



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO SURFACTANTE EN
NANOCÁPSULAS DE κ -CARRAGENINA CON NÚCLEO DE
ÁCIDO OLEICO.**

TESIS

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta:

MARÍA FERNANDA NAVARRO VALENCIA

Hermosillo, Sonora

Enero de 2016

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inicialmente a mi director de tesis Dr. Paul Zavala Rivera por su apoyo, guía y paciencia a lo largo de este proyecto, a los miembros del Jurado de mi Tesis Profesional, al Dr. Luis Alonso Almazán Holguín, la Dra. Flerida Mejía Zamudio, al Dr. Victor Vázquez Vázquez y al Dr. Aarón de Jesús Rosas Durazo por sus consejos; a los maestros de la carrera de Ingeniería Química quienes me formaron profesionalmente, dándome las bases teóricas y de experiencia necesarias para lograr este objetivo.

Quiero agradecer al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, y a mi querida Universidad de Sonora por brindarme la oportunidad de estudiar esta gran carrera y utilizar sus instalaciones durante estos años.

Un agradecimiento especial al Dr. José Luis Rubio Pino, a Rubio Pharma y al equipo de NICDET por permitirme hacer uso de sus instalaciones y brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto, sobre todo a M.C. Sarai Rochin Wong por sus correcciones y sus consejos.

Gracias a todos.

DEDICATORIA

A Dios: *Por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.*

A mis padres: *Porque gracias a su apoyo y consejos he llegado a realizar la más grande de mis metas; la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir. Con respeto, admiración y amor.*

A Mis hermanos: *Gracias por su paciencia, gracias por preocuparse por su hermana mayor, gracias por compartir sus vidas, pero sobre todo, gracias por estar en otro momento tan importante en mi vida.*

A mi novio: *Gracias por siempre estar a mi lado en las buenas y en las malas; por tu comprensión, paciencia y amor, dándome ánimos de fuerza y valor para seguir a delante.*

A mis amigas y amigos: *Por pasar a mi lado los buenos y malos momentos de mi vida, por aguantar mi estrés, y sobre todo por estar siempre en las buenas y en las malas, jamás lo olvidaré.*

Porque cada segundo, minuto, día, cada momento a tu lado se atribuye a la mejor inversión de tiempo de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
TABLA DE CONTENIDO.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
I.1. Justificación	2
I.2. Objetivo general.....	3
I.3. Objetivos Particulares.....	3
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
II.1. Biomateriales	5
II.1.1. Biomateriales Metálicos.....	6
II.1.2. Biomateriales Cerámicos.....	6
II.1.3. Biomateriales Poliméricos.....	7
II.1.3.1. Carragenina.....	8
II.1.3.1.1. κ-Carragenina.....	10
II.1.4. Bionanomateriales	11
II.2. Fundamentos de Autoensamblaje y Auto-organización	12
II.2.1. Auto-ensamblaje	13
II.2.1.1. Vesículas.....	13
II.2.1.2. Micelas.....	14

II.2.2. Auto-organización.....	15
II.3. Nanoemulsión	16
II.3.1. Surfactantes	17
II.4. Interacciones Coloidales.....	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
III.1. Materiales	23
III.2. Metodología.....	23
III.2.1. Metodología para la síntesis de nanocápsulas.	23
III.2.2 Metodología para el recubrimiento de nanocápsulas.....	27
III.3. Caracterización	29
III.3.1. Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	29
III.3.2. Potencial Zeta (PZ).....	29
III.3.3. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
IV.1. Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	32
IV.2. Potencial Zeta (PZ).....	38
IV.3. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).....	39
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
V.1. Conclusiones.....	45
V.2. Recomendaciones.....	46
VI. ANEXOS.....	47
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Carragenina tipo Kappa.	1
Figura 2.	Secuencia de imágenes que muestran los diversos tamaños de escala.	11
Figura 3.	Representación esquemática del proceso de autoensamblaje ando la formación de un agregado mayor.	13
Figura 4.	Estructura de una vesícula.	14
Figura 5.	Estructura de una Micela.	15
Figura 6.	Formación de una Emulsión.	17
Figura 7.	Surfactante Aniónico.	18
Figura 8.	Surfactante Catiónico.	18
Figura 9.	Surfactantes No-lónicos	19
Figura 10.	Surfactante Anfótero	19
Figura 11.	Formación de una micela a partir de su concentración micelar critica.	20
Figura 12.	Dispersión coloidal.	21
Figura 13.	Estructura de una nanocápsula con núcleo líquido.	24
Figura 14.	Métodos para la preparación de Nanocápsulas.	24
Figura 15.	Pasos para obtener la NE.	25
Figura 16.	Diagrama de flujo para la síntesis de nanocápsulas.	26

Figura 17.	Recubrimiento de la Nanoemulsión.	27
Figura 18.	Diagrama de flujo del procedimiento llevado a cabo para el recubrimiento con κ -Carragenina.	28
Figura 19.	Grafico que muestra las distribuciones de tamaño del Diámetro Hidrodinámico (nm) en función de la intensidad (%) del número de Partículas para la muestra con una concentración de 5 mM.	32
Figura 20.	Grafico que muestra las distribuciones de tamaño del Diámetro Hidrodinámico (nm) en función de la intensidad (%) del número de partículas para la muestra con una concentración de 20 mM.	33
Figura 21.	Grafico que muestra las distribuciones de tamaño del Diámetro Hidrodinámico (nm) en función de la intensidad (%) del número de partículas para la muestra con una concentración de 45 mM.	34
Figura 22.	Grafico que muestra las distribuciones de tamaño del Diámetro Hidrodinámico (nm) en función de la intensidad (%) del número de partículas para la muestra con una concentración de 70 mM.	35
Figura 23.	Grafico que muestra el comportamiento del Diámetro Hidrodinámico (nm) al variar el Volumen de Polímero (μ l) y su Concentración de Surfactante (mM).	36
Figura 24.	Grafico que muestra el comportamiento del Diámetro Hidrodinámico (nm) y el índice de Polidispersión de Polímero conforme aumenta la concentración de Surfactante (mM).	37
Figura 25.	Valores de Potencial Zeta obtenidos variando la	38

concentración de Surfactante y el Volumen de Polímero.

Figura 26.	Tamaños de las muestras obtenidos por AFM para 20 μ l de polímero. a) 5 mM, b) 20 mM.	39
Figura 27.	Tamaños de las muestras obtenidos por AFM para 20 μ l de polímero. a) 45 mM, b) 70 mM.	40
Figura 28.	Tamaños obtenidos por AFM para la muestra 20 mM. a) 20 μ l, b) 15 μ l, c) 10 μ l, d) 5 μ l mM.	41
Figura 29.	Comparación entre los tamaños obtenidos por DLS y AFM para la muestra de 20 mM variando el volumen de polímero.	42
Figura 30.	Comparación entre los tamaños obtenidos por DLS y AFM para las muestras de 20 μ l y las 4 Concentraciones de Surfactante 5, 20, 45 y 70 mM.	43

LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Cantidad de surfactante utilizado para cada NE.	26
Tabla II.	Volúmenes utilizados de Nanoemulsión, κ -Carragenina, agua desionizada para cada prueba con su respectivo volumen final	27
Tabla III.	Tamaños obtenidos en AFM para todas las Concentraciones de surfactante utilizadas y un Volumen de Polímero de 20 μ l.	40
Tabla IV.	Tamaños promedios obtenidos del AFM para 20 mM.	42
Tabla V.	Diferentes tamaños de Diámetro Hidrodinámico (nm) con las variaciones de Volumen de Polímero (μ l) y concentraciones de surfactante (mM) utilizadas.	48
Tabla VI.	Valores de Potencial Zeta obtenidos para diferentes concentraciones de Surfactante y volúmenes de Polímero.	48
Tabla VII.	Comparación de los tamaños obtenidos por DLS y AFM para 20 mM variando el volumen de polímero, y para cada una de las concentraciones de surfactante variando el volumen de polímero, y para cada una de las concentraciones de surfactante 5, 20, 45 y 70 mM con 20 μ l de polímero.	49

RESUMEN

En el siguiente trabajo se buscó llevar a cabo la síntesis de nanocápsulas, a partir de nanoemulsiones en base a una fase orgánica y una fase acuosa, estabilizada con surfactante DTAC (Cloruro de dodeciltrimetilamonio) y un núcleo oleoso (Ácido Oleico); las cuales fueron recubiertas con un polímero de κ -Carragenina.

El propósito de este trabajo es obtener un estudio más detallado de la síntesis de nanocápsulas donde se utilizaron dos variables: la primera fue la cantidad de surfactante, basándose en su Concentración Micelar Crítica (CMC), y la segunda la cantidad del polímero.

Para caracterizar las muestras obtenidas se utilizaron las siguientes técnicas: Dispersión de Luz Dinámica (DLS) donde se obtuvo un promedio del tamaño de su diámetro hidrodinámico con respecto a las diferentes cantidades de surfactante y cantidad de polímero. Potencial Zeta para determinar la carga de las nanopartículas y comprobar si se llevó a cabo un recubrimiento, ya que el DTAC es un componente de carga positiva y el polímero κ -Carragenina posee carga negativa.

El tamaño real y la morfología esférica esperada de las nanopartículas sintetizadas se realizaron por Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) reforzando los resultados obtenidos por DLS.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I.1. Justificación

En los últimos años la interacción de diferentes campos como son la medicina, materiales y nanotecnología han producido una amplia gama de técnicas y materiales con cualidades compatibles para la aplicación controlada en la liberación de medicamentos.

Los sistemas nanoencapsulados han atraído un gran interés en los últimos años debido a su facilidad en su síntesis y las cualidades intrínsecas como medio para atrapar y liberar agentes a través de su membrana. Las nanocápsulas pueden servir como portadores de tamaño nano a micrométrico de fármacos u otras sustancias para lograr la liberación controlada de estos por medio de la selección adecuada de los materiales y tamaño que la conforman, aunado a su estabilidad física y química.

Las principales ventajas que incluyen las nanocápsulas micelares de liberación sostenida son la selectividad en el uso de drogas hidrofóbicas debido a su núcleo oleoso. Mejorando la biodisponibilidad del fármaco y el alivio de la toxicidad del mismo debido a la capa protectora que conforma la nanocápsula de la micela.

En este trabajo se busca crear un sistema de encapsulamiento a nanoescala conformado de un núcleo oleoso a base de ácido oleico purificado, el material encapsulante previsto es un polímero biocompatible que se extrae de las algas conocido como carragenina y como promotor para la micelización un surfactante de uso farmacológico llamado cloruro de dodecil trimetil amonio (DTAC).

I.2. Objetivo general.

Sintetizar nanocápsulas de núcleo oleoso compuestas de ácido oleico y surfactante Cloruro de Dodeciltrimetilamonio (DTAC) mediante la técnica de nanoprecipitación, recubriéndolas con κ -Carragenina y caracterizar el efecto de la concentración del surfactante y la del polímero en el tamaño, dispersión y propiedades como el potencial Z de las nanocápsulas.

I.3. Objetivos Particulares.

Para lograr tal objetivo se plantean los siguientes objetivos particulares:

- Producir nanocápsulas mediante la técnica de nanoprecipitación utilizando como fase orgánica acetona, etanol, ácido oleico y cloruro de dodecil trimetil amonio, y una fase acuosa a base de agua desionizada.
- Evaluar las características fisicoquímicas y morfológicas de los materiales sintetizados a diferentes concentraciones de DTAC usando como base el valor de la concentración crítica de micelización.
- Recubrir las nanocápsulas sintetizadas con el polímero κ -Carragenina.
- Caracterizar el efecto de la concentración de polímero en las muestras recubiertas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Biomateriales

Un biomaterial se puede definir como cualquier material utilizado para fabricar dispositivos que puedan reemplazar una parte o una función de un organismo vivo de una manera segura y fisiológicamente aceptable.

Los biomateriales se implantan con el objeto de reemplazar y/o restaurar tejidos vivos y sus funciones, lo que implica que están expuestos de modo temporal o permanente a fluidos del cuerpo con capacidades corrosivas, aunque en realidad pueden estar localizados fuera del propio cuerpo, incluyéndose en esta categoría a la mayor parte de los materiales dentales.

Debido a que los biomateriales restablecen funciones de tejidos vivos y órganos en el cuerpo, es esencial entender las relaciones existentes entre las propiedades, funciones y estructuras de los materiales biológicos.

El éxito de un biomaterial o de un implante depende de tres factores principales: biocompatibilidad del implante, condiciones de salud del receptor y habilidad del cirujano que realiza el implante [1].

Los requisitos que debe cumplir un biomaterial son:

1. Ser biocompatible, es decir, debe ser aceptado por el organismo, no provocar que éste desarrolle sistemas de rechazo ante la presencia del biomaterial
2. No ser tóxico, ni carcinógeno.
3. Ser químicamente estable (no presentar degradación en el tiempo) e inerte.
4. Tener una resistencia mecánica adecuada.
5. Tener un tiempo de fatiga apto.
6. Tener densidad y peso adecuados.

7. Tener un diseño de ingeniería conveniente; esto es, el tamaño y la forma del implante deben ser los apropiados.

8. Ser relativamente barato, reproducible, fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala. [1,2]

II.1.1. Biomateriales Metálicos

La mayoría de los biomateriales metálicos son considerados como casi inertes, su bioactividad en lo concerniente a la formación de una interface hueso-implante es mucho menor que la de otros compuestos, tales como los fosfatos de calcio. Sin embargo, los metales siguen siendo los más utilizados en implantes donde se requiere el soporte de carga (dentales o artoplastias) debido a su alta resistencia mecánica [3], aunque se han aplicado también en tratamientos cardiovasculares.

Los principales metales biocompatibles son acero inoxidable, aleaciones basadas en cobalto y aleaciones basadas en titanio. Las aleaciones de titanio tienen una alta resistencia mecánica y un módulo elástico bajo que se asemeja más al del hueso que otras aleaciones metálicas, y a su vez tienen una alta resistencia a la corrosión, lo que las ha convertido en las aleaciones más utilizadas para aplicaciones ortopédicas.

II.1.2. Biomateriales Cerámicos

Los cerámicos se definen como materiales sólidos inorgánicos no metálicos, son consolidados mediante tratamientos térmicos a altas temperaturas. Es un grupo complejo que incluyen los cerámicos basados en fosfato de calcio, vidrios bioactivos a base de sílice y los cerámicos inertes como la zirconia y carburos de silicio. Los materiales cerámicos que son biocompatibles son llamados

biocerámicos. Estos podrían ser los materiales ideales para la reparación ósea, ya que poseen una buena biocompatibilidad y óseo integración, además, son los materiales más parecidos al componente mineral de hueso.

Los cerámicos presentan, como sus principales ventajas, su baja tasa de desgaste en las superficies articuladas y la liberación de bajas concentraciones de partículas de desgaste inertes. Estos compuestos minerales son refractarios duros, compuestos policristalinos, difíciles de esquivar plásticamente con altas temperaturas de fusión, baja conductividad eléctrica, resistentes a la compresión y corrosión.

Las propiedades mecánicas de la cerámica dependen del tamaño de grano, porosidad, densidad y estructura cristalina. Sin embargo, dado que tienden a ser materiales porosos, casi siempre se fracturan ante esfuerzos de tensión y presentan poca elasticidad, restringiendo en gran medida su campo de aplicación para ser usados en funciones que no requieran de elevados esfuerzos mecánicos [4].

II.1.3. Biomateriales Poliméricos

Un polímero es una gran molécula construida por la repetición de pequeñas unidades químicas simples (monómeros). En algunos casos la repetición es lineal, de forma semejante a como a una cadena la forman sus eslabones. En otros casos las cadenas son ramificadas o interconectadas formando retículos tridimensionales [5].

Muchos tipos de polímeros son ampliamente utilizados en dispositivos biomédicos que incluyen: tejido dental, ortopédicos y los implantes cardiovasculares. Los polímeros representan la clase más grande de biomateriales.

La amplia variedad de polímeros naturales relevantes en el campo de los biomateriales incluye materiales vegetales tales como celulosa, carragenina,

alginato de sodio, y el caucho natural, materiales de origen animal tales como quitosano, colágeno y válvulas basadas en el tejido del corazón y suturas [6].

Los biopolímeros son polímeros que se generan a partir de fuentes naturales renovables, a menudo son biodegradables y no tóxicos para producir. Ellos pueden ser producidos por los sistemas biológicos (microorganismos, plantas y animales), o químicamente sintetizados a partir de materiales de partida biológicos (por ejemplo, azúcares, almidón, grasas o aceites naturales, etc.).

Los biopolímeros tienen propiedades fisicoquímicas y termoplásticas iguales a las de los polímeros fabricados a partir de petróleo, con la diferencia que una vez desechados, se biodegradan. De aquí se derivan las grandes ventajas de sustituir el uso de petróleo y de reemplazar los polímeros actuales por polímeros biodegradables, lo que disminuiría notablemente la contaminación del medio ambiente [7,8].

II. 1.3.1. Carragenina

La carragenina es un hidrocoloide extraído de algas marinas rojas de las especies *Gigartina*, *Hypnea*, *Eucheuma*, *Chondrus* e *Iridaea*. Es utilizada en diversas aplicaciones en la industria alimentaria como espesante, gelificante, agente de suspensión y estabilizante, tanto en sistemas acuosos como en sistemas lácticos.

La carragenina es un ingrediente multifuncional y se comporta de manera diferente en agua y en leche. En el agua, se presenta, típicamente, como un hidrocoloide con propiedades espesantes y gelificantes. En la leche, tiene, además, la propiedad de reaccionar con las proteínas y proveer funciones estabilizantes.

La carragenina posee una habilidad exclusiva de formar una amplia variedad de texturas de gel a temperatura ambiente: gel firme o elástico; transparente o turbio; fuerte o débil; termorreversible o estable al calor; alta o baja temperatura de

fusión/gelificación. Puede ser utilizada, también, como agente de suspensión, retención de agua, gelificación, emulsificación y estabilización en otras diversas aplicaciones industriales [9].

Es clasificada de acuerdo con su estructura y propiedades físico-químicas en:

Kappa (κ): gel rígido, quebradizo, termorreversible, alta fuerza de gel.

Iota (ι): gel elástico, termorreversible, no presenta sinéresis, propiedad tixotrópica.

Lambda (λ): soluble en frío, no gelificante, produce altas viscosidades.

Propiedades de la Carragenina:

Solubilidad.

Agua Caliente: Todos los tipos de carragenina son solubles en agua caliente a temperaturas superiores a la temperatura de fusión del gel. El intervalo normal de temperaturas es de 40° a 70°C, dependiendo de la concentración y de la presencia de cationes.

Agua Fría: En agua fría, solamente son solubles la carragenina tipo lambda y las sales de sodio de los tipos kappa e iota. Las sales de potasio y calcio de las carrageninas kappa e iota no son solubles en agua fría pero exhiben expansión por hidratación considerable en función de la concentración, tipos de cationes presentes, temperatura del agua y condiciones de dispersión.

Textura: Las carrageninas kappa e iota forman gel en agua solamente en la presencia de ciertos cationes. El gel formado es termorreversible y puede ser sometido a ciclos de calentamiento y enfriamiento sin alteración considerable en la estructura del gel (pH neutro). Las temperaturas de gelificación y fusión del sol/gel dependen de la concentración de cationes.

Viscosidad: La viscosidad de soluciones de carragenina debe ser determinada en condiciones donde no exista ninguna tendencia de gelificación de la solución. Cuando una solución caliente de carragenina es enfriada, la viscosidad aumenta gradualmente hasta que sea alcanzada la temperatura de gelificación.

A medida que se inicia la formación del gel, hay un aumento repentino e intenso de la viscosidad. Por lo tanto, la medida de la viscosidad de las soluciones de carragenina debe ser determinada a temperaturas suficientemente altas (75° C) para evitar el efecto de la gelificación.

II. 1.3.1.1. κ-Carragenina

La carragenina está ubicada en la pared de las células y en la matriz intercelular del tejido de las algas.

Es un polisacárido de alto peso molecular con contenido de éster sulfato de 15% a 40% formado por unidades alternadas de D-galactosa y 3,6-anhidro-galactosa (3,6-AG).

La posición y el número de grupos de éster sulfato así como el contenido de 3,6-AG determinan las diferencias primarias entre los tipos de carragenina kappa, iota y lambda:

- 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.

Los mayores niveles de éster sulfato implican una menor fuerza de gelificación y baja temperatura de solubilización [9].

En la siguiente imagen (Figura 1) se puede apreciar la estructura de la κ-Carragenina.

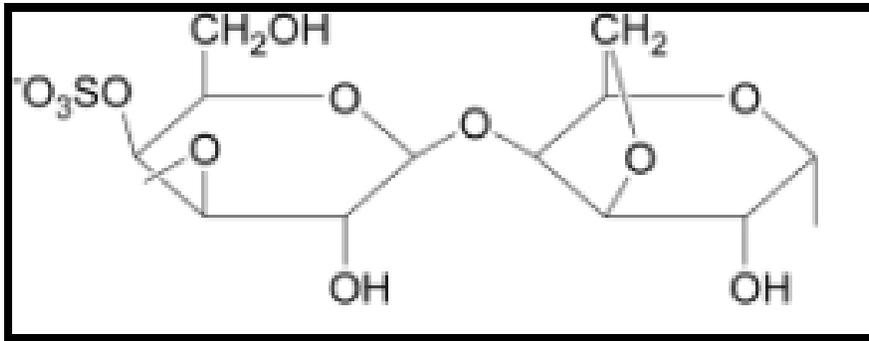


Figura 1. Carragenina tipo Kappa.

II.1.4. Bionanomateriales

El termino bionanomateriales hace referencia a biomaterial a escala nanométrica es decir, materiales con propiedades morfológicas de tamaño de 1 a 100 nanómetros ($1\text{nm} = 1 \times 10^{-9}\text{m}$) en al menos una de sus dimensiones, también conocidos como nanomateriales [10]. Una escala de comparación empírica con otras escalas en la naturaleza puede observarse en la Figura 2.

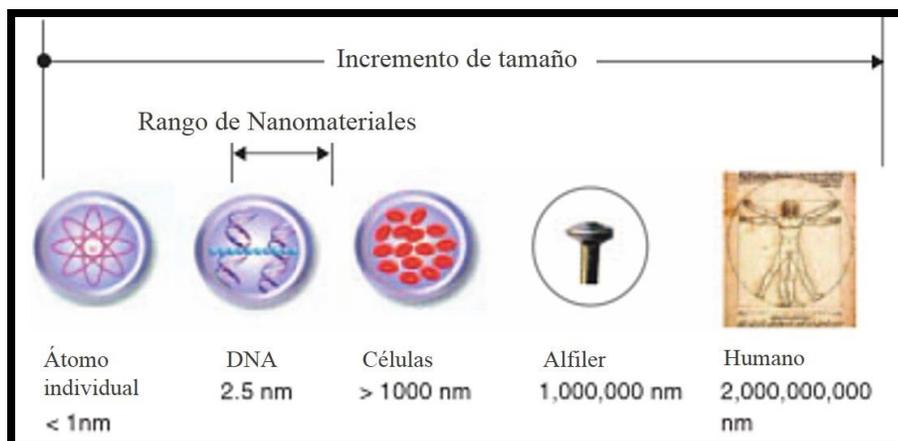


Figura 2. Secuencia de imágenes que muestran diversos niveles de escala.

Los nanomateriales tienen algunas propiedades que con frecuencia son superiores a los materiales tradicionales disponibles comercialmente. Estas características pueden incluir la resistencia mecánica, la dureza, la ductilidad, la

resistencia al desgaste por corrosión en combinación con propiedades eléctricas, magnéticas y ópticas únicas.

La composición de un nanomaterial puede ser cualquier combinación de elementos químicos; entre las composiciones de mayor importancia están los carburos, los óxidos, los nitruros, los metales y sus aleaciones, los polímeros orgánicos y varios materiales compuestos [11].

El uso de nanomateriales en la industria médica se ha encaminado primordialmente a la elaboración de hidrogeles, nanoemulsiones y sistemas encapsulantes.

II.2. Fundamentos de Autoensamblaje y Auto-organización

El característico de la nanotecnología es la manipulación de átomos o moléculas individualmente; la auto-organización y auto-ensamblaje se basan en estructuras mayores. Cualquier proceso por el cual se forma un sistema a partir de sus componentes de manera espontánea se llama auto-ensamblaje.

Un proceso de autoensamblaje puede ocurrir en un solo paso o más verosímilmente, en una cantidad de pasos definidos. Igual que las moléculas en un organismo vivo se reconocen y se unen unas con otras, algunas moléculas y estructuras también se reconocen y pueden ordenarse con ayuda de un trabajo externo, esto es lo que se conoce como “auto-organización”. El resultado son las “nanoestructuras”, que son objetos de tamaño “nanométrico” y que pueden llegar a tener propiedades interesantes (emitir luz, efectos cuánticos, efectos magnéticos) precisamente a causa de su baja dimensionalidad. El autoensamblaje y la auto-organización de las moléculas y los materiales se rigen por una compleja interacción termodinámica de las propiedades físicas y químicas del sistema. El control de tal auto-organización, en particular en la escala nanométrica, se ha

convertido en un importante empeño dentro del desarrollo de materiales en busca de nuevas funcionalidades y nuevos dispositivos [12].

II.2.1. Auto-ensamblaje

El auto-ensamblaje es el concepto que expresa que las moléculas que son complementarias y se reconocen molecularmente, pueden asociarse sin barreras cinéticas. El concepto de autoensamblaje expresa, por tanto, la espontaneidad con que se puede formar organizadamente un compuesto supramolecular. Así, el auto-ensamblaje implica la asociación supramolecular entre varias especies para formar un agregado de mayor tamaño y, generalmente, de una arquitectura más compleja [13], como se puede ver en la Figura 3.

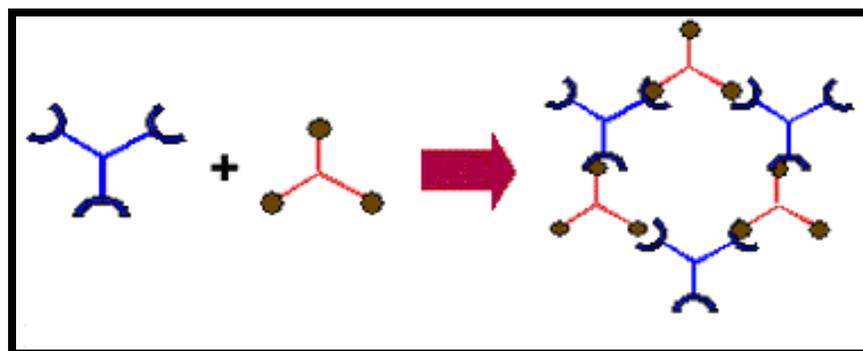


Figura 3. Representación esquemática del proceso de autoensamblaje con formación de un agregado mayor.

II.2.1.1. Vesículas

Los sistemas vesiculares están ganando importancia recientemente debido a su capacidad para actuar como un medio de liberación sostenida de fármacos.

Estos sistemas tienen varias ventajas: pueden encapsular tanto partes hidrofílicas y lipofílicas, prolongar la vida media de las drogas mediante el aumento de la

duración de la circulación sistémica debido a la encapsulación, biodegradabilidad, y la ausencia de toxicidad [14-21].

Las vesículas tienen una estructura única que es capaz de atrapar fármacos hidrófilos, lipófilos y anfílicos. Las vesículas son partículas coloidales tienen un núcleo lleno de agua rodeada por un muro de lípidos y tensoactivos organizada en bicapa como se muestra en la Figura 4. Si se aumenta la proporción de agua, estos anfífilos pueden formar una o más bicapas concéntricas.

Los fármacos hidrofílicos pueden encontrar un lugar en el núcleo acuoso, mientras que las drogas lipofílicas anfifílicas quedan atrapados en la pared de dos capas con electrostática y /o fuerzas hidrofóbicas [21].

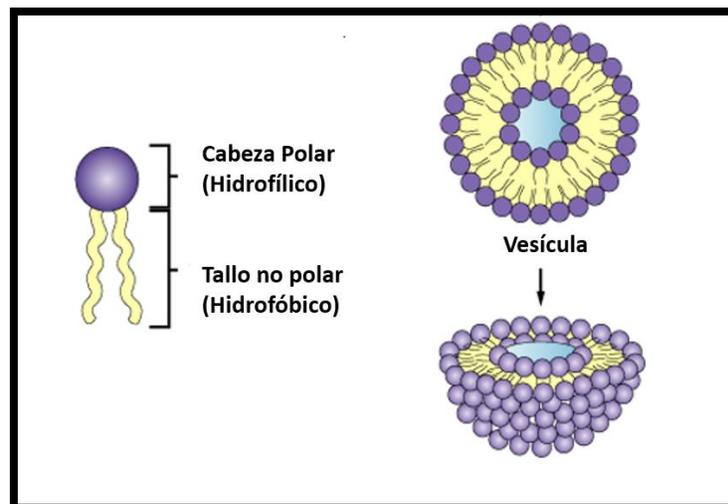


Figura 4. Estructura de una Vesícula.

II.2.1.2. Micelas

Las micelas son un auto-ensamblaje de partículas coloidales de tamaño nanométrico, con un núcleo hidrófobo y una membrana hidrífila, como se aprecia en la Figura 5.

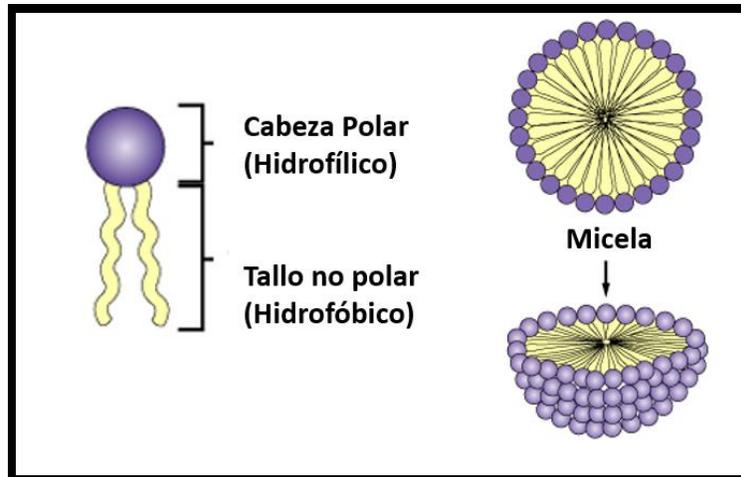


Figura 5. Estructura de una Micela.

Actualmente las micelas estas siendo utilizadas con éxito como vehículos farmacéuticos para drogas insolubles en agua, demostrando una serie de propiedades atractivas como portadores de drogas.

Las micelas poliméricas poseen una estabilidad para contener y liberar la droga, buena biocompatibilidad, y pueden solubilizar una amplia variedad de productos farmacéuticos poco solubles; muchas de estas micelas actualmente se encuentran en diferentes etapas de ensayos preclínicos y clínicos [22,23]. Y son la base de estudio en el desarrollo de este trabajo.

II.2.2. Auto-organización

El concepto de auto-organización se puede definir como la formación espontánea de estructuras complejas a partir de sus subunidades constituyentes. La auto-organización es la estrategia fundamental de la naturaleza para formar estructuras más y más complejas que dan lugar a la vida. En los sistemas vivos, diferentes procesos catalíticos producen la formación de macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y polisacáridos) a partir de sus monómeros (nucleótidos,

aminoácidos, ácidos grasos y monosacáridos), que en ocasiones se ensamblan entre sí mediante procesos de auto-organización.

La auto-organización resulta fundamental, por ejemplo, en la formación de micelas y membranas celulares a partir de los lípidos, en la polimerización de los microtúbulos de las células eucariotas a partir de las proteínas, o en la estructuración de los músculos a partir de fibras proteicas. El apareamiento de bases nitrogenadas para formar ADN o el plegado de proteínas son otros de los procesos auto-organizativos importantes en la vida.

II.3. Nanoemulsión

Una Nanoemulsión (NE), es un sistema de partículas dispersas constituidas por dos o más componentes inmiscibles entre sí, uno de ellos disperso dentro del otro en forma de gotas estabilizadas por un surfactante. Estas partículas dispersas son utilizadas para ayudar en el encapsulamiento y dispersión de partículas o moléculas no miscibles en un solvente específico. Actualmente, en este trabajo se busca explotar esta propiedad en la síntesis de vehículos en el encapsulamiento de drogas farmacéuticas que muestran una gran promesa para el futuro de la cosmética, diagnósticos, terapias y biotecnología.

Las Nanoemulsiones se pueden definir como agua en aceite (W/O) y aceite en agua (O/W); emulsiones con gotas de diámetros que van de 50 a 1000 nm. Por lo general, el tamaño medio de la gota es de entre 100 y 500 nm. Las partículas pueden existir como agua en aceite y aceite en agua, donde el núcleo de la partícula es o bien agua o aceite, respectivamente. NEs en este trabajo están hechas de surfactantes aprobados para el consumo humano y sustancias de los alimentos comunes que son "generalmente reconocidos como seguros".

La formación de una NE se debe a una emulsificación espontánea donde con la ayuda de un surfactante, se debilita la tensión superficial y se forman gotas

pequeñas por un autoensamblaje termodinámico (Figura 6). Presentan algunas propiedades como lo son: la facilidad de formación, estabilidad termodinámica, la facilidad de purificación, tamaño de gota y alta área superficial, lo que ayuda a un mejor apego a la superficie y al transporte de fármacos [24,25]

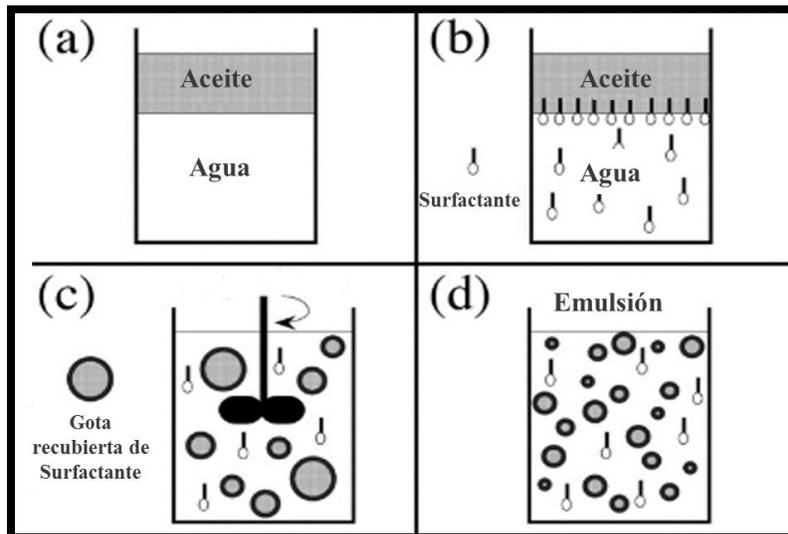


Figura 6. Formación de una Emulsión. a) Dos líquidos inmiscibles formando una separación de fases, b) La agregación de un surfactante rompe la tensión superficial, c) Se forman gotitas cubiertas de surfactante, d) Finalmente se tiene una sola fase dispersa.

II.3.1. Surfactantes

También llamados tensoactivos, son compuestos generalmente consistentes en una cabeza polar y una larga cadena alquilo apolar que, dependiendo de su afinidad se orientan en una interface. En la síntesis de nanopartículas se alinean y adsorben en su superficie, creando una capa orgánica que las estabiliza en la suspensión y pueden llegar a controlar la morfología y tamaño de la nanopartícula [26].

Dependiendo de la naturaleza del grupo hidrófilo, los tensoactivos se clasifican en:

Aniónicos: Los surfactantes aniónicos normalmente son sales donde la parte hidrofílica del surfactante posee una carga negativa, balanceada por un catión metálico como se muestra en la Figura 7. Los grupos hidrofílicos pueden ser, entre otros, carboxilato, sulfonato y sulfato.

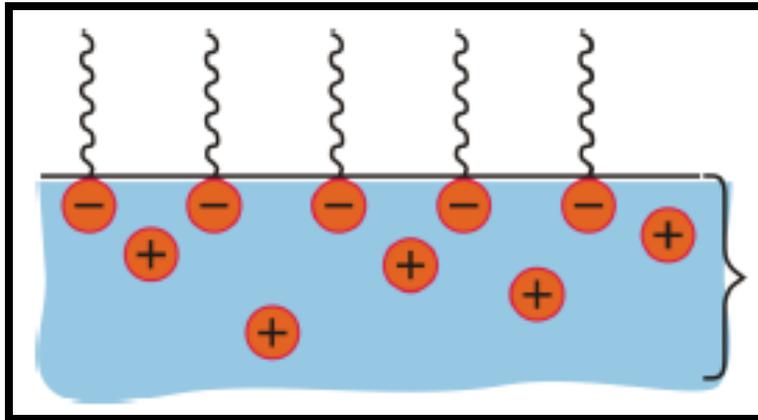


Figura 7. Surfactante Aniónico.

Catiónicos: En los surfactantes catiónicos la parte hidrofílica posee una carga positiva (Figura 8). Lo más común es encontrar sales de amonio cuaternario, normalmente como haluros.

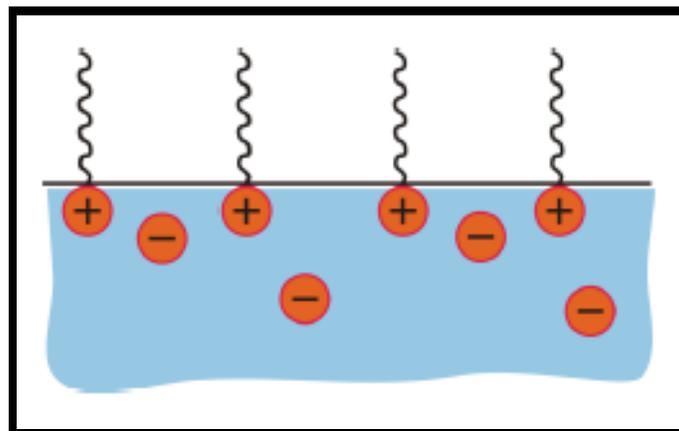


Figura 8. Surfactante catiónico.

No-iónicos: En estos casos, no existen grupos cargados en la parte hidrofílica, sin embargo, la solubilidad en agua se deriva de grupos muy polares como los polioxietilenos o polialcoholes.

En la Figura 9 tenemos dos casos de surfactantes No-iónicos donde podemos ver como la parte que contiene al grupo polar del surfactante es la que le da su solubilidad en el agua.

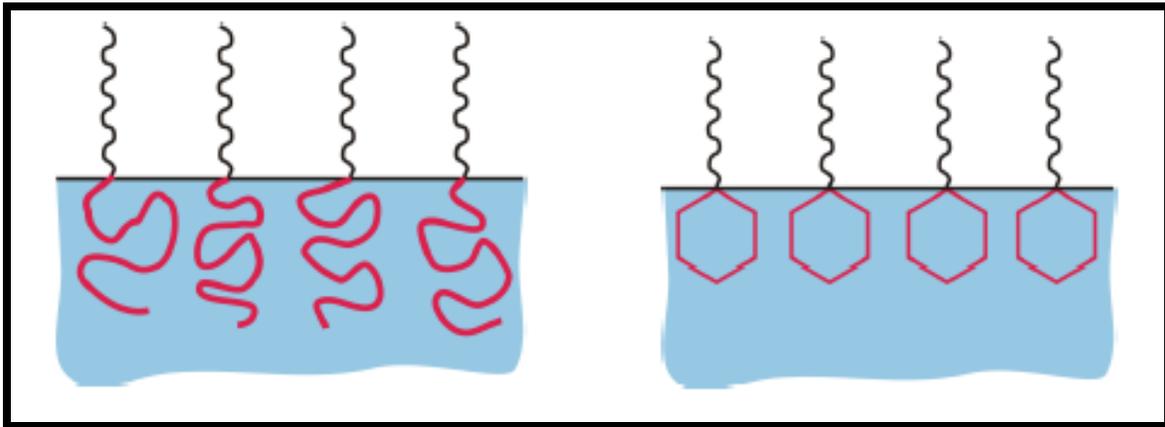


Figura 9. Surfactante No-Iónico.

Anfóteros: Estos surfactantes contienen, o pueden contener, cargas positivas y negativas al mismo tiempo (Figura 10) En este grupo encontramos derivados de aminoácidos.

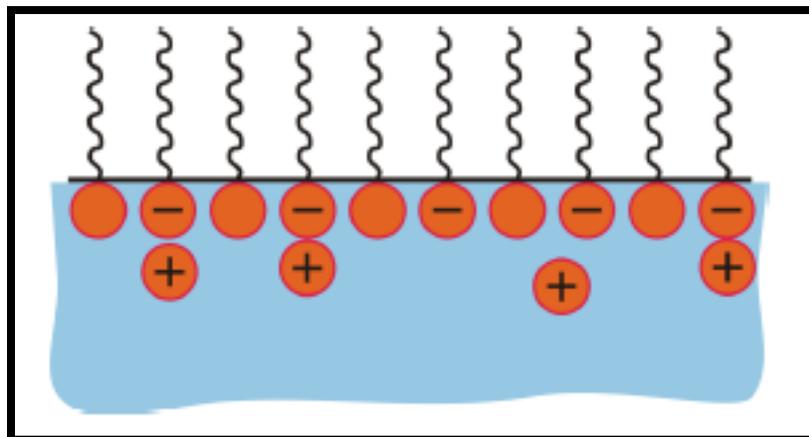


Figura 10. Surfactante Anfótero.

Dado que los surfactantes poseen una parte hidrofílica y una hidrofóbica, es de esperarse que cuando las moléculas de surfactante se encuentran en un medio completamente acuoso, tenderán a reducir la superficie de contacto del agua con las partes hidrofóbicas. Muchas veces esto se logra agregando las moléculas en forma de una gota, con las colas hidrofóbicas hacia adentro, de modo que la gota tiene un interior muy parecido a un hidrocarburo, mientras que la superficie es rica en grupos cargados con gran afinidad por el agua.

La agregación para formar micelas se presenta a partir de una cierta concentración de surfactante, la concentración micelar crítica (CMC) [27].

La CMC es una de las más importantes características de un surfactante, pues antes de alcanzarse la tensión superficial depende directamente de la concentración de surfactante, pero permanece constante o crece de forma suave a partir de la CMC. Su caracterización forma parte fundamental del estudio de moléculas anfífilas, como los lípidos y detergentes, para el estudio de emulsiones y del polimorfismo lipídico, de gran importancia para la descripción de las membranas celulares.

En la Figura 11 se observa cómo se forma una micela cuando se alcanza una cantidad adecuada de surfactante, es decir su CMC.

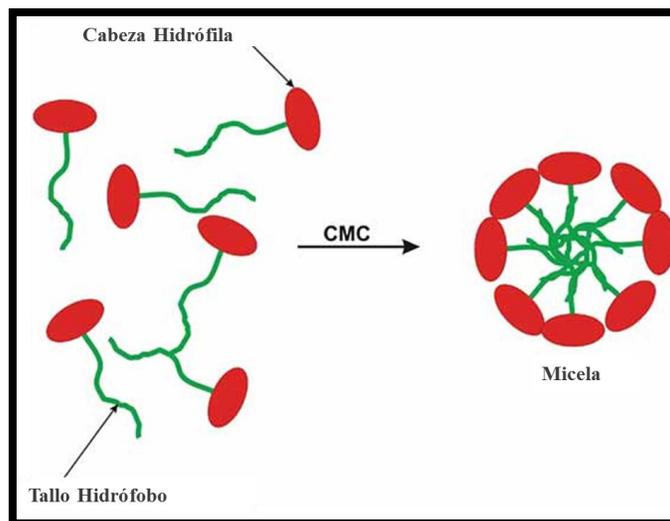


Figura 11. Formación de una micela a partir de su concentración micelar crítica.

II.4. Interacciones Coloidales

La interacción entre un par de las partículas coloidales es el resultado de interacciones entre todas las moléculas dentro de ellas, así como aquellos en el medio que intervienen. Por esta razón, muchas de las interacciones entre las partículas coloidales parecen a primera vista similares a las existentes entre moléculas, por ejemplo, Van der Waals, electrostáticos y estéricos.

Sin embargo, la característica de estas interacciones coloidales es a menudo diferentes de sus homólogos moléculas, a causa de las características adicionales que se presentan debido al tamaño relativamente grande de partículas coloidales y el número relativamente grande de diferentes tipos de moléculas implicadas.

Para obtener una solución coloidal estable generalmente es necesaria la modificación o funcionalización de la superficie de las nanopartículas con el objetivo de crear una barrera de energía que evite que se aglomeren (Figura 12). Esto puede ser modificando la carga de la superficie o cubriéndola con otro material. Para esto último suelen utilizarse compuestos orgánicos que actúan como surfactantes o polímeros que se adsorben a su superficie.

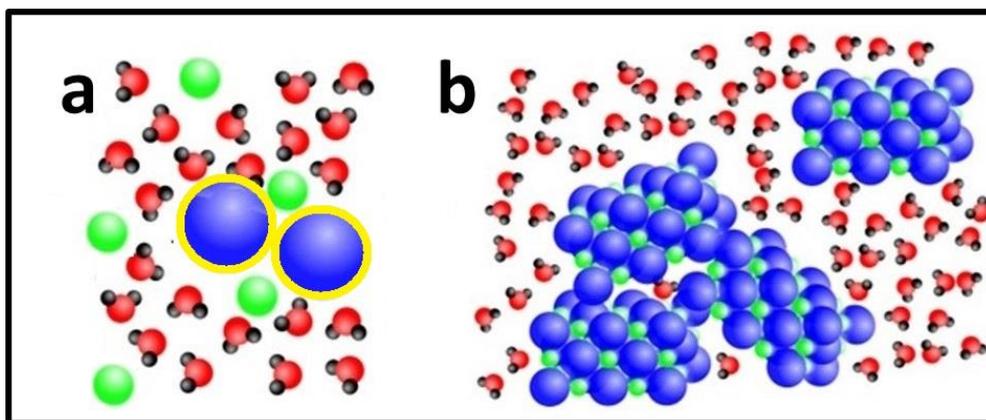


Figura 12. Dispersión coloidal, a) se muestra como cubriendo las nanopartículas con un material específico se crea una barrera de energía y evita que se aglomeren, b) por el contrario si las nanopartículas no estuvieran recubiertas con ese material se aglomerarían, dejando de ser una dispersión coloidal y pasaría a ser una suspensión.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Materiales

Para la síntesis de nanocápsulas se utilizaron los siguientes reactivos.

- a) κ -Carragenina (s), proporcionada por el Dr. Waldo Argüelles Monal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Guaymas, Sonora.
- b) DTAC (Cloruro de dodecil trimetil amonio) (s) marca Sigma-Aldrich.
- c) Ácido oleico purificado ($C_{18}H_{34}O_2$) (l). Marca FERMOT
- d) Alcohol etílico absoluto (C_2H_6O) (l).
- e) Acetona ($CH_3(CO)CH_3$) (l).
- f) Agua desionizada. (l)

III.2. Metodología

III.2.1. Metodología para la síntesis de nanocápsulas.

Las nanocápsulas son sistemas nano-vesiculares que presentan una estructura de núcleo-corteza, Figura 12, en el que el fármaco se limita a un depósito o dentro de una cavidad rodeada por una membrana de polímero o recubrimiento [28-31]. La cavidad puede contener la sustancia activa en forma líquida o sólida o como una dispersión molecular [31,32]. Así mismo, este depósito puede ser lipófilo o hidrófobo según al método de preparación y materias primas utilizadas. Además,

teniendo en cuenta las limitaciones operativas de los métodos de preparación, las nanocápsulas también pueden llevar a la sustancia activa en su superficie o membrana polimérica [30,33], como se muestra en la Figura 13.

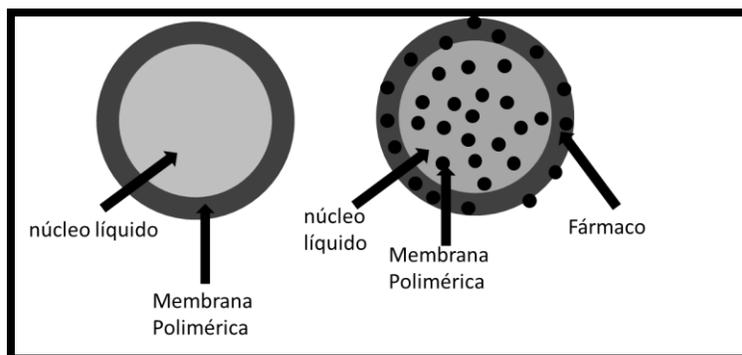


Figura 13. Estructura de una nanocápsula con núcleo líquido.

Generalmente existen 6 métodos para la preparación de nanocápsulas: Nanoprecipitación, Emulsificación-Difusión, Emulsificación-Coacervación, Doble Emulsificación, Recubrimiento de Polímero y Capa por Capa [30], mostrados en la Figura 14.

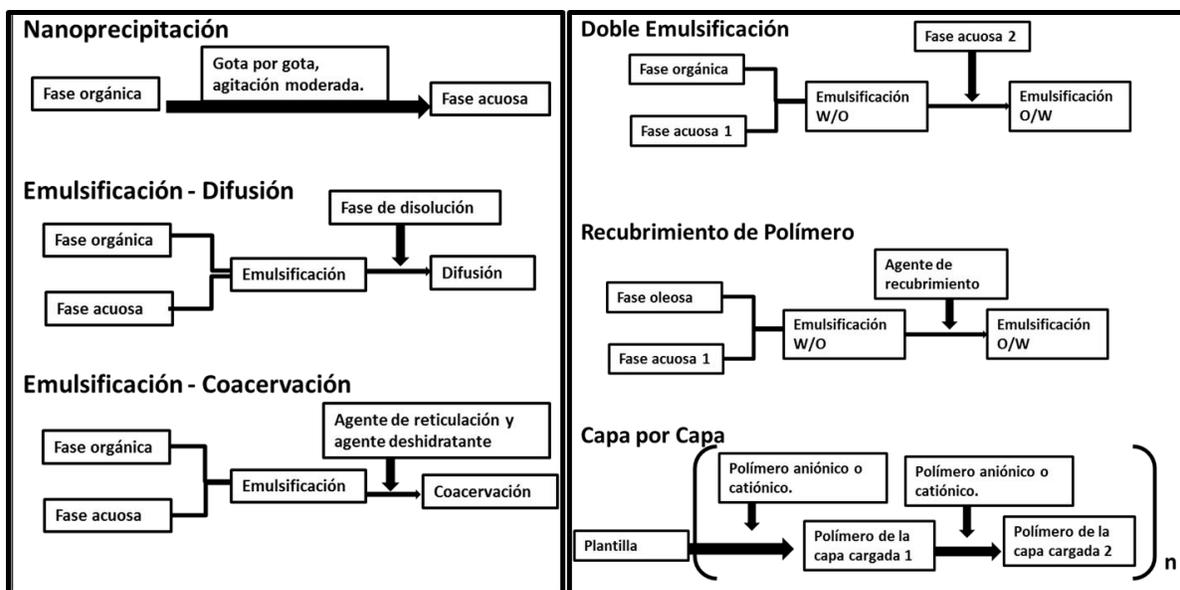


Figura 14. Métodos para la preparación de Nanocápsulas.

El método utilizado en este trabajo para sintetizar las nanocápsulas fue el de Nanoprecipitación [29].

Se prepararon 4 nanoemulsiones, variando la cantidad de surfactante a partir de su Concentración Micelar Crítica (CMC) en unidades mili molar (mM).

Para realizar la primera NE primeramente se preparó la fase orgánica que consistió en 120 mg de DTAC, 0.5 mL de Alcohol Etilico, 88 μ L de Ácido Oleico y 9.5 mL de Acetona.

Se observó como el surfactante hizo miscibles los solventes orgánicos con el Ácido Oleico, e inmediatamente se puso en contacto la fase orgánica con la fase acuosa: 20 mL de Agua desionizada, la cual estaba siendo agitada magnéticamente. Al poner las dos fases en contacto se formó inmediatamente, una solución con un aspecto blanquecino, indicativo de una nanoemulsión.

Una vez obtenida la NE se puso a rota-evaporar por 8 minutos con el fin de eliminar el solvente hasta tener una tercera parte del volumen inicial, este paso se muestra en la Figura 15.

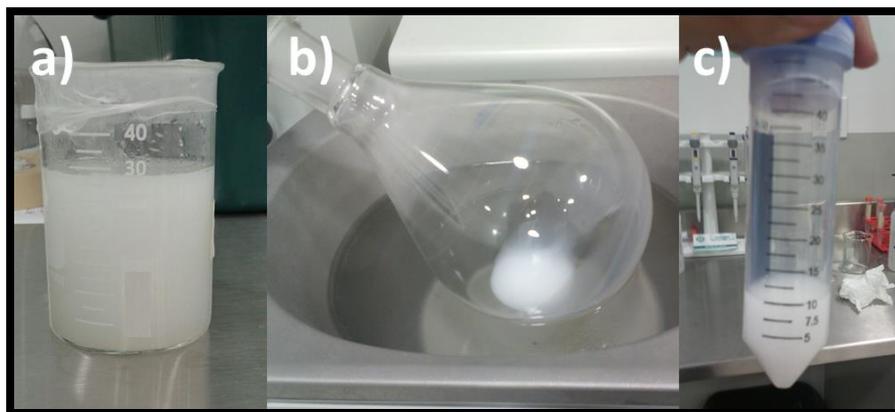


Figura 15. Pasos para obtener la NE. a) Formación, b) Rota-Evaporación, c) Volumen Final.

Después se prepararon las 3 NEs restantes en las cuales se llevó a cabo el procedimiento explicado anteriormente, solo que para cada una se varió su cantidad de surfactante: 13.2, 52.8 y 184.8 mg, quedando las cantidades de

surfactante mostradas en la Tabla I.

Tabla I. Cantidad de surfactante utilizado para cada NE.

# NE	Concentración de Surfactante (mg/ml)	Moles de Surfactante (mM)
1	1.3	5
2	5.3	20
3	12	45
4	18.5	70

En la Figura 16 se puede observar el procedimiento explicado anteriormente, para la síntesis de nanocápsulas mediante el método de nanoprecipitación.



Figura 16. Diagrama de flujo para la síntesis de nanocápsulas.

III.2.2 Metodología para el recubrimiento de nanocápsulas.

Después de rota-evaporar las nanoemulsiones se dejaron reposar 24 horas aproximadamente para lograr su estabilización. Transcurrido ese tiempo se agito con vortex para homogenizar y posteriormente se continuo con el recubrimiento del polímero κ -Carragenina (0.5 mg/mL), variando su volumen y la de agua desionizada. Para llevar a cabo este paso se hicieron diluciones 1:100 para lograr un mejor recubrimiento.



Figura 17. Recubrimiento de la Nanoemulsión.

El recubrimiento se llevó a cabo en una placa de 24 pozos, como se muestra en la Figura 17, realizando 4 pruebas utilizando 4 diferentes volúmenes en μL de κ -Carragenina como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla II. Volúmenes en μL utilizados de Nanoemulsión, κ -Carragenina y agua desionizada para cada prueba con su respectivo volumen final

Prueba	V_{NE}	$V_{\kappa\text{-CARR}}$	$V_{\text{H}_2\text{O}}$	V_{final}
1	125	20	0	145
2	125	15	5	145
3	125	10	10	145
4	125	5	15	145

Una vez obtenido el volumen final de cada prueba, se agitó con la ayuda de una micro pipeta y se dejó reposar por 1 hora. Las 4 pruebas descritas en la tabla anterior se repitieron para cada NE con su diferente concentración de surfactante.

A continuación se muestra el diagrama (Figura 18) con el procedimiento para el recubrimiento con polímero de las nanocápsulas:



Figura 18. Diagrama de flujo del procedimiento llevado a cabo para el recubrimiento con polímero κ-Carragenina

Una vez pasando el tiempo para que realizara el recubrimiento se pasó a la caracterización de las nanocápsulas obtenidas.

III.3. Caracterización

III.3.1. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Esta técnica se basa en el movimiento Browniano de las partículas en la solución, un láser incide en la solución, se miden las variaciones en la cantidad de luz dispersada mediante un arreglo óptico.

A diferencia de la dispersión de luz estática, para determinar el tamaño de las partículas la dispersión de luz dinámica no tiene en cuenta la dependencia del ángulo, sino la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo.

Al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, la luz láser se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada y en base a esta un diámetro hidrodinámico. Para realizar las mediciones requeridas en este trabajo se utilizó un equipo Zetasizer Nano SZ, En los laboratorios NICDET de Rubio Pharma.

III.3.2. Potencial Zeta (PZ)

Es una técnica usada para medir el movimiento de las partículas cargadas bajo un campo eléctrico. La luz difundida por una partícula en movimiento experimenta un cambio de frecuencia que solo se puede medir por una mezcla de técnicas ópticas.

El potencial Z es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla. Por lo tanto, el potencial zeta es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas externas que rodean a la

partícula. Se utilizó el mismo equipo que para las pruebas de DLS.

III.3.3. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

El AFM es una técnica de medida superficial que se basa en la interacción de una punta con la superficie de la muestra. Esta técnica permite el análisis superficial de muestras con resolución nanométrica o incluso atómica. Como principal ventaja tiene la posibilidad de hacer medidas sin ningún tratamiento previo de la muestra a medir, y sin la necesidad de emplear vacío.

Está basado en la medida de la fuerza de interacción entre una punta aguda ($<100 \text{ \AA}$ de diámetro) y una superficie a distancia muy cortas (2-100 \AA de separación).

Las pruebas se realizaron con un equipo Veeco Di Innova, en los laboratorios de NICDET en Rubio Pharma.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Para medir el tamaño del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas se utilizó el equipo mencionado anteriormente, en total se realizaron 16 mediciones (cada una por triplicado) variando el volumen de polímero y la concentración de surfactante.

Se realizaron gráficos de las distribuciones del tamaño del diámetro hidrodinámico (nm) contra el porcentaje de intensidad del número de partículas de cierto tamaño, de cada muestra con su respectiva cantidad de surfactante y cada una con los diferentes volúmenes de polímero.

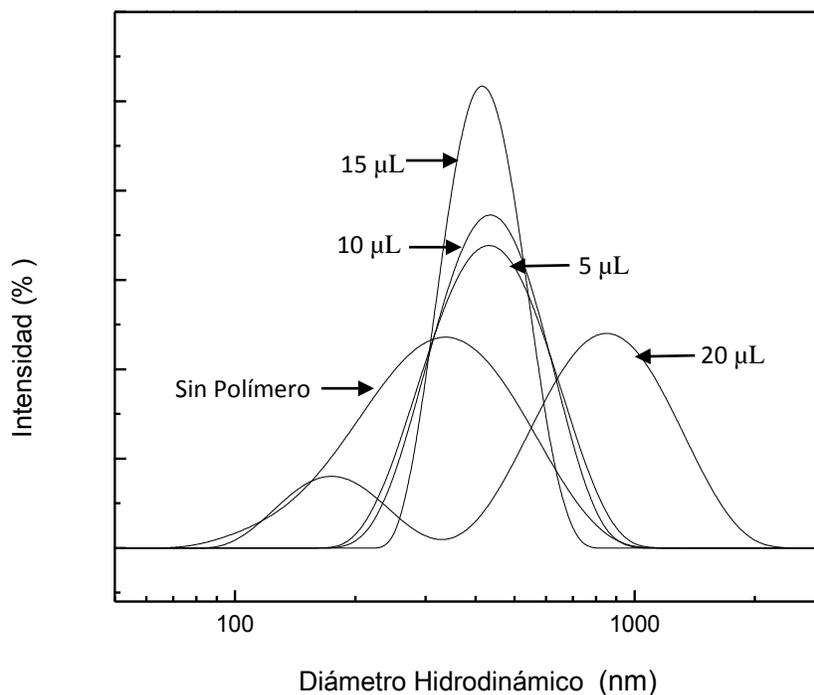


Figura 19. Gráfico que muestra el las distribuciones de tamaño del Diámetro Hidrodinámico (nm) en función de la intensidad (%) del número de partículas de la muestra de 5 mM.

Se puede observar en la Figura 19 las distribuciones de tamaños para cada cantidad de polímero, entre más estrecha es la distribución nos indica una muestra mucho menos polidispersa.

Se observan dobles distribuciones de tamaño las cuales pueden deberse a cierta cantidad de aceite que no logro encapsularse, o simplemente un porcentaje muy pequeño de que en la NE predomina otro valor promedio de tamaño de las nanopartículas.

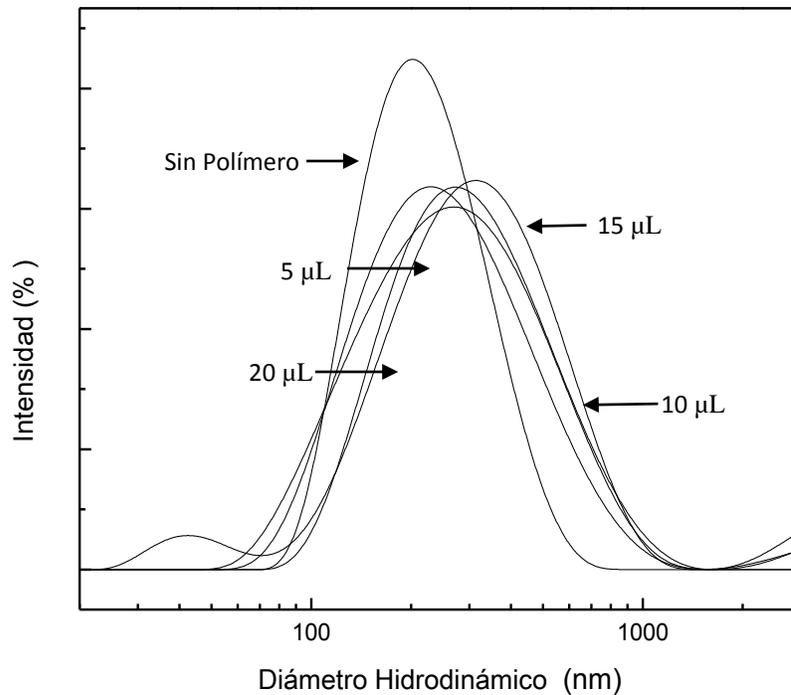


Figura 20. Grafico que muestra el las distribuciones de tamaño del Diámetro Hidrodinámico (nm) en función de la intensidad (%) del número de partículas de la muestra de 20 mM.

La Figura anterior muestra los diferentes tamaños para la muestra con la cantidad ideal de surfactante, encontrada en la literatura para el DTAC en agua pura a 25°C, es decir su CMC: 20 mM.

Se observa como a pesar que las distribuciones son más estrechas se encuentra una doble distribución de tamaño para la muestra de 15 µl, que puede decirse es cierta cantidad muy pequeña de aceite que no logro encapsularse ya que el porcentaje de intensidad es muy pequeño.

También en el gráfico podemos observar como hay mayor uniformidad de tamaños en comparación con las otras NEs.

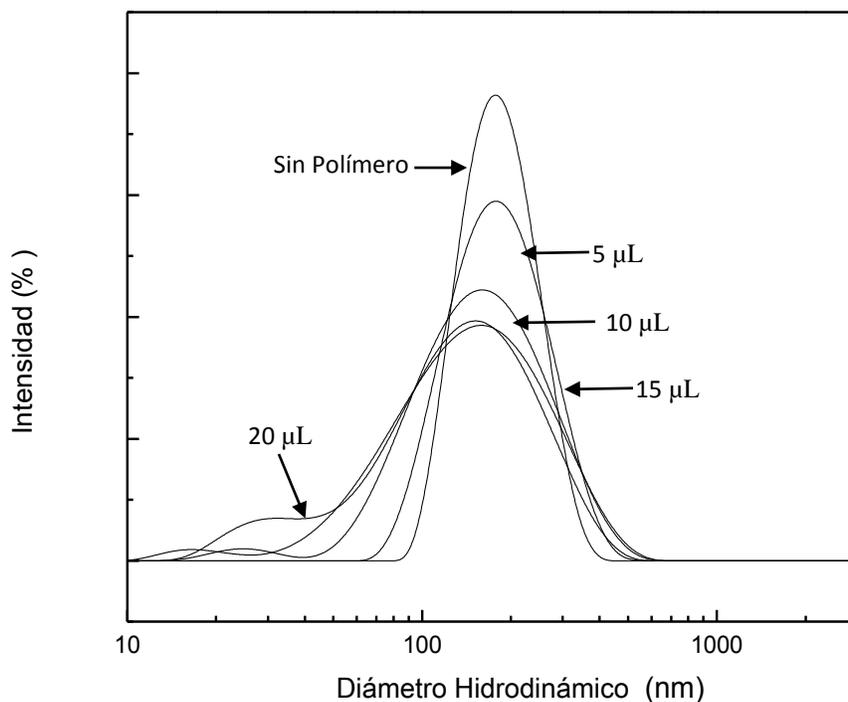


Figura 21. Gráfico que muestra el las distribuciones de tamaño del Díametro Hidrodinámico (nm) en función de la intensidad (%) del número de partículas de la muestra de 45 mM.

En la Figura 21 se presenta una muestra en la cual su concentración en moles es de 45 mM superando por más del doble la muestra pasada (20mM).

En esta NE podemos observar que para los volúmenes de polímero de 10,15 y 20 μL las distribuciones de tamaño son más polidispersas, además para los casos de 10 y 15 μL las dobles distribuciones son con porcentajes muy cerca de cero por lo que pueden despreciarse.

Se observa como la muestra que contiene 5 μL es la única en la cual solo existe una distribución de tamaño con un promedio de aproximadamente 226 nm.

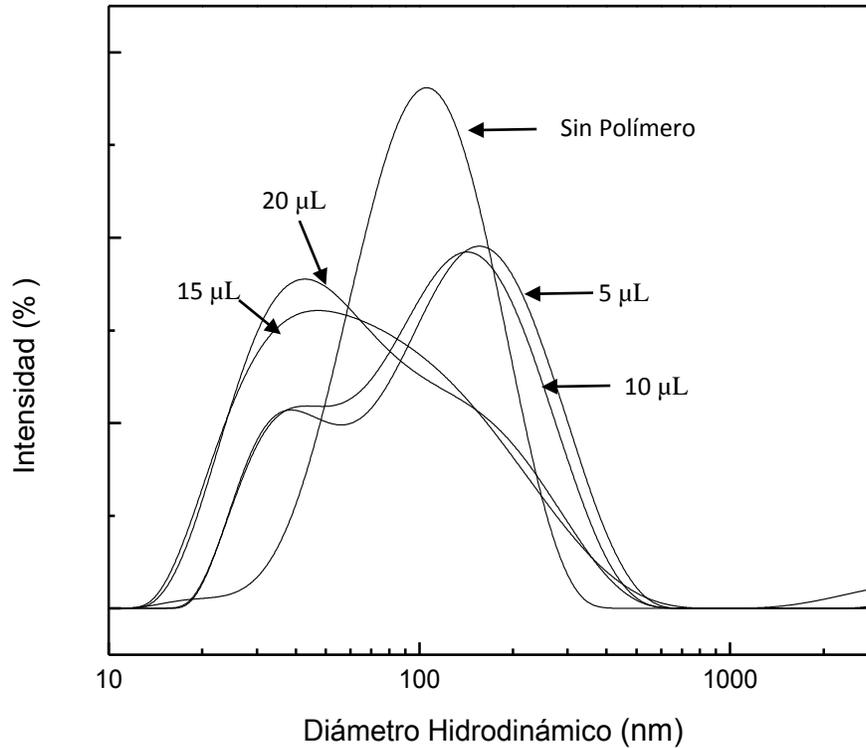


Figura 22. Grafico que muestra el las distribuciones de tamaño del Diámetro Hidrodinámico (nm) en función de la intensidad (%) del número de partículas de la muestra de 70 mM.

En el grafico que se presenta en la Figura 22, se observa como las distribuciones de tamaño son muy poli dispersas, excepto la muestra que no contiene polímero.

Para los casos de 5 y 10 μl se marca muy claro un comportamiento bimodal y se observa como los valores de esta muestra son más pequeños que las NE anteriores, esto podría deberse a que la NE está saturada de surfactante el cual no cuenta con suficiente aceite para encapsular y por eso forma micelas solo de él mismo con diferentes tamaños.

Para tener una idea más clara del comportamiento del tamaño del diámetro hidrodinámico con sus variables se realizó el siguiente gráfico.

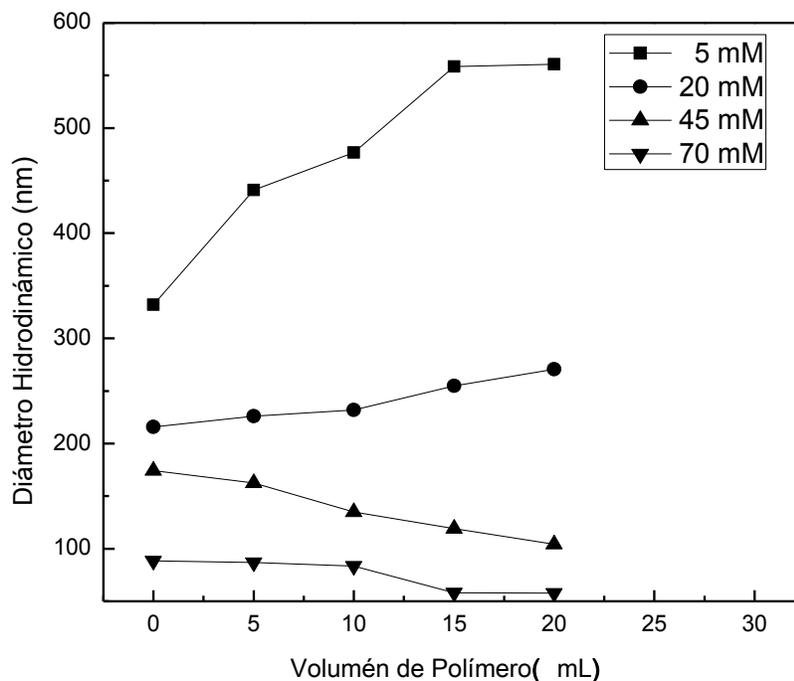


Figura 23. Grafico que muestra el comportamiento del Diámetro Hidrodinámico (nm) al variar el Volumen de Polímero (μ l) y su Concentración de Surfactante (mM).

En la Figura 23 se puede observar como la muestra que se realizó con una concentración de surfactante de 5 mM presenta los mayores tamaños con un comportamiento creciente que va desde 332.10 nm a 560.80 nm, en el caso de la muestra de 20 mM su comportamiento es creciente, pero sus tamaños e incrementos son menores que 5 mM, considerando que 20 mM es la cantidad de adecuada para el DTAC, se tienen los valores de 215.80 nm a 270.60 nm (Ver Tabla V en la sección de anexos).

Los incrementos en el tamaño son debido a que entre mayor cantidad de polímero se agregue el polímero se desenvuelva mejor en el disolvente haciendo así que su diámetro hidrodinámico presente un mayor tamaño. Por el contrario las muestras de 45 y 70 mM presentan un comportamiento decreciente con valores de 174.20 nm a 104.10 nm y de 88.34nm a 57.77 nm, respectivamente.

Este decremento de tamaño podría deberse a que las muestras se están saturando del surfactante ya que estas están por encima de su CMC, entonces al

saturarse de surfactante podrían formarse micelas del mismo tensoactivo, es decir, que el aceite al no ser suficiente comparado con el surfactante, el exceso del mismo forme micelas sin núcleo oleoso. Favoreciendo posiblemente la formación de los tamaños más pequeños reportados constituidos de DTAC recubierto con κ -Carragenina.

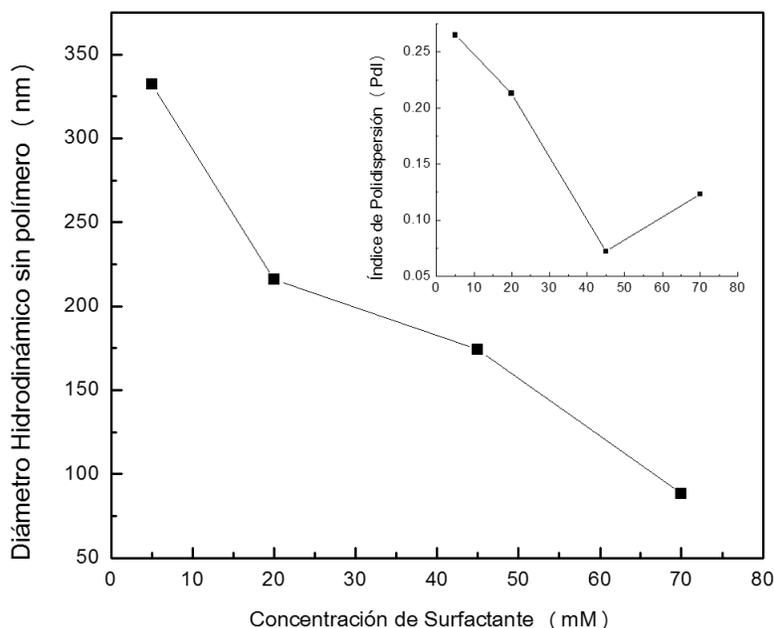


Figura 24. Gráfico que muestra el comportamiento del Diámetro Hidrodinámico (nm) y el índice de Polidispersión conforme aumenta la Concentración de Surfactante (mM)

En la Figura 24 se muestra un comparativo de cómo se comporta el tamaño del Diámetro Hidrodinámico y el índice de Polidispersión (PDI) conforme se va aumentando la Concentración de Surfactante, sin agregar el polímero.

Se observa que entre más surfactante se agrega el tamaño de la partícula va disminuyéndose, mientras que para el PDI en las cantidades de 5, 20 y 45 mM va disminuyendo, haciéndose más monodisperso, pero al agregar una cantidad de 70 mM la muestra se vuelve dispersa que la muestra de 45 mM.

IV.2. Potencial Zeta (PZ)

Para medir el potencial zeta de las Nanoemulsiones se utilizó el mismo equipo con el cual se midió el tamaño del diámetro hidrodinámico.

Se puede observar en la Figura 25 como las muestras que no presentan cantidad alguna de κ -Carragenina tienen una carga positiva, esto se debe a que el DTAC es un surfactante catiónico. Conforme se va agregando polímero la muestra se vuelve negativa ya que la κ -Carragenina contiene carga aniónica, eso nos indica que el sistema se está recubriendo ya que esta predominando la carga del polímero. Para tener una idea más clara de los datos obtenidos ver la Tabla VI en la sección de anexos.

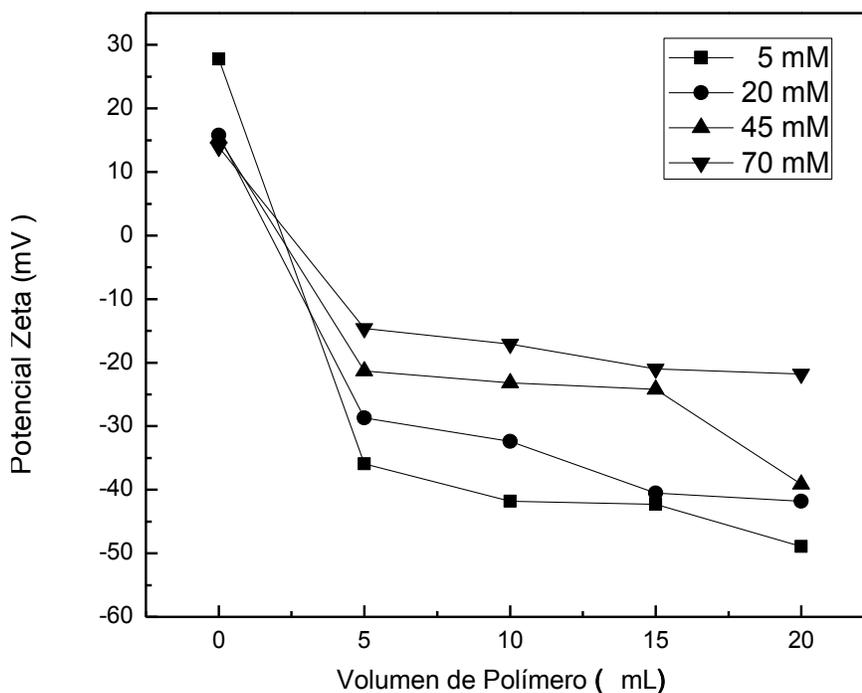


Figura 25. Valores de Potencial Zeta obtenidos variando la Concentración de Surfactante y el Volumen de Polímero.

IV.3. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

Después de obtener los valores del diámetro hidrodinámico y potencial zeta para cada muestra, se realizaron muestras en el AFM para ver el tamaño real de las nanopartículas.

Se prepararon las muestras que contenían la mayor cantidad de polímero, 20 μ l, para los CMC de 5, 20, 45 y 70 mM.

Para el caso de 20 mM se hicieron pruebas también para 5, 10 y 15 μ l, teniendo en total 7 muestras de las cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

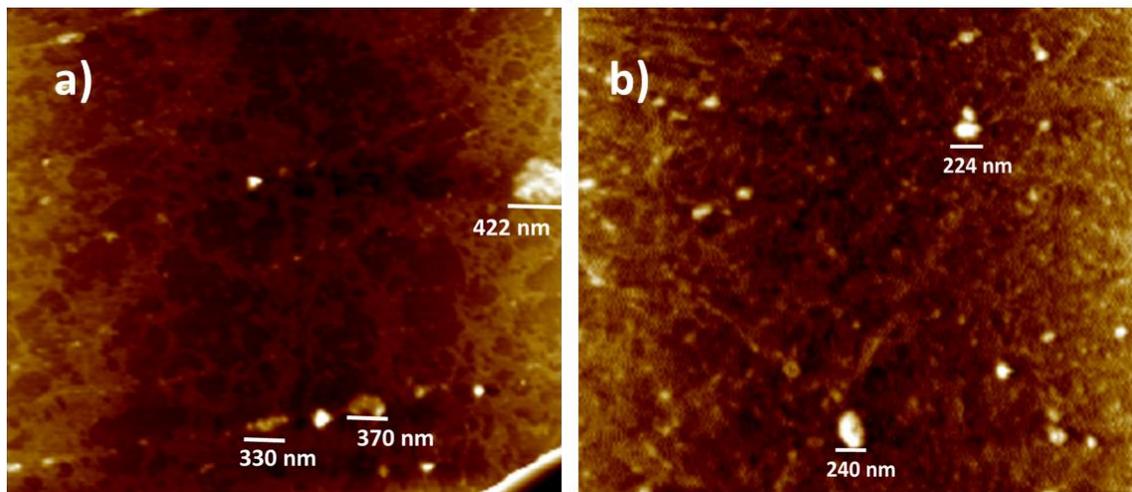


Figura 26. Tamaños de las muestras obtenidos por AFM para 20 μ l de polímero. a) 5 mM, b) 20 mM.

En la Figura 26 se puede ver como para una concentración menor, 5 mM, el tamaño de partícula es mayor que para 20 mM. Para este último caso vemos como se nota un poco más uniformidad en los tamaños (un promedio de 224.7 nm) en comparación con la imagen a, en la cual se observan tamaños muy pequeños hasta 422 nm.

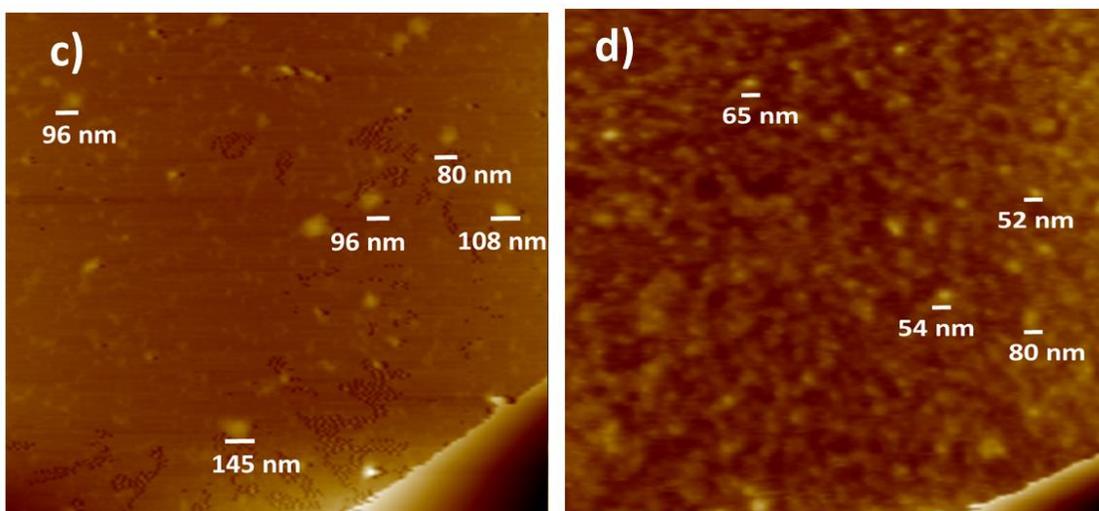


Figura 27. Tamaños de las muestras obtenidos por AFM para 20 μ l de polímero. c) 45 mM, d) 70 mM.

En la Figura 27, en las imágenes c y d, se muestran los tamaños de partícula para cantidades de surfactante que superan el CMC ideal. Se observa como entre más DTAC se agrega el tamaño de partícula es menor, en el caso de 70 mM se encontraron tamaños hasta de 52 nm, las cuales podrán ser solo micelas de surfactante sin aceite ya que la NE está saturada de este tensoactivo.

En la Tabla III se muestran los tamaños obtenidos para cada concentración de surfactante utilizadas en esta experimentación y 20 μ l de polímero.

Tabla III. Tamaños obtenidos en AFM para todas las Concentraciones de Surfactante utilizadas con un Volumen de Polímero de cantidad de 20 μ l.

mM	Tamaño (nm)
5	345.3
20	224.7
45	95
70	62.7

Se observa en la tabla anterior que, al igual que los resultados en DLS, al ir aumentando la cantidad de surfactante el tamaño de las nanopartículas va disminuyendo.

En la Figura 28 se muestran las imágenes de los tamaños para cada cantidad de polímero para la muestra de 20 mM.

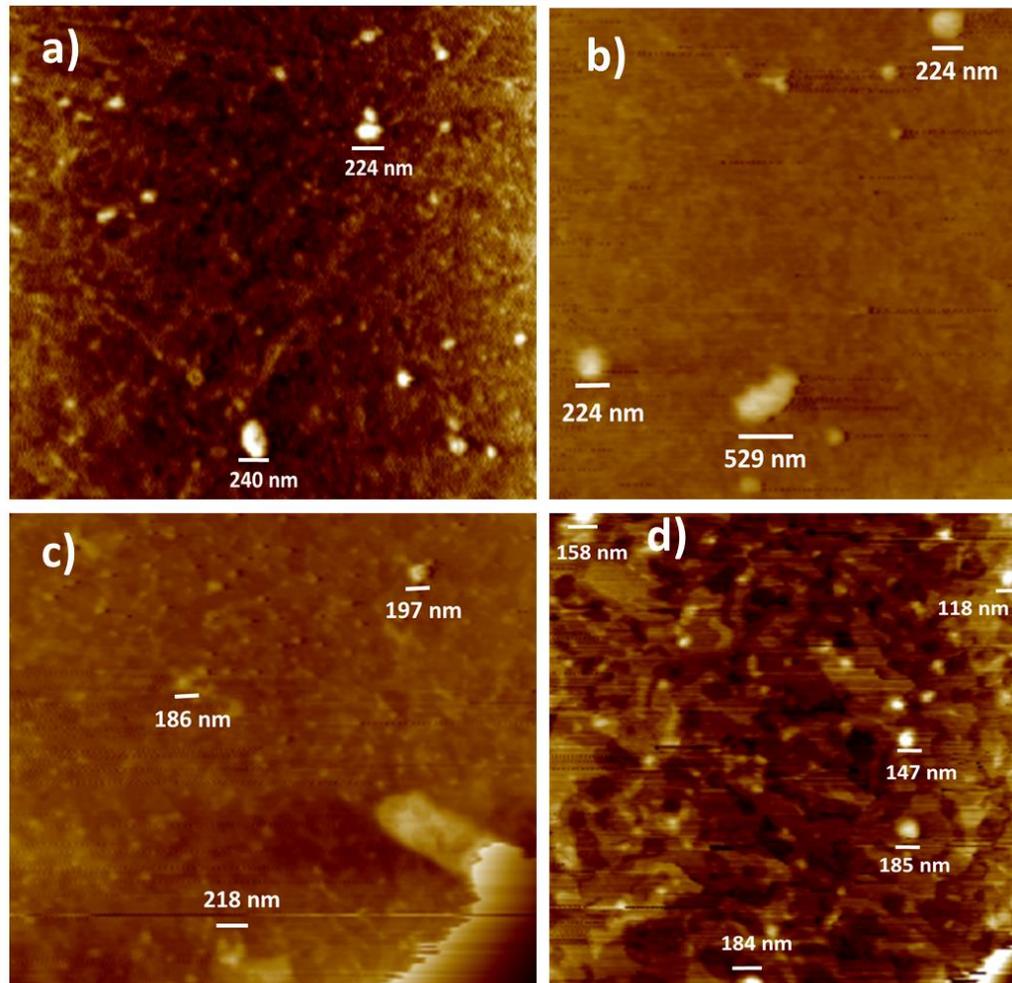


Figura 28. Tamaños obtenidos por AFM para la muestra 20 mM. a) 20 μ l, b) 15 μ l, c) 10 μ l, d) 5 μ l.

En esta imagen se puede observar como las cantidades de 5 y 20 μ l de κ -Carragenina son las que presentan mayor uniformidad de tamaño mientras que las cantidades de 10 y 15 μ l tienen aglomerados de hasta más de 500 nm.

En la siguiente Tabla se muestran los valores promedios de tamaños obtenidos para la muestra de CMC 20 mM con todas sus cantidades de polímeros estudiadas.

Tabla IV. Tamaños promedio obtenidos del AFM para el CMC (20 mM).

Volumen de Polímero (μL)	Tamaño (nm)
5	169.7
10	203.6
15	222.7
20	224.7

Se observa como entre más cantidad de polímero se agrega aumenta el tamaño de partícula, esto se debe a que entre más κ -Carragenina se tiene, ésta se desenvuelve mejor en su medio, agregando así más tamaño a las nanocápsulas.

Para tener un mejor enfoque de los resultados obtenidos por DLS y por AFM se realizaron los siguientes gráficos comparativos (Figura 29, Figura 30) con el fin de observar las diferencias de tamaños en medio húmedo (DLS) así como en un medio seco (AFM).

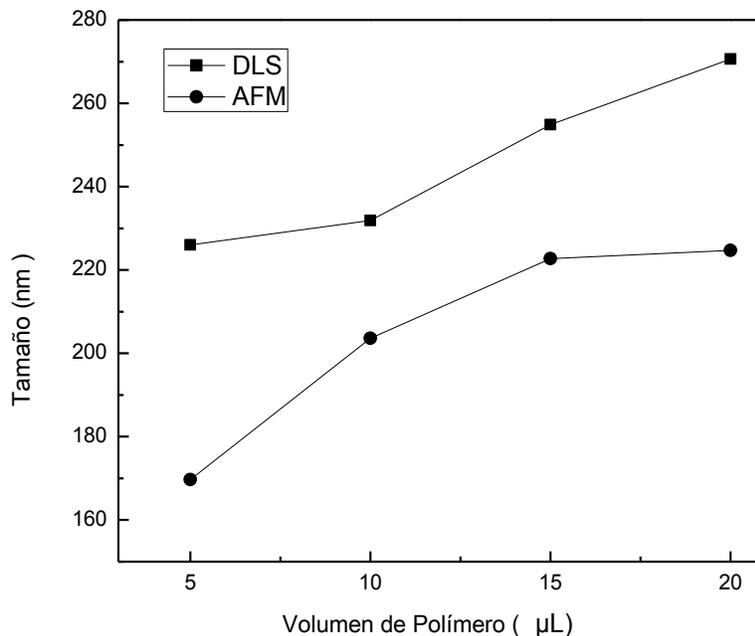


Figura 29. Comparación entre los tamaños obtenidos por DLS y AFM para la muestra de 20 mM variando el volumen de polímero.

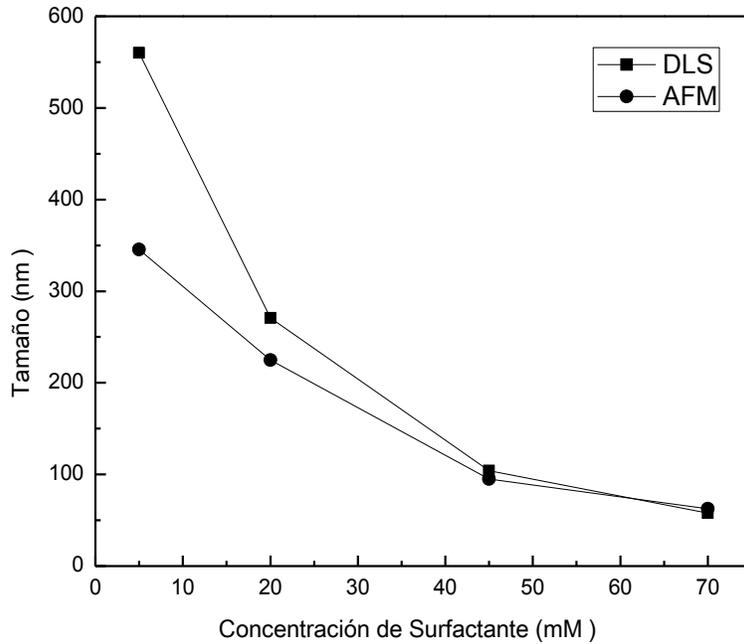


Figura 30. Comparación entre los tamaños obtenidos por DLS y AFM para las muestras de 20 μ l y las 4 Concentraciones de Surfactante, 5,20,45, y 70 mM

Se observa en las Figuras 29 y 30 como los tamaños obtenidos en DLS son mayores que los de AFM, esto se debe a que el tamaño que da el DLS es su Diámetro Hidrodinámico, es decir es el diámetro que obtiene la partícula al nadar dentro de una solución; por el contrario los tamaños obtenidos en AFM son de una muestra totalmente seca por eso tienden a dar tamaños menores (Ver Tabla VII en la sección de anexos).

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1. Conclusiones

- Se logró sintetizar nanocápsulas con núcleo oleoso a base de ácido oleico y DTAC como surfactante, mediante la técnica de nanoprecipitación.
- Se pudo observar el efecto que se tiene al utilizar diferentes cantidades de surfactante, basándose en la concentración micelar crítica se obtuvo que entre más surfactante tenga una nanoemulsión, el tamaño de partícula será menor.
- Mediante la técnica de caracterización de Potencial Zeta, pudo comprobarse que las nanocápsulas se lograron recubrir con κ -Carragenina, ya que ésta posee una carga negativa la cual predominó después de agregar el polímero a la nanoemulsión que contenía una carga positiva.
- Se estudió los tamaños del diámetro hidrodinámico con la técnica de dispersión de luz dinámica y se observó que al agregar diferentes cantidades de κ -Carragenina para los casos de 5 y 20 mM el tamaño de partícula, pero para los casos de 45 y 70 mM el tamaño de partícula es mucho más pequeño.
- En base a los datos obtenidos se encontró que el tamaño y carga recomendable para utilizar en el cuerpo humano están en la NE de 20 mM de surfactante con las cantidades de 5 y 10 μ L.
- Mediante la caracterización en el Microscopio de Fuerza Atómica se pudo comprobar la existencia de nanocápsulas y las mismas tendencias respecto al tamaño, al igual que la técnica por DLS.

V.2. Recomendaciones

- Hacer pruebas de estabilidad para ver el comportamiento que tienen las Nanoemulsiones conforme pasa el tiempo.
- Utilizar el Microscopio Electrónico de Barrido para tener una mayor certeza del tamaño real de las nanocápsulas.
- Realizar pruebas de pH y sales para saber cómo reaccionarían las nanopartículas en el cuerpo humano.
- Desarrollar estudios de biocompatibilidad en tejidos celulares para evaluar la degradación, sensibilización y citotoxicidad.
- Probar con diferentes medios fisiológicos para ver cuál es más biocompatible con el cuerpo humano.

VI. ANEXOS

VI.1. ANEXOS

En la Tabla V. se muestran los tamaños del diámetro hidrodinámico, en nm, obtenidos con sus dos variables, cada valor con su desviación estándar y su índice de polidispersión (PDI).

Se observa como conforme se va agregando la cantidad de surfactante el tamaño de partícula va disminuyendo.

También se ve como al ir agregando más volumen de polímero e tamaño de nanocápsula va aumentando, esto se debe a que la κ - carragenina aporta su tamaño desenvolviéndose en su medio para los casos de 5 y 20 mM, pero para los casos de 45 y 70 mM conforme se agrega más polímero el tamaño va disminuyendo.

Tabla V.. Diferentes tamaños de Diámetro Hidrodinámico (nm) con las variaciones de Volumen de Polímero (μ l) y concentraciones de surfactante (mM) utilizadas.

Volumen de Polímero (μ L)	5 mM	Pdl	20 mM	Pdl	45 mM	Pdl	70 mM	Pdl
0	332.10 \pm 2.25 nm	0.265	215.80 \pm 1.80 nm	0.213	174.20 \pm 3.30 nm	0.072	88.34 \pm 1.25 nm	0.123
5	441.00 \pm 4.36 nm	0.221	226.00 \pm 2.09 nm	0.24	162.60 \pm 4.02 nm	0.155	86.75 \pm 2.33 nm	0.309
10	476.80 \pm 2.80 nm	0.396	231.90 \pm 0.86 nm	0.258	134.90 \pm 3.21 nm	0.222	83.45 \pm 0.41 nm	0.386
15	558.50 \pm 4.74 nm	0.415	254.90 \pm 3.53 nm	0.392	119.00 \pm 1.42 nm	0.268	58.03 \pm 1.54 nm	0.399
20	560.80 \pm 1.60 nm	0.631	270.60 \pm 5.53 nm	0.412	104.10 \pm 1.09 nm	0.85	57.77 \pm 0.17 nm	0.397

En la siguiente Tabla se muestra los valores que se obtuvieron del potencial zeta para cada muestra.

La caracterización por la técnica de Potencial Zeta nos indicó que se estaba llevando a cabo un recubrimiento del sistema ya que para todas las NEs su carga inicial era positiva y cuando se agregó el primer volumen de polímero cambio a

negativa, de igual manera conforme se agregaron diferentes volúmenes de k-carragenina el sistema se volvió más y más negativo.

Tabla VI. Valores del Potencial Zeta obtenidos para los diferentes valores de concentraciones de Surfactante y Volumen de Polímero.

Volumen de Polímero (μL)	5 mM	20 mM	45 mM	70 mM
0	+27.80 \pm 0.66 mV	+15.80 \pm 0.48 mV	+15.30 \pm 1.28 mV	+13.90 \pm 2.61 mV
5	-35.90 \pm 3.27 mV	-28.70 \pm 0.49 mV	-21.30 \pm 0.55 mV	-14.60 \pm 1.00 mV
10	-41.80 \pm 0.68 mV	-32.40 \pm 1.30 mV	-23.20 \pm 3.52 mV	-17.10 \pm 2.19 mV
15	-42.30 \pm 1.01 mV	-40.50 \pm 0.40 mV	-24.20 \pm 1.23 mV	-21.00 \pm 0.56 mV
20	-48.90 \pm 0.50 mV	-41.80 \pm 0.51 mV	-31.80 \pm 2.90 mV	-21.80 \pm 1.76 mV

En la Tabla VII, se puede observar como para las técnicas de DLS y AFM se obtuvieron las mismas tendencias en resultados, también que los valores obtenidos en DLS son mayores que los de AFM, esto se debe a que el tamaño que da el DLS es su Diámetro Hidrodinámico, es decir es el diámetro que obtiene la partícula al nadar dentro de una solución; por el contrario los tamaños obtenidos en AFM son de una muestra totalmente seca por eso tienden a dar tamaños menores.

Tabla VII. Comparación de los tamaños obtenidos por DLS y AFM para 20 mM variando el volumen de polímero, y para cada una de las concentraciones de surfactante 5,20,45 y 70 mM con 20 μl de polímero.

Volumen de Polímero (μL)	DLS	AFM	Concentración de Surfactante (mM)	DLS	AFM
5	226.0 \pm 2.09 nm	169.7 \pm 11.5 nm	5	560.80 \pm 1.60 nm	345.3 \pm 21.7 nm
10	231.9 \pm 0.86 nm	203.6 \pm 14.5 nm	20	270.60 \pm 5.53 nm	224.7 \pm 11.0 nm
15	254.9 \pm 3.53 nm	222.7 \pm 7.1 nm	45	104.10 \pm 1.09 nm	95.0 \pm 14.1 nm
20	270.6 \pm 5.53 nm	224.7 \pm 11 nm	70	57.77 \pm 0.17 nm	62.7 \pm 12.8 nm

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Park J, L. R.** *Biomaterials: An Introduction*. Springer Science. 2010.
2. **Park J.B.** *Biomaterials Science and Engineering*. New York: Springer Science 2013.
3. **Pignatello R.** *Biomaterials science*, 2011; ISBN 978-953-51-1051-4, 568
4. **Millán C.** *Análisis Termogravimétrico de la Síntesis de Hidroxiapatita Via la Técnica Sol-Gel*. Thesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.
5. **Fred W., Billmeyer JR.** *Ciencia de los Polímeros*, España: Reverté, 2011. 84-291-7048-0.
6. **Buddy D., Ratner, Allan S. Frederick J., Schoen.** *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*, Elsevier Academic Press: 2013. 9780123746269.
7. **Tharanathan, R.** *Biodegradable films and composite coatings: past, present and future*. Critical Review in FoodScience and Technology: 2003,14:71-78.
8. **Villada H. S., Acosta H. A., Velasco R. J.** *Polímeros Naturales Usados en Empaques Biodegradables*. Colombia: 2007.
9. **Porto S.** *Carragenina*. Agargel. Brasil: 2013
10. **Sichel E.** *Carbon Black polymer Composites: The Physisc of Electrically Conducting Composites*. New York. 2011. 653 p.
11. **Kalpakjian, Schmidt.** *Manufactura, Ingeniería y Tecnología*. Prentice Hall. 2008. 172-177 p. 970-26-0137-1.

12. **Kauffman, S. A.** *"The Ensemble Approach to Understand genetic Regulatory Networks"* Physica A, 2004.340, pp. 733-740
13. **Lehn, J. M.** *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives.* Ed. VCH. Weinheim.
14. **Bhatia and R. Kumar.** *Journal of Pharmaceutical Sciences.* Elsevier: 2004,7 252.
15. **Hofland, J. A. Bouwstra, F. Spies, G. Gooris, J. F.** *Journal of Pharmaceutical Sciences.* Elsevier, 83, 1192.
16. **Jadou A. and Preat V.,** *International Journal of Pharmaceutics*, 154, 229.
17. **Jain S., Mishra D., Kuksal A., Tiwary A. K., and Jain N. K.** *Vesicular approach for drug delivery into or across the skin: current status and future prospects;* 2011.
18. **Popovici A.** *Elastic Vesicles as Drugs Carriers Through the Skin.* Farmacia., 2010, 34(1) ,1.
19. **Porfire A. S., Parvu A. E., Daicoviciu D. and Leucuta S. E.** *Evaluation of Antiinflammatory Activity of Liposome Encapsulated Superoxide Dismutase in Rats Peritonitis.* Farmacia: 2009, 57(4), 412.
20. **Jain S., Sapre R., Tiwary A. K., Jain N. K.** *Proultraflexible lipid vesicles for effective transdermal delivery of levonorgestrel: Development, characterization, and performance evaluation:* 2004, Volume 6, pp E513-E522.

21. **Prajapati S. T., Patel C. G., and Patel C. N.** *Transfersomes: A Vesicular Carrier System For Transdermal Drug Delivery*. Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research. India: 2011, Vol. 1, 2231-2560
22. **Pasquali R. C., Bregni C. and Serrao R.** *Geometria de Micelas y otros Agregados de Sustancias Anfifilicas*. Argentina: 2013
23. **Torchilin V. P.** *Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives*. Springer Science, New York: 2007. Vol. 24, s11095-006-9132-0
24. **Pradhan M, Singh D.** *Novel colloidal carriers for psoriasis: Current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches*. Journal of Controlled Release 170 (2013) 380–395
25. **Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N.** *Nano-emulsions*. Curr Opin Colloid Interface Sci 2005;10:102-10.
26. **Kellsall, Robert, Hamley, Ian y Geoghegan, Mark.** *Nanoscale Science and Technology*. s.l. : Wiley & Sons, 2005. 13: 978-0-470-85086-2.
27. **Denkov N.D. and Tcholakova S.** *Surfactants – classification, features and applications*. Borovets, Bulgaria. 2010
28. **Calvo P, Remuñan-Lopez C., Vila-Jato J. L., Alonso M. J.** *Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions* . Sci. 275. 46–53.
29. **Rosas-Durazo A., Lizardi J., Higuera-Ciapara I., Argüelles-Monal W., Goycoolea F. M.** *Development and characterization of nanocapsules comprising*

dodecyltrimethylammonium chloride and κ-carrageenan. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 86 (2011) 242–246

30. **Mora-Huertasa C. E., Fessi H., Elaissari A.** *Polymer-based nanocapsules for drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics 385 (2010) 113–142.

31. **Letchford, K., Burt, H.,** *A Review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes*. Eur. J. Pharm. Biopharm: 2007 65,259–269.

32. **Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S.** *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. Int. J. Pharm. 55, R1–R4.

33. **Khoee, S., Yaghoobian, M.** *An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion*. Eur. J. Med. Chem., 2009. doi:10.1016/j.ejmech.2008.09.045

