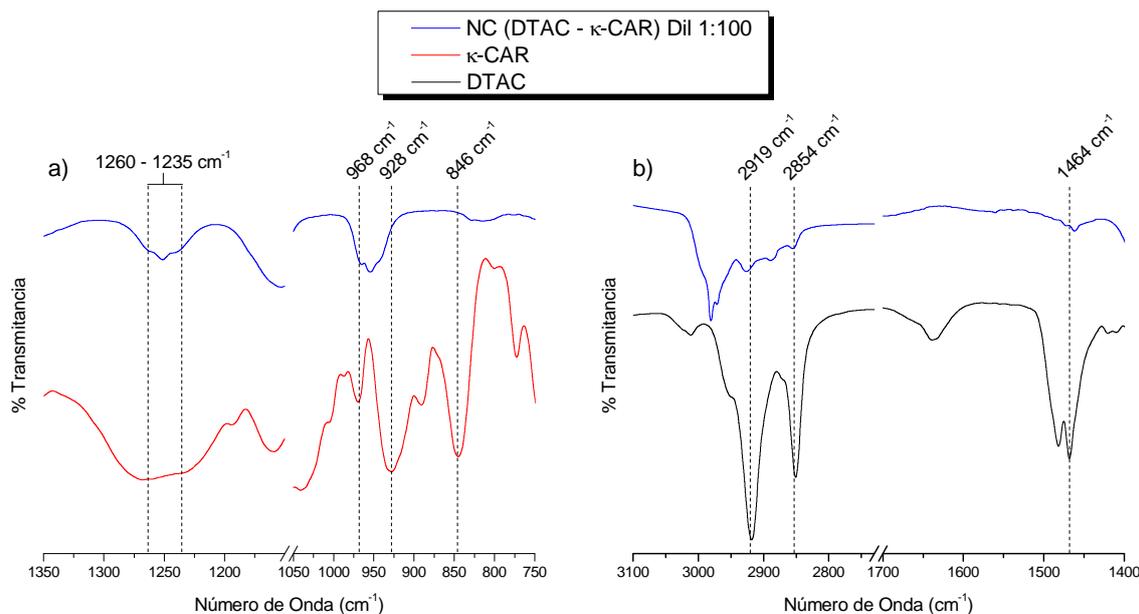
## V.2 Recomendaciones

- Se recomienda realizar pruebas de estabilidad de los sistemas de partículas de NE y NC en otros tipos de medios fisiológicos; por ejemplo ácidos simulando al pH estomacal, entre otros.
- Experimentar encapsulación con diferentes tipos de aceites de uso biomédico.
- Probar viabilidad de los nanosistemas induciéndolos sobre líneas celulares normales y anormales (p.ej. cancerígenos); y así el poder observar su biocompatibilidad evaluando parámetros como son: citotoxicidad, sensibilidad y degradación intracelular de los nanosistemas.

## **VI. ANEXO**

## VI.1 Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

Es importante el evidenciar químicamente, la formación del sistema de nanopartículas recubiertas con el biopolímero que se da a través del complejo polielectrolito ( $\kappa$ -CAR) y surfactante (DTAC).



**Anexo 1.** Espectro FTIR comparativo entre el sistema NC Dil 1:100 con el biopolímero  $\kappa$ -CAR puro (**Anexo 1a**) y con el surfactante DTAC en estado puro (**Anexo 1b**).

El Anexo 1a, muestra gráficamente el comparativo entre el espectro FTIR de NC Dil 1:100 y el espectro FTIR del biopolímero  $\kappa$ -CAR puro. La señal intensa y amplia entre  $\sim 1260 \text{ cm}^{-1}$  a  $\sim 1235 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del grupo éster de sulfato ( $-\text{S}=\text{O}$ ) de  $\kappa$ -CAR, la cual en el NC Dil 1:100 es mucho menos intensa. La señal de intensidad media ubicada a  $\sim 968 \text{ cm}^{-1}$ , corresponde a la vibración del grupo  $-\text{C}-\text{O}$  (monómero galactosa), la cual se observa como un ligero hombro en el espectro de NC Dil 1:100; en el caso de la señal de intensidad alta centrada a  $\sim 928 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del grupo  $-\text{C}-\text{O}$  (monómero 3.6-anhidrogalactosa), la cual está ausente en el espectro de NC Dil 1:100. Por último, la señal de intensidad alta a  $\sim 846 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del grupo  $-\text{O}-\text{SO}_3$  (posición axial del C-4 del

monómero galactosa), la cual se evidencia como un hombro muy pequeño en el espectro de NC Dil 1:100. [36]

El Anexo 1b, muestra el comparativo entre el espectro FTIR de NC Dil 1:100 y el espectro FTIR del surfactante DTAC. Dicho comparativo refleja la evidencia de la presencia de DTAC en el sistema de NC Dil 1:100, principalmente a señales de absorción en el infrarrojo: el par de señales centradas a  $\sim 2919\text{ cm}^{-1}$  y  $\sim 2854\text{ cm}^{-1}$  son asignadas a las señales de vibración de estiramiento asimétricas y simétricas, respectivamente del grupo  $-\text{CH}_2$  correspondiente a la cadena hidrocarbonada de DTAC, es evidente que dichas señales son muy intensa en el espectro del compuesto puro y muy pequeñas en NC Dil 1:100; la señal de intensidad media ubicada a  $\sim 1464\text{ cm}^{-1}$  para el compuesto DTAC puro corresponde al estiramiento del grupo  $\text{CH}_3 - \text{N}^+$ , la cual apenas es perceptible en el sistema de NC Dil 1:100. [37]

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

## VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- [1] M. G. Rojas Cortés, B. M. Vallejo, and J. E. Perilla Perilla. "Biopolymers as materials for developing products in pharmaceutical applications and biomedical uses". *Rev. Ing. E Investig.* 2008; 28(1):57-71.
- [2] Michael L. Etheridge, BME; Stephen A. Campbell, PhD; Arthur G. Erdman, PhD; Christy L. Haynes, PhD; Susan M. Wolf, JD; Jeffrey McCullough, MD. "The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2013; 9:1-14.
- [3] K Van de Velde, P Kiekens. "Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications". *Polymer Testing* 2002; 21(4): 433-442.
- [4] M.R. Aguilar, J. San Román. "1-Introduction to smart polymers and their applications". Smart Polymers and their Applications 2014; 1:1-11.
- [5] Andrey V. Dobrynina, Michael Rubinstein. "Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces". *Prog. Polym. Sci.* 2005; 30:1049-1118.
- [6] L. Li, R. Ni, Y. Shao, and S. Mao, "Carrageenan and its applications in drug delivery," *Carbohydr. Polym.* 2014; 103(1):1-11.
- [7] G. A. De Ruiter and B. Rudolph, "Carrageenan biotechnology," *Trends Food Sci. Technol.* 1997; 8(12):389-395.
- [8] T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi, and F. Alhaique. "Polysaccharide hydrogels for modified release formulations". *J. Control. Release* 2007; 119(1):5-24.
- [9] A. C. Pinheiro, A. I. Bourbon, B. G. de S. Medeiros, L. H. M. da Silva, M. C. H. da Silva, M. G. Carneiro-da-Cunha, M. A. Coimbra, and A. A. Vicente, "Interactions between -carrageenan and chitosan in nanolayered coatings— Structural and transport properties," *Carbohydr. Polym.* 2012; 87(2):1081-1090.
- [10] Prof. Dr. Tharwat F. Tadros. "Ch2-Physical Chemistry of Surfactant Solutions"; Applied Surfactants: Principles and Applications 2005; 19-51.
- [11] Prof. Dr. Tharwat F. Tadros. "Ch1-Introduction"; Applied Surfactants: Principles and Applications 2005; 1-17.

[12] John Cross and Edward J. Singer. Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation 1994; 53.

[13] L. D. E. Formulación and R. Y. Procesos, Aplicaciones Cosméticas y Farmacéuticas de los Surfactantes 2011; 1.

[14] Dipak Kumar Sarker. Pharmaceutical Emulsions: A Drug Developer's Toolbag. Wiley-Blackwell; 2013.

[15] Argillier J.F., Zeilinger S. Roche P. "Enhancement of Aqueous Emulsion and Foam Stability with Oppositely Charged Surfactant/Polyelectrolyte Mixed Systems Oil & Gas Science and Technology" – *Rev. IFP* 2009; 64:597-605.

[16] Ksenija Kogej. "Binding of Cationic Surfactants by Carrageenans. A Study of the Influence of Polyelectrolyte Charge Density". *Acta Chim. Slov.* 2007; 54:469-475.

[17] Andreas F. Thünemann. "Polyelectrolyte–surfactant complexes (synthesis, structure and materials aspects)". *Prog. Polym. Sci.* 2002; 27:1473-1572.

[18] B. S. Zhou and B. Chu, "Assembled Materials: Polyelectrolyte ± Surfactant Complexes" *New York*, pp. 545-556, 2000.

[19] J. Safari and Z. Zarnegar, "Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review," *J. Saudi Chem. Soc.* 2014; 18(2):85-99.

[20] M. Caldorera-Moore and N. A. Peppas, "Micro- and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61(15)1391-401.

[21] N. Larson and H. Ghandehari, "Polymeric conjugates for drug delivery"; *Chem. Mater.*, 2012; 24(5):840-853.

[22] M. L. Etheridge, S. a. Campbell, A. G. Erdman, C. L. Haynes, S. M. Wolf, and J. McCullough, "The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2013 9(1):1-14.

[23] C. E. Mora-Huertas, H. Fessi, and a. Elaissari, "Polymer-based nanocapsules for drug delivery" *Int. J. Pharm.* 2010; 385(1-2):113-142.

- [24] P. Couvreur. "Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future". *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013; 65(1):21-23.
- [25] Claudia Elizabeth Mora-Huertas, Olivier Garrigues, Hatem Fessi, Abdelhamid Elaissari. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study. 2012; 80(1):235-239
- [26] C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, and F. Veiga, "Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems". *Nanomedicine* 2006; 2(2): 53-65.
- [27] A. N. Bq, D. Yáñez, M. Dvm, P. Aguirre, Z. Dvm, Y. Amar, M. Dvm, S. Vidal, V. Ibm, and R. Egaña, "Encapsulación de Biomoléculas Usando Polímeros Naturales: Un Nuevo Enfoque en la Entrega de Fármacos en Medicina" 2013; 1.
- [28] Jordan Despanie, Jugal P. Dhandhukia, Sarah F. Hamm-Alvarez, J. Andrew MacKay. "Elastin-like polypeptides: Therapeutic applications for an emerging class of nanomedicines". *Journal of Controlled Release* 2015; In press, Corrected Proof.
- [29] A. Rosas-Durazo, J. Lizardi, I. Higuera-Ciapara, W. Argüelles-Monal, and F. M. Goycoolea, "Development and characterization of nanocapsules comprising dodecyltrimethylammonium chloride and  $\kappa$ -carrageenan," *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2011; 86(1):242–246.
- [30] Zetasizer NanoSeries User's Manual, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK (2003).
- [31] Zetasizer Nano Series Technical Note (MRK654-01). Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, UK (2010)
- [32] Francesca Cugia, Maura Monduzzi, a Barry W. Ninham and Andrea Salis. Interplay of ion specificity, pH and buffers: insights from electrophoretic mobility and pH measurements of lysozyme solutions. *RSC Advances* 2013; 3:5882
- [33] K. D. Collins, G. W. Neilson and J. E. Enderby. "Ions in water: characterizing the forces that control chemical processes and biological structure". *Biophys. Chem.* 2007; 128:95.
- [34] Inform White Paper. Dynamic Light Scattering Common Terms Defined. 2011 Malvern Instruments Limited.

[35] L. Medda, B. Barse, F. Cugia, M. Bostrom, D. F. Parsons, B. W. Ninham,

M. Monduzzi and A. Salis. "Hofmeister Challenges: Ion Binding and Charge of the BSA Protein as Explicit Examples". *Langmuir* 2012; 28:16355.

[36] Aarón Rosas-Durazo, Javier Hernández, Jaime Lizardi, Inocencio Higuera-Ciapara, Francisco M. Goycoolea and Waldo Argüelles-Monal. Gelation processes in the non-stoichiometric polyelectrolyte–surfactant complex between  $\kappa$ -carrageenan and dodecyltrimethylammonium chloride in KCl. *Soft Matter* 2011; 7:2103.

[37] A. Safa Özcan, Özer Gök. "Structural characterization of dodecyltrimethylammonium (DTMA) bromide modified sepiolite and its adsorption isotherm studies". *Journal of Molecular Structure* 2012; 1007:36–44.