



Universidad
Autónoma de Baja
California

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería Campus
Tijuana

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON FLAVONOIDES

Presentada por:

Melissa Zulahí Gallegos Granados

Director de Tesis:

Roció Alejandra Chávez-Santoscoy

Tesis para obtener el título profesional Químico Farmacobiólogo

Tijuana – México

2018

A mi madre, por darme las alas para volar
A mi padre, por darme el viento para no caer
Y a mi hermano, por el apoyo que me das para seguir volando.

1. AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Roció Alejandra Chávez-Santoscoy porque sin su visión y pasión, esta tesis no sería posible; Me faltaran páginas y palabras para expresarle toda mi gratitud por siempre estar ahí conmigo y guiarme en este camino, muchas gracias por haber confiado en mí para la realización de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Ángel Licea Claverie del Instituto Tecnológico de Tijuana, por su grata colaboración en este trabajo, por sus consejos llenos de conocimiento y por su paciencia hacia conmigo. De igual manera quisiera agradecer al alumno de doctorado del instituto Tecnológico de Tijuana, Oscar Ruiz por pasar las tardes enseñándome sobre nanopartículas, y a todos los integrantes del laboratorio de polímeros por su apoyo y sus valiosos consejos.

Al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey campus Monterrey por permitirme realizar la estancia de investigación en el Centro de Biotecnología con la Dra. Liliana Santos Zea de la cual, gracias a todos sus conocimientos y consejos, fue posible la realización de las nanopartículas, te estoy muy agradecida por el apoyo brindado durante este tiempo, a ti y a los demás integrantes del grupo de Nutriomics porque gracias a la convivencia con ellos, mi estancia fue muy agradable.

Al Dr. José Manuel Cornejo Bravo por permitirme utilizar las instalaciones del laboratorio de biofarmacia de la Universidad Autónoma de Baja California, para la caracterización de las nanopartículas y a los que laboran en dicho laboratorio, en especial a la alumna de maestría Noemí Arellano Villaseñor gracias por tu incondicional ayuda, amabilidad y paciencia en la elaboración de los análisis químicos.

A Laboratorios BajaMed S.A de C.V., por la beca que me patrocinaron, porque gracias a esto, fue posible realizar la estancia en Monterrey.

Agradezco mucho a mis amigos, que sé, siempre estuvieron ahí para mí, y me animaban a no rendirme, o incluso escuchaban mis historias sobre la tesis, en especial a mi amigo Eliseo Reyes Vásquez que me ayudo en todas las dudas que tenía con respecto al formato, redacción y presentación de una tesis, muchas gracias por tu tiempo y paciencia

Y por último, pero no menos importante, a mi familia les dedico este trabajo, porque gracias a su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años he llegado a ser lo que soy. Es un inmenso orgullo y privilegio ser su hija, son los mejores padres. Y a ti Charlie que con tus palabras me haces sentir orgullosa de lo que soy.

INDICE

1. AGRADECIMIENTOS	3
2. INCIDE DE FIGURAS Y TABLAS	7
2.1. Figuras	7
2.2. Tablas	7
2.3. Gráficas	8
3. ABREVIATURAS	9

PRIMERA PARTE: FUNDAMENTO TEÓRICO

4. INTRODUCCIÓN.....	12
5. ANTECEDENTES.....	14
5.1. Nanogel	14
5.2. Quitosano	14
5.3. Ácido Hialurónico	15
5.4. Flavonoides	15
5.5. Nanopartículas a base de Ácido Hialurónico	16
5.6. Nanopartículas de base de Quitosano	16
5.7. Liberación controlada de fármacos a través de nanopartículas	17
5.8. Nanoestructuras en alimentos	17
5.9. Secado por asperción	18
6. JUSTIFICACIÓN	19
7. HIPÓTESIS.....	20
8. OBJETIVO GENERAL.....	20
9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
10. ESTRUCTURA DE LA INVESTIGACIÓN	20

SEGUNDA PARTE: DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

11. METODOLOGÍA.	23
11.1. MATERIALES.	23
11.1.1. Reactivos.	23
11.1.2. Equipos.	23
11.2. MÉTODOS.	23

11.2.1. Preparación de nanopartículas.	23
11.2.2. Síntesis de nanopartículas de CS 1.....	24
11.2.3. Síntesis de nanopartículas de CS 2.....	25
11.2.4. Cargado de nanopartículas de CS 2 con quercetina 1.1.....	25
11.2.5. Cargado de nanopartículas de CS 2 con quercetina 1.2.....	26
11.2.6. Cargado de Nanopartículas de CS con quercetina por secado por aspersion.	28
11.2.6.1. Tratamiento B:.....	28
11.2.6.2. Tratamiento C:.....	28
11.2.6.3. Tratamiento D:	29
11.2.6.4. Tratamiento E:.....	29

TERCERA PARTE: RESULTADOS

12.RESULTADOS.....	33
12.1. Resultados obtenidos por medio de AFM.	46
12.1.1. Resultados de NP's de AH.	46
12.2. Eficiencia de cargado de quercetina	47
12.2.1. Eficiencia de cargado a NP's de CS.....	48
12.2.2. Eficiencia de cargado en NP's de AH.....	49

CUARTA PARTE: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

13.DISCUSIÓN.	52
14.CONCLUSIONES.....	54
15.REFERENCIAS.....	56

2. INCIDE DE FIGURAS , TABLAS Y GRÁFICAS

2.1.Figuras

Figura 1. <i>Nanogel de quitosano entrecruzado covalentemente</i>	Pág. 12
Figura 2. Mecanismos de liberación de fármacos a partir de nanogeles.....	Pág. 13
Figura 3. Estructura química del quitosano.....	Pág. 14
Figura 4. <i>Estructura química del ácido hialurónico</i>	Pág. 15
Figura 5. <i>Estructura química de la quercetina</i>	Pág. 16
Figura 6. <i>Estructura esquemática de una nanopartícula cargada</i>	Pág. 18
Figura 7. <i>Sonicador Bran Sonic 2510R-MTH</i>	Pág. 24
Figura 8. Zetasizer DTS 1060 Malvem instruments.....	Pág. 24
Figura 9. Equipo <i>Razel syringe pump</i> colocando el entrecruzante TPP en la solución 1.....	Pág. 27
Figura 10. <i>Solución a temperatura ambiente antes de agregar quercetina</i>	Pág. 28
Figura 11. Tratamiento colocado en el equipo de secado por aspersion.....	Pág. 29
Figura 12. Tratamiento E antes de secar en el equipo YamatoDL311S.....	Pág. 29
Figura 13. Polvo obtenido por secado por aspersion sometido a reconstrucción.....	Pág. 30
Figura 14. Fotografías AFM NP's de AH tratamiento D	Pág. 46
Figura 15. Espectrofotómetro Beckman Coulter DU 520.....	Pág. 47

2.2.Tablas

Tabla 1. Caracterización por DLS de Nanopartículas de CS sin cargar	Pág. 33
Tabla 2 Caracterización por DLS de Nanopartículas de quitosano sin cargar.....	Pág. 37
Tabla 3. Caracterización por DLS de nanopartículas de CS cargadas con quercetina.....	Pág. 40
Tabla 4. Caracterización por DLS de Nanopartículas de ácido hialurónico cargadas.....	Pág. 43
Tabla 5. Concentraciones de quercetina.....	Pág. 48

2.3. Gráficas

Gráfica 1. Caracterización por DLS de QM1.....	Pág. 33
Gráfica 2. Caracterización por DLS de QM2.....	Pág. 34
Gráfica 3. Caracterización por DLS de QMB 3.....	Pág. 34
Gráfica 4. Caracterización por DLS de QMB 4.....	Pág. 35
Gráfica 5. Caracterización por DLS de QMB 5.....	Pág. 35
Gráfica 6. Caracterización por DLS de QMB 6.....	Pág. 36
Gráfica 7. Nanopartículas de quitosano a pH 2.5.....	Pág. 37
Gráfica 8. Nanopartículas de quitosano a pH 2.7.....	Pág. 38
Gráfica 9. Nanopartículas de quitosano a pH 4.....	Pág. 38
Gráfica 10. Nanopartículas de quitosano a pH 5.....	Pág. 39
Gráfica 11. Nanopartículas de quitosano a pH 5*.....	Pág. 39
Gráfica 12. Nanopartículas de CS cargada con quercetina (Diluida 1:10 agua Mili Q)	Pág. 40
Gráfica 13. Nanopartículas de quitosano cargadas con quercetina (Sin diluir)	Pág. 41
Gráfica 14. Nanopartículas de quitosano cargadas con quercetina (diluido 1:10 sonicado 20 min)	Pág. 41
Gráfica 15. Nanopartículas de quitosano cargadas de quercetina.....	Pág. 43
Gráfica 16. Nanopartículas de AH cargadas con quercetina tratamiento B.....	Pág. 43
Gráfica 17. Nanopartículas de AH cargadas con quercetina tratamiento C.....	Pág. 44
Gráfica 18. Nanopartículas de AH cargadas con quercetina tratamiento D.....	Pág. 44
Gráfica 19. Nanopartículas de AH cargadas con quercetina tratamiento E.....	Pág. 45
Gráfica 20. Curva de calibración de quercetina	Pág. 47

3. ABREVIATURAS

AH	Ácido Hialurónico
AFM	Microscopio de fuerza atómica
DLS	Dispersor de luz dinámica
Nm	Nanómetros
D.	Diámetro
cc	Centímetros cúbicos
TPP	Tripolifosfato de sodio
mL; mg; gr	Milímetros, miligramos, gramos,
Min, Hrs.	Minutos, horas
Da	Dalton
N, M	Normal, Molar
CS	Quitosano
Rpm	Revoluciones por minuto
PDI	Índice de polidispersidad
mPa	Mili pascales

PRIMERA PARTE:

FUNDAMENTO TEÓRICO

4. INTRODUCCIÓN.

La nanotecnología hoy en día nos permite la creación de materiales, dispositivos y sistemas, útiles y funcionales, mediante el control de la materia a una escala nanométrica, que nos lleva al aprovechamiento de nuevos fenómenos y propiedades físicas, químicas y biológicas a esta escala de longitudes ¹. Una de las creaciones que más ha traído interés a la comunidad tanto farmacéutica como biomédica es el diseño de nanogeles a base de polímeros, debido a su estructura física, tridimensional, propiedades mecánicas, alto contenido de agua y biocompatibilidad². Estas atractivas propiedades ofrecen un potencial significativo para la utilización de nanogeles en ingeniería de tejidos, administración de fármacos y bio-nanotecnología.³

Los nanogeles cuentan con una porosidad debido a la estructura en red de sus cadenas poliméricas, lo que permite la difusión molecular. Esta propiedad ha llegado a utilizarse como un vehículo útil para la administración sostenida de compuestos activos. Las moléculas pequeñas (Ej., péptidos, proteínas) pueden difundirse dentro y fuera de la matriz, mientras que las moléculas más grandes (Ej. ADN plasmídico) a menudo quedan atrapadas dentro de los poros y se mantienen dentro de la red para liberarse como resultado de la degradación de la matriz⁴. Como ejemplo podemos observar una nano estructura polimérica a base de quitosano en la Figura 1.

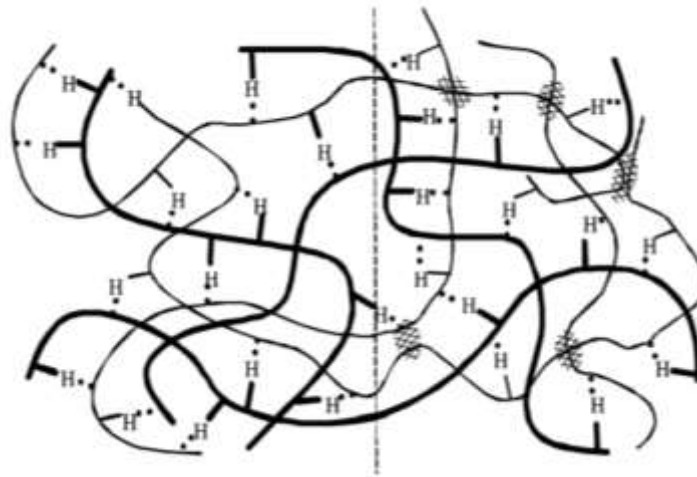


Figura1. Nanogel de quitosano entrecruzado covalentemente⁵

En la actualidad, se busca que los polímeros utilizados como vehículo de los compuestos activos sean de carácter natural ya que cuentan con características de biodegradación y biocompatibilidad mucho mayor en comparación con los materiales sintéticos. Estas nanoestructuras llegan a presentar numerosas formas de liberación controlada observadas en la Figura 2.

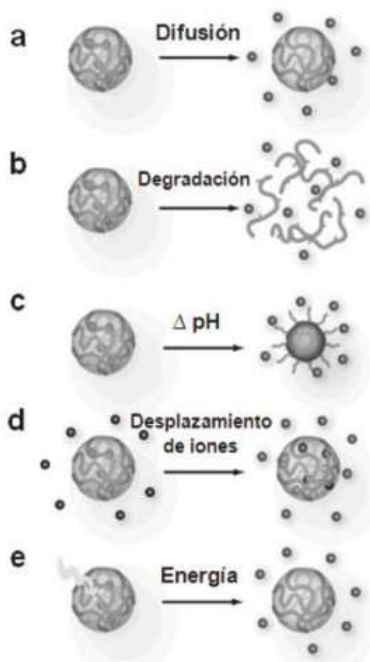


Figura2. Mecanismos de liberación de fármacos a partir de nanogeles. (a) Difusión del fármaco. (b) Degradación de las cadenas de polímeros o rompimiento de enlaces entrecruzados. (c) Cambio en el pH del medio. (d) Desplazamiento del fármaco provocado por iones. (e) Liberación del fármaco inducida por una energía externa aplicada⁶.

Entre todos los nanogeles que responden a diferentes estímulos ambientales (pH, fuerza iónica, fuente de luz y temperatura), los termosensibles han mostrado gran versatilidad debido al preciso control sobre la respuesta del sistema a los cambios térmicos⁷.

Entre los biopolímeros con mayor proyección para ser utilizados se encuentran el alginato y el quitosano, este último será utilizado para los siguientes experimentos debido que representa el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, y que puede ser obtenido a partir de diferentes fuentes, como lo son los crustáceos, camarones, cangrejos y algunas familias de hongos⁸, también ha sido seleccionado debido a su alta biodisponibilidad reportada.

5. ANTECEDENTES

5.1. Nanogel

Un gel es una red polimérica tridimensional reticulada capaz de absorber una gran cantidad de disolvente sin disolverse debido a los enlaces físicos o químicos formados entre sus cadenas⁶. Estas redes presentan una serie de propiedades intrínsecas ideales para aplicaciones biomédicas, como un alto contenido acuoso, flexibilidad, compatibilidad celular y excelente dispersidad/solubilidad en agua además de que se hinchan en presencia de ella⁹, aumentando apreciablemente su volumen mientras mantienen la forma hasta alcanzar el equilibrio fisicoquímico.

Los nanogeles son materiales muy apropiados para aplicaciones en medicina dada su buena interacción con los tejidos vivos, dado que por un lado muestran buenas propiedades de biocompatibilidad, debido principalmente a su consistencia blanda, elástica y contenido de agua^{10,11}. Por otro lado, son materiales inertes por lo que las células y proteínas no tienden a pegarse a su superficie. La termosensibilidad del nanogel es lograda gracias a la utilización de polímeros que presentan cambios en su estructura cuando el ambiente en donde se encuentra cambia de temperatura. Estos polímeros presentan una temperatura de transición de fase a partir de la cual su solubilidad en agua cambia drásticamente¹².

5.2. Quitosano

El Quitosano es la forma N-desacetilada de la quitina y posee mejores propiedades de reactividad y solubilidad¹³ (Figura 3). Se obtiene al sustituir los grupos acetamida de esta por grupos amino, al tratar la quitina con álcalis fuertes. Además dicho compuesto presenta ciertas características físicas y químicas que le dan las propiedades de ser un polímero no tóxico, biocompatible, biodegradable, insoluble en agua y disolventes orgánicos o en soluciones alcalina, Esto ,debido a que en su estructura posee aminos libres, que le confiere la característica de ser soluble en soluciones ácidas¹⁴.

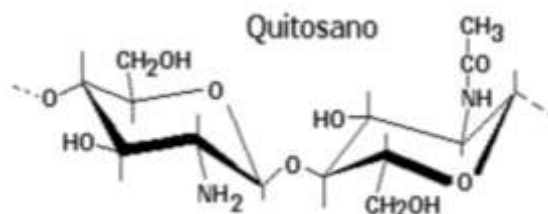


Figura 3. Estructura química del Quitosano¹³

El quitosano llega a tener propiedades biológicas el cual ha dado lugar a posibles aplicaciones, características como:

- a) Biocompatible: Es decir, tiene la propiedad que permite sustituir o regenerar los tejidos vivos y sus funciones.
- b) Acelerador de la formación de osteoblastos responsables de la formación ósea.
- c) Hemostático, fungistático, espermaticida y anticolesterémico.
- d) Depresor del sistema nervioso central, entre otras.

Estas propiedades y sus efectos, dan lugar a posibles aplicaciones tanto médicas como farmacológicas¹⁵.

5.3. Ácido Hialurónico

Se trata de un polímero para el cual existen una gran variedad de receptores, siendo los predominantes las proteínas de membrana CD44 y CD168 (RHAMM), los cuales se encuentran localizados a nivel de la superficie celular en prácticamente todas las células del organismo, a excepción de los glóbulos rojos. Al ser estas proteínas sobre expresadas en muchos tipos de células cancerígenas se sabe que la unión de ácido hialurónico con esta proteína es esencial para conseguir la diferenciación de las células cancerígenas, así como su proliferación y migración¹⁶.

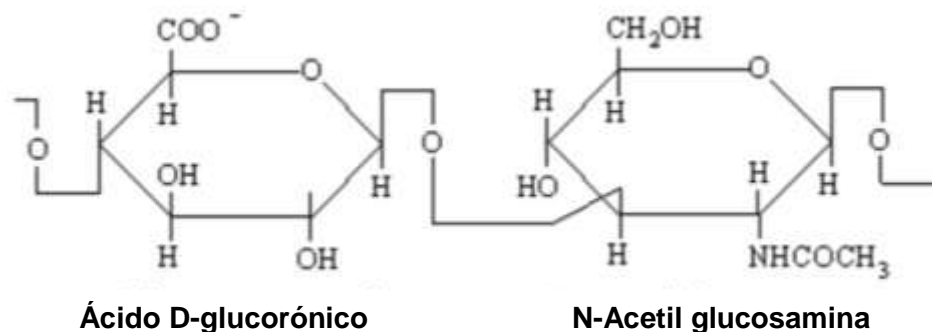


Figura 4. Estructura química del ácido Hialurónico¹⁷

5.4. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos UV, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.¹⁸ Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la

protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer.¹⁸

La quercetina, por ejemplo es un flavonoide que ha demostrado tener propiedades anticancerígenas, anti mutagénicas, apoptóticas, anti-ateroescleróticas, antidiabéticas, anti-inflamatorias, anti-bacterianas y antivirales, entre otras¹⁹.

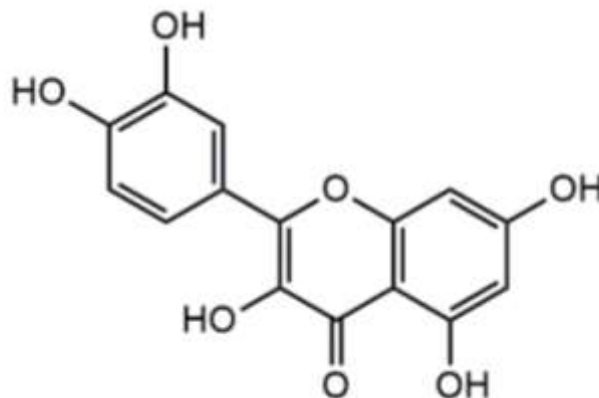


Figura 5. Estructura química de quercetina ²⁰

5.5. Nanopartículas a base de Ácido Hialurónico

Estudios recientes han mostrado que las cadenas de HA poseen la capacidad de crear puentes de hidrógeno internos en medio acuoso, dando lugar a dos fenómenos: la creación de zonas hidrófobas en la cadena que permiten la interacción entre ellas, con determinadas proteínas e incluso con la membrana celular y otras estructuras lipídicas, y la estabilización de la cadenas de HA en estructuras rígidas en forma de hélice lineal; lo cual aumenta su viscosidad en solución y permite cierta especificidad a la hora de interactuar con receptores y enzimas²¹.

5.6. Nanopartículas de base de Quitosano

Debido a sus numerosas propiedades biomédicas atractivas, tales como seguridad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioadhesividad y efectos anticancerígenos, hemostáticos y bacteriostáticos, el quitosano ha sido ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y en la área biomédica ¹⁹. En el campo de entrega de medicamentos, los sistemas conjugados de polímeros-fármacos basados en quitosano pueden utilizarse como transdérmicos, nasal, ocular, oral, administración parenteral, entre otras tantas aplicaciones²². Además, se ha informado que el quitosano actúa como un potenciador de la penetración al abrir uniones estrechas epiteliales⁵. Es comprensible que las nanopartículas tengan ventajas particulares porque no solo protegen al fármaco

asociado, sino que también facilitan que los medicamentos atraviesen elementos biológicos críticos, barreras específicas y objetivos específicos. Varios métodos han sido desarrollados para fabricar sistemas de nanopartículas de quitosano, un ejemplo de ellos son los geles físicos cuyas redes presentan un entrelazamiento molecular que las mantiene unidas y/o fuerzas secundarias que incluyen enlaces cruzados iónicos, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Por el contrario, también se encuentran los geles químicos que consisten en redes reticuladas covalentemente³.

5.7.Liberación controlada de fármacos a través de nanopartículas

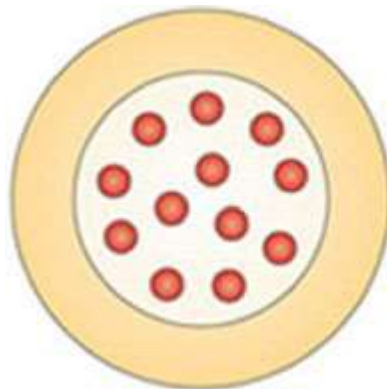
En el tratamiento de enfermedades oncológicas, algunos fármacos no distinguen entre las células malignas y las normales y en estos casos el fármaco puede ocasionar serios daños o incluso hasta la muerte. Los sistemas conjugados polímero-fármaco pueden diseñarse para conseguir una vectorización del efecto hacia el órgano o células enfermas. Normalmente, la vectorización se logra uniendo al conjugado soluble, receptores específicos como anticuerpos, hormonas o carbohidratos, que idealmente serán reconocidos específicamente por receptores de la superficie de las células de la zona dañada.

La liberación del fármaco desde una matriz polimérica puede deberse a tres tipos de mecanismos: liberación desde la superficie de las partículas, difusión a través de la matriz hinchada y liberación debido a la erosión del polímero como se observa en la figura 2²³

5.8.Nanoestructuras en alimentos

La encapsulación de componentes activos nos es presentada hoy día como una tecnología en expansión con un alto potencial de aplicaciones tanto como el en área farmacéutica como en el área de la industria alimenticia. La encapsulación y la liberación controlada de ingredientes alimenticios activos son aplicaciones importantes en la alimentación y la nutrición que se pueden lograr con enfoques nanotecnológicos²⁴. Con este enfoque se pretende generar una innovación en las características organolépticas de los alimentos, como textura, sabor, atributos sensoriales, fuerza de coloración, procesabilidad y estabilidad durante la vida útil, lo que lleva a una amplia gama de posibilidades para la creación de productos nuevos²⁵.

La efectividad de los productos nutracéuticos en la prevención de enfermedades depende de la preservación de la biodisponibilidad de los ingredientes activos²⁶. Esto representa un desafío formidable, dado que solo queda una pequeña proporción de moléculas disponibles después de la administración oral, debido a un tiempo de residencia gástrico insuficiente, baja permeabilidad y / o solubilidad dentro del intestino, así como inestabilidad en condiciones encontradas en el procesamiento de alimentos (temperatura, oxígeno, luz) o en el tracto gastrointestinal (pH, enzimas, presencia de otros nutrientes), todo lo cual limita la actividad y los posibles beneficios para la salud de las moléculas con función nutracéutica ²⁷.



A) *Nanopartícula*



Compuesto Bioactivo.



Polímero u otro material de pared.

Figura 6. Estructura esquemática de una nanopartícula cargada²⁵.

5.9. Secado por aspersión

El secado por aspersión se aplica ampliamente en la industria farmacéutica para producir medicamentos, excipientes en bruto o hacer el proceso de microencapsulación. Esta técnica transforma las soluciones líquidas en polvo seco en un solo paso y es factible para la ampliación de la microencapsulación en una operación de procesamiento continuo de partículas que se puede usar en una amplia variedad de materiales²⁸.

En la última década, los polímeros biodegradables como el quitosano y sus derivados cuaternarios se han estudiado ampliamente por su papel como potenciadores de la permeación multifuncionales para mejorar la penetración de macromoléculas hidrofílicas en la administración por vía oral de fármacos.

Las microesferas de quitosano son los sistemas de administración de fármacos más ampliamente estudiados para la liberación controlada de fármacos. Antibióticos, antihipertensivos, anticancerígenos, antiinflamatorios, proteínas, péptidos y vacunas. Las microesferas de quitosano se pueden sintetizar mediante diferentes técnicas, tales como la evaporación del disolvente, el secado por aspersión, la coacervación, la emulsificación / gelificación interna y la reticulación por suspensión.

Desai y Park^{29,30} han demostrado que el tripolifosfato (TPP) puede actuar como un nuevo agente estabilizante para la preparación de nanopartículas de quitosano mediante secado por aspersión y se ha utilizado con éxito para preparar partículas cargadas con paracetamol. Las interacciones iónicas entre las cargas negativas del agente entrecruzante (TPP) y los grupos positivamente cargados en el quitosano son las principales interacciones en la cadena polimérica.

6. JUSTIFICACIÓN

En 2016, las muertes causadas por enfermedades llegaron a un total de cerca de 100,000 muertes en México (INSP 2016). De este total, fueron casi cerca del 19.9% las muertes causadas por enfermedades cardiovasculares que se considera como la principal causa de muerte en el país, seguida por la Diabetes Mellitus con un 15.4% y en tercer lugar los tumores malignos con un porcentaje de 12.9% (INEGI).

Se sabe que las enfermedades cardiacas, la diabetes mellitus y el cáncer están íntimamente relacionados con la condición llamada síndrome metabólico, que es ocasionado por la prevalencia de obesidad. El 90% de los casos de diabetes mellitus se relaciona con sobrepeso y obesidad (INEGI). Por lo que se sabe, dichas enfermedades crónicas mantienen una estrecha relación con el desbalance metabólico originado por malos hábitos de vida como ingesta de comidas poco saludables, inactividad física, exceso de alcohol y consumo de tabaco.

Debido a este aumento de muertes en México a causa de las enfermedades crónicas como las enfermedades cardiacas, la diabetes mellitus y el cáncer; es de suma importancia buscar nuevas y más eficaces alternativas terapéuticas, que cumplan con requerimientos de seguridad, y accesibilidad para la población mexicana.

Basándonos en el reciente estudio hecho por la Dra. Roció A. Chávez Santoscoy , se ha propuesto a la quercetina como potencial molécula activa para el tratamiento de estas enfermedades crónicas³¹. La quercetina ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades analgésicas, anti-agregantes, vasodilatadoras, antiartríticas, antibacterianas, antigripales, antiinflamatorias, antiespasmódicas, anti-ulcerosas, hepato-protectoras, anti-diabéticas, anti-asmáticas y la principal, antioxidante que nos permiten una amplia gama de opciones para su aplicación farmacéutica en el tratamiento de las enfermedades crónicas antes mencionadas.

No obstante, dado las pequeñas concentraciones en las que podemos encontrarla en los alimentos como cebolla roja, mora, frijol negro, manzana, y sus propiedades hidrófilas que la hacen poco estable, se ha reportado una baja biodisponibilidad y, por ende, la absorción de quercetina en el intestino es muy baja. Por esta razón la Food and Drug Administration (FDA) ha publicado una nota donde estipula que la Quercetina no tiene ningún valor nutricional.

Proponemos que, si se llegara a desarrollar un vehículo de entrega controlado que permita, elevar los niveles de quercetina en el intestino delgado, para aumentar su absorción, se lograría mejorar la farmacodinamia y farmacocinética de dicha molécula y por ende sería posible evidenciar los efectos terapéuticos que la molécula puede ejercer en un tiempo mucho menor. Además, si dicho vehículo de entrega fuera lo suficientemente biocompatible y barato para que fuera incluido como un ingrediente funcional en la elaboración de alimentos, se lograría impactar de manera positiva un

mayor porcentaje de la población mexicana, que han sido especialmente afectadas por las enfermedades crónicas mencionadas anteriormente.

7. HIPÓTESIS

Es posible cargar quercetina en nanopartículas de quitosano o ácido hialurónico para lograr una mayor estabilidad de la molécula activa y aumentar la concentración de quercetina en un ingrediente funcional que es capaz de mejorar la permeabilidad de esta.

8. OBJETIVO GENERAL

Evaluar y comparar la síntesis y el porcentaje de cargado de nanopartículas de quitosano o ácido hialurónico cargadas con quercetina, sintetizadas con diferentes métodos.

9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas a base de quitosano con tripolifosfato de sodio, cargadas con quercetina a diferente pH.
- Sintetizar nanopartículas a base de ácido hialurónico, cargadas con quercetina a diferentes pH.
- Caracterizar las nanopartículas sintetizadas por su dispersión de tamaño y porcentaje de cargado de quercetina para su comparación.
- Caracterizar el tamaño de las nanopartículas de quitosano cargadas con quercetina por medio de microscopio de fuerza atómica.
- Evaluar el cargado de quercetina en cada una de las nanopartículas

10. ESTRUCTURA DE LA INVESTIGACIÓN

El siguiente trabajo se encuentra organizado en 4 partes. Una primera parte referida al fundamento teórico de la investigación. La segunda parte donde se contextualizan los procedimientos para el desarrollo de nuestras nanopartículas. La tercera parte donde se plantean los resultados obtenidos. Y por último una cuarta parte donde se hacen discusiones y conclusiones en base a los resultados obtenidos mencionados previamente.

SEGUNDA PARTE:

DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

11. METODOLOGÍA.

11.1. MATERIALES.

11.1.1. Reactivos.

Quitosano peso molecular bajo de *Sigma Aldrich* (50,000-190,000 Da), quitosano peso molecular medio (Aproximadamente 480,000 Da), quercetina *Sigma Aldrich*, tripolifosfato de sodio *Sigma Aldrich*, ácido hialurónico de la empresa *GNC*, ácido acético glacial *Sigma Aldrich*, ácido Clorhídrico 0.1% N, hidróxido de sodio 0.1% N.

11.1.2. Equipos.

Se utilizó la *Liofilizadora Labconco Free zone* con el fin de deshidratar las muestras para su posterior conservación. El secado de los tratamientos A, B, C, D, E se realizaron en el *Secador por aspersion Yamato ADL311S*. Todas las soluciones fueron colocadas en el *Sonicador Bran Sonic 2510R-MTH* con el fin de dispersar uniformemente las nanopartículas contenidas en la solución. Potenciómetro HANNA Modelo 2210. El equipo *Razel syringe pump* modelo R-99 utilizado para agregar las soluciones gota a gota, utilizando un flujo de 50 cc/hrs. El tamaño se obtuvo por medio de un dispersor de luz dinámico (DLS) utilizando el Zetasizer (DTS 1060; Malvem instruments) y un Microscopio de fuerza atómica (AFM) marca Agilent modelo SPM5100 con escáner de alta resolución N9520A. Espectrofotómetro Beckman Coulter DU 520

11.2. MÉTODOS.

11.2.1. Preparación de nanopartículas.

Las primeras nanopartículas fueron inducidas por medio de gelificación del quitosano con una solución de TPP, basándonos en la metodología propuesta por el Dr. Barbieri, con algunas modificaciones, que se explicaran en la siguiente sección, a las cuales llamaremos *nanopartículas de CS 1*; a su vez se sintetizaron otras nanopartículas con esta misma metodología sin embargo estas fueron secadas por aspersion.

Cabe destacar que con esta metodología, no obtuvimos los tamaños deseados por lo que se utilizó otra metodología para la síntesis de unas segundas nanopartículas basándonos en la propuesta del Dr. P. Calvo y asociados 1997³², a las cuales llamaremos en este documento como *nanopartículas de CS 2*.

Con el fin de tener un comparativo en el tamaño de ambas nanopartículas sintetizadas se realizaron pruebas con el dispersor de luz dinámica, y microscopio de fuerza atómica como se verá a continuación.

11.2.2. Síntesis de nanopartículas de CS 1

Se realizó una solución a base de 30 ml de ácido acético y se procedió a aforar en un matraz de 1000 ml, esta solución será posteriormente conocida como solución madre.

De la solución madre previamente hecha, se miden 25 mL con ayuda de una probeta, para después ser colocada en un matraz Erlenmeyer y posteriormente agregar lentamente 50 mg de CS de peso molecular medio (Aproximadamente 480,000 Da), hecho esto se procedió a agregar 75 mL de la solución madre para llevar nuestra solución en el matraz a un volumen final de 100 mL.



Figura 7. *Sonicador Bran Sonic 2510R-MTH*



Figura 8. *Zetasizer (DTS 1060 Malvern instruments)*

Se mantuvo en agitación magnética por 20 min aproximadamente o hasta que se disolviera por completo el CS en la solución que llamamos solución 1. Acabado este paso, se midió el pH de la solución y fue llevado a pH 2 con ácido clorhídrico 1 N.

Se utilizó una probeta para separar en un vaso de precipitado 40 mL de nuestra solución 1 y colocar 80 mg del entrecruzante TPP, una vez hecho esto obtuvimos una 2da solución a la que llamaremos solución 2.

La solución 1 fue llevada a agitación magnética y se le coloco gota a gota la solución 2 con ayuda de un gotero, todo esto a temperatura ambiente. Terminado la incorporación de las soluciones, esto se dejó en agitación magnética por 30 min.

El procedimiento se repitió bajo diferentes condiciones de pH, también se evaluaron soluciones con CS de peso molecular bajo. Todos los tratamientos desarrollados con este procedimiento se describen a continuación:

CS peso molecular Medio.

- Solución de pH 2.6
- Solución de pH 2.0

CS peso molecular Bajo

- Solución de pH 1.9
- Solución de pH 2.5
- Solución de pH 1.5
- Solución de pH 2.0

***Se realizó una solución de pH 7 con CS de peso molecular bajo con el fin de evaluar la variación de los tamaños a pH neutro, sin embargo, se descartó el leer la solución debido a que presentaba un alto grado de precipitación de los excipientes utilizados.*

Con ayuda del equipo de *DLS* se determinó el tamaño de partículas de los tratamientos.

11.2.3. Síntesis de nanopartículas de CS 2

Se preparó una solución madre en campana con 1.45mL de ácido acético glacial aforando siempre con agua Mili Q en un matraz volumétrico de 100 mL.

Posteriormente la solución se dividió en dos vasos de precipitado, un vaso contenía una cantidad de 94 mL de la solución madre a la cual se le agregaron 50 mg de CS previamente pesado, mientras que el segundo vaso incluía los 6 mL restantes de la solución madre más 10 mg del entrecruzante TPP. Ambos vasos fueron dejados en agitación magnética por 20 min hasta su completa disolución.

Posteriormente, se hizo uso de los 6 mL de la solución de TPP que fue agregado gota a gota con ayuda de un gotero a la solución de CS. Se dejó en agitador magnético 20 min hasta su completa disolución.

Una vez terminado el proceso se llevó al pH deseado utilizando una solución de NaOH 0.1M o HCl 0.1M en base al pH propuesto.

Se procede a dejar la solución final agitando por 20 min.

11.2.4. Cargado de nanopartículas de CS 2 con quercetina 1.1

Se preparó una solución madre en campana con 1.45mL de ácido acético glacial aforando con agua Mili Q en un matraz volumétrico de 100 mL.

Posteriormente la solución se dividió en dos vasos de precipitado, un vaso contenía una cantidad de 94 mL de la solución madre a la cual se le agregaron 50 mg de CS previamente pesado, mientras que el segundo vaso incluía los 6 mL restantes de la

solución madre más 10 mg del entrecruzante TPP. Ambos vasos fueron dejados en agitación magnética por 20 min hasta su completa disolución.

En un tercer vaso se preparó una solución con 9mL de etanol y 1 mL de agua Mili Q, a esta solución fueron añadidos 10 mg de quercetina previamente pesada, se dejó en agitación magnética hasta su completa disolución.

Con una jeringa se tomaron 5 mL de la solución de quercetina previamente hecha y fue colocada en la bomba de inyección para jeringa (*Razel syringe pump*), con esto se espera que la solución de quercetina sea añadida a la solución de CS de forma lenta por el método de goteo. La solución de quitosano se mantiene en un homogeneizador a 11,000 rpm mientras el equipo Razel syringe pump se asegura de agregar gota a gota la solución de quercetina. Una vez terminado el proceso de goteo, se mantiene la solución de CS/quercetina en el homogeneizador por 20 min.

A continuación, la solución de CS/quercetina pasó a ser sonicada por 10 min a una temperatura aproximada de 25^o-35^o C.

Una vez terminado el proceso de sonicado, se llevó al pH deseado utilizando una solución de NaOH 0.1M, haciendo este procedimiento, observamos que cuando la solución se encontraba a un pH mayor de 4, la solución empezaba a mostrar un color oscuro, a diferencia del color amarillo fluorescente visto con anterioridad al momento de colocar la quercetina.

Posteriormente, se hizo uso de los 6 mL de la solución de TPP y al igual que la solución de quercetina, la solución de TPP fue colocada en el equipo *Razel syringe pump* para ser agregado gota a gota a la solución de CS/quercetina. Una vez terminado el proceso se aprecia que el color original (Amarillo fluorescente) vuelve otra vez a la solución de CS/quercetina/TPP.

Se procede a dejar la solución final sonicando por 10 min a las mismas condiciones previamente planteadas.

11.2.5. Cargado de nanopartículas de CS 2 con quercetina 1.2

Se realizó otro tratamiento para la disolución de la quercetina utilizando la misma metodología presentada a continuación, los resultados se pueden observar en la Tabla 3:

Se preparó una solución madre en campana con 1.45mL de ácido acético glacial aforando con agua Mili Q en un matraz volumétrico de 100 mL.

Posteriormente la solución se dividió en dos vasos de precipitado, un vaso contenía una cantidad de 94 mL de la solución madre a la cual se le agregaron 50 mg de CS previamente pesado, mientras que el segundo vaso incluía los 6 mL restantes de la solución madre más 10 mg del entrecruzante TPP. Ambos vasos fueron dejados en agitación magnética por 20 min hasta su completa disolución.

En un tercer vaso se preparó una solución con 10 mg de quercetina con 10 ml de agua Mili Q. Al ver que la solución se apreciaba de un color turbio y que no se disolvía adecuadamente se optó por hacer otra solución agregando 10 mL de etanol. Se procedió a sónica por 10min a 25°-35° C.

Con una jeringa se tomaron 5 mL de la solución de quercetina previamente hecha y fue colocada en el equipo (*Razel syringe pump*) con esto se espera que la solución de quercetina sea añadida a la solución de CS de forma lenta con el método de goteo. La solución de quitosano se mantuvo en un homogeneizador a 11,000 rpm mientras el equipo *Razel syringe pump* agregaba gota a gota la solución de quercetina. Una vez terminado el proceso de goteo, se mantiene la solución de CS/quercetina en el homogeneizador por 20 min.

A continuación, la solución de CS/quercetina pasó a ser sonicada por 10 min a una temperatura aproximada de 25°-35° C.

Una vez terminado el proceso de sonicado, se llevó al pH deseado utilizando una solución de NaOH 0.1M, cuando la solución se encontraba a un pH mayor de 4, la solución empezaba a mostrar un color oscuro, a diferencia del color amarillo fluorescente visto con anterioridad al momento de colocar la quercetina.

Posteriormente, se hizo uso de los 6 mL de la solución de TPP y al igual que la solución de quercetina, la solución de TPP fue colocada en el equipo *Razel syringe pump* para ser agregado gota a gota a la solución de CS/quercetina. Una vez terminado el proceso se aprecia que el color original (Amarillo fluorescente) vuelve otra vez a la solución de CS/quercetina/TPP.

Se procede a dejar la solución final sonicando por 10 min a las mismas condiciones previamente planteadas.

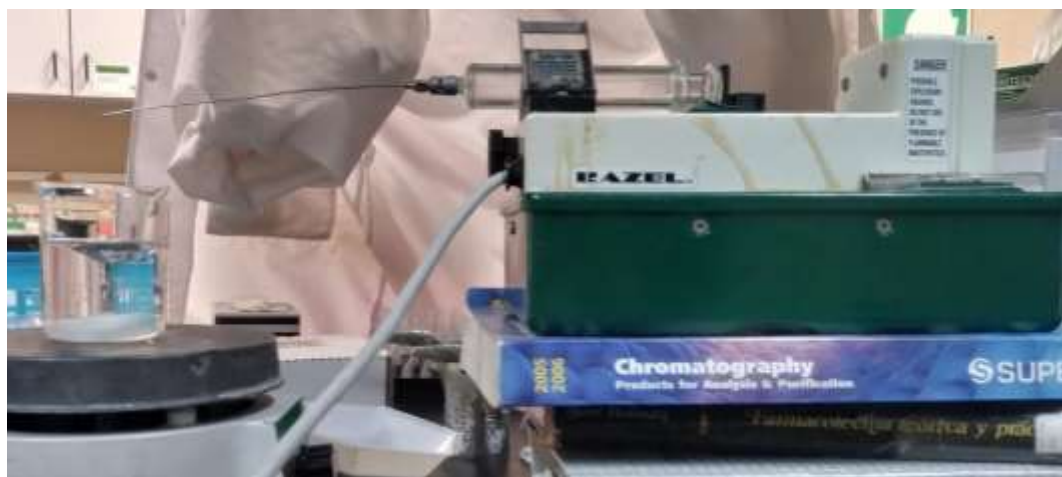


Figura 9. Equipo *Razel syringe pump* colocando el entrecruzante TPP en la solución 1.

11.2.6. Cargado de Nanopartículas de CS con quercetina por secado por aspersión.

11.2.6.1. Tratamiento B:

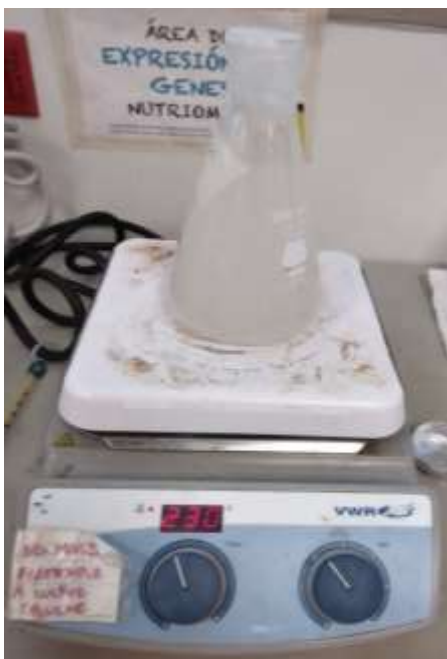


Figura 10. Solución a temperatura ambiente antes de agregar quercetina.

A un matraz Erlenmeyer de 500 mL se agregaron 500 mL de agua tipo Mili Q. Se colocó en un agitador magnético a temperatura ambiente y se añadió 2gr de ácido hialurónico (HA), una vez disueltos el excipiente se procedió a tapar el matraz con papel aluminio, esto con el fin de que al agregar los 25 mg de quercetina esta no se degradara con la luz del laboratorio, se dejó en agitación por 15 min. Una vez pasado el tiempo se procedió a sónico en el equipo Bran Sonic (Figura 7) por 15 min, a temperatura ambiente.

La solución fue llevada al secador por aspersión ADL311S previamente purgado con agua destilada para obtener un micro encapsulado de la solución. Se trabajó el equipo con una temperatura de salida de $60^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ y una temperatura de entrada de 180°C , con una presión de 0.13-0.15 mP.a. Se secó por aproximadamente 3 horas y se obtuvo un total de polvo de 1.5131 gr.

11.2.6.2. Tratamiento C:

A un matraz Erlenmeyer de 500 mL se agregó 500 mL de agua tipo Mili Q. Se colocó en un agitador magnético a temperatura ambiente y se agregó 1gr de ácido hialurónico (HA), una vez disuelto se procedió a tapar el matraz con papel aluminio, esto con el fin de que al agregar los 50 mg de quercetina esta no se degradara con la luz del laboratorio, se dejó en agitación por 15 min. Una vez pasado el tiempo se procedió a sónico la solución por 15 min, a temperatura ambiente.

La solución fue llevada al secador por aspersión ADL311S previamente purgado con agua destilada para obtener un micro encapsulado de la solución. Se trabajó el equipo con una temperatura de salida de $60^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ y una temperatura de entrada de 180°C , con una presión de 0.13-0.15 mP.a. Se secó por aproximadamente 1.5 horas y se obtuvo un total de polvo de 0.66g.

11.2.6.3. Tratamiento D:

A un matraz Erlenmeyer de 1000 mL se agregó 950 mL de agua destilada, posteriormente se agregó ácido acético hasta llevar la solución a un pH de 2. Se colocó en un agitador magnético a temperatura ambiente y se agregó 1 gr de ácido hialurónico (HA), una vez disuelto se procedió a tapar el matraz con papel aluminio, esto con el fin de que al agregar los 50 mg de quercetina esta no se degradara con la luz del laboratorio, se dejó en agitación por 15 min. Una vez pasado el tiempo se procedió a sónica la solución por 15 min, a temperatura ambiente.

La solución fue llevada al secador por aspersión ADL311S previamente purgado con agua destilada para obtener un micro encapsulado de la solución. Se trabajó el equipo con una temperatura de salida de $60^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ y una temperatura de entrada de 180°C , con una presión de 0.13-0.15 mP.a. Se secó por aproximadamente 3 horas y se obtuvo un total de polvo de 0.89 gr.



Figura 11. Tratamiento colocado en el equipo de secado por aspersión.

11.2.6.4. Tratamiento E:

A un matraz Erlenmeyer de 500 ml se agregó 500 ml de agua destilada. Se colocó en un agitador magnético a temperatura ambiente y se agregó 2 gr de ácido hialurónico (HA), Se procedió a tapar el matraz con papel aluminio, esto con el fin de que al agregar los 0.025 gr de quercetina esta no se degradara con la luz del laboratorio, se dejó en agitación por 15 min. Una vez pasado el tiempo se procedió a sónica la solución por 15 min, a temperatura ambiente.



Figura 12. Ejemplo de tratamiento E antes de su secado por aspersión en el equipo Yamato ADL311S

La solución fue llevada al secador por aspersión ADL311S previamente purgado con agua destilada para obtener un micro encapsulado de la solución. Se trabajó el equipo con una temperatura de salida de $60^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ y una temperatura de entrada de 180°C , con una presión de 0.13-0.15 mP.a. Se secó por aproximadamente 2 horas y se obtuvo un total de polvo de 1.27 gr



Figura 13. El polvo de cada uno de los tratamientos obtenido por medio del secado por aspersión se sometió a una reconstitución con 10 mg/5 mL con agua tipo Mili Q. En la figura se pueden observar las soluciones B. C. D, E de izquierda a derecha

TERCERA PARTE:
RESULTADOS

12. RESULTADOS.

En la Tabla 1 podemos observar las caracterizaciones de tamaño de las nanopartículas realizadas con el método observado en la página 21 (CS 1) sintetizadas bajo la metodología de Stefano Barbieri³³.

Tabla 1. Caracterización por DLS de Nanopartículas de CS sin cargar

Tratamiento	pH	Z-Average	Tamaño (nm)		PDI
QMM 1	2.6	2601	2482	-	0.334
QMM 2	2	4165	3202	-	0.436
QMB 3	1.9	3440	850.9	-	0.781
QMB 4	2.5	2405	652.7	-	0.619
QMB 5	1.5	724.1	2863	315.2	1.000
QMB 6	2	2987	1117	-	0.671

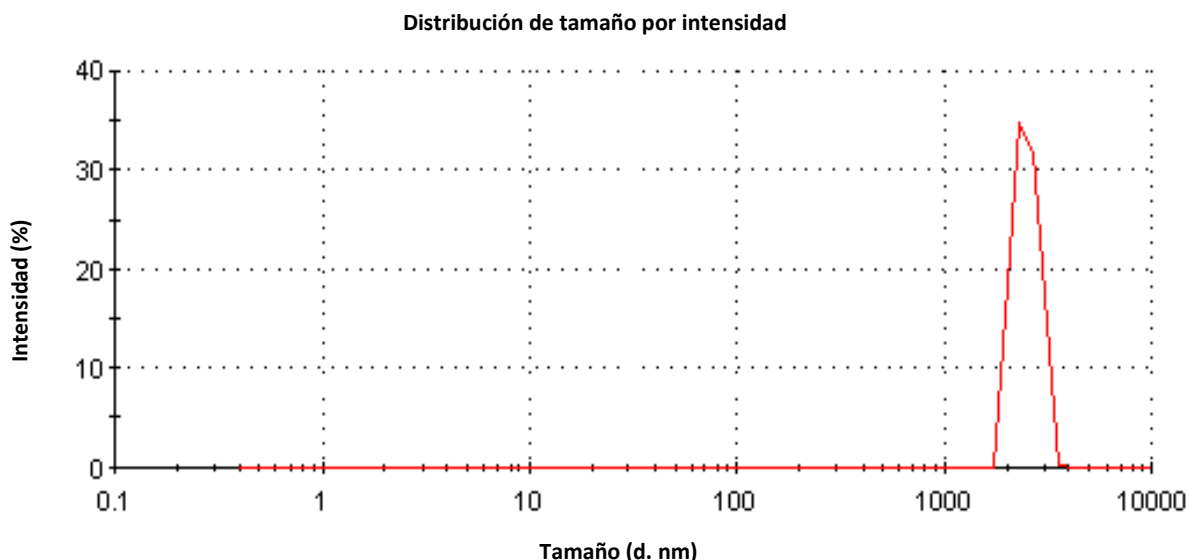
**Donde QMM representan los tratamientos hechos con CS de peso molecular medio y donde QMB representan los realizados con CS de peso molecular bajo.*

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de las lecturas observadas en la Tabla 1. de cada NP de quitosano sin cargar hechas por medio del dispersor de luz dinámico (DLS Zetasizer DTS 1060; Malvem instruments):

TRATAMIENTO PH 2.6 CS PESO MOLECULAR MEDIO.

En la Gráfica 1 podemos observar la caracterización por DLS del tratamiento QMM 1 (peso moléculas medio) en condiciones de pH 2.6, donde obtuvimos un Z-Average de 2601, un tamaño de 2482 nm y un PDI de 0.334

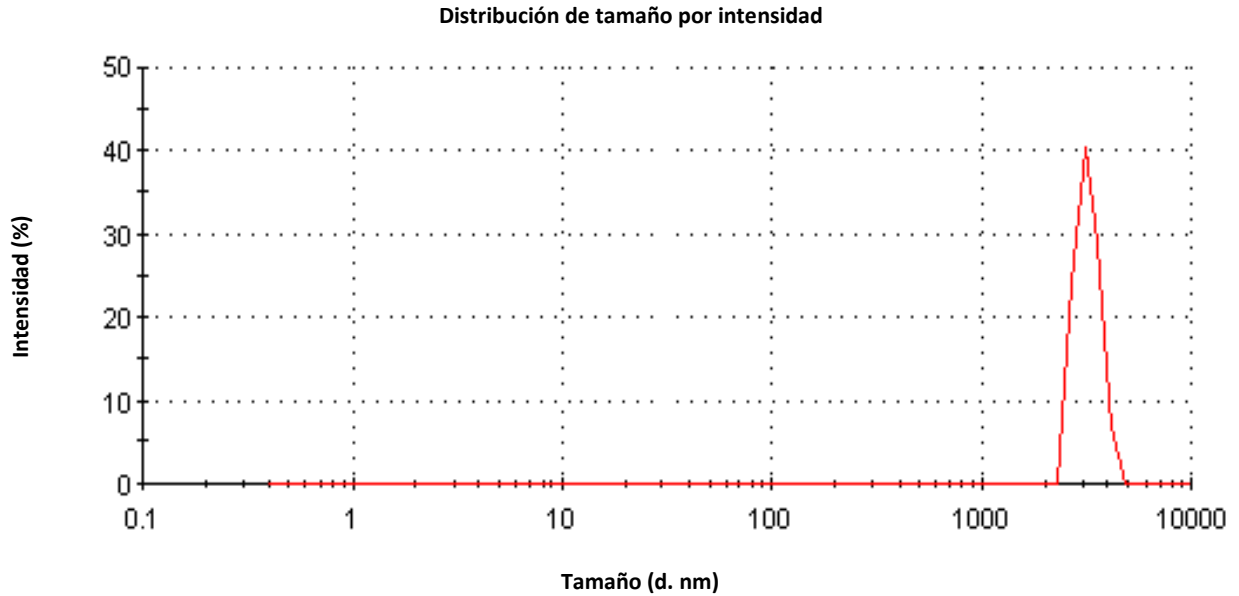
Gráfica 1. Caracterización por DLS de QMM1.



TRATAMIENTO PH 2 QUITOSANO PESO MOLECULAR MEDIO.

En la Gráfica 2. Se aprecia la caracterización de las NP QMM2 (Peso molecular medio) bajo un pH de 2, donde se obtuvieron valores de Z-Average de 4165, un tamaño de población de 3202nm y un PDI de 0.436.

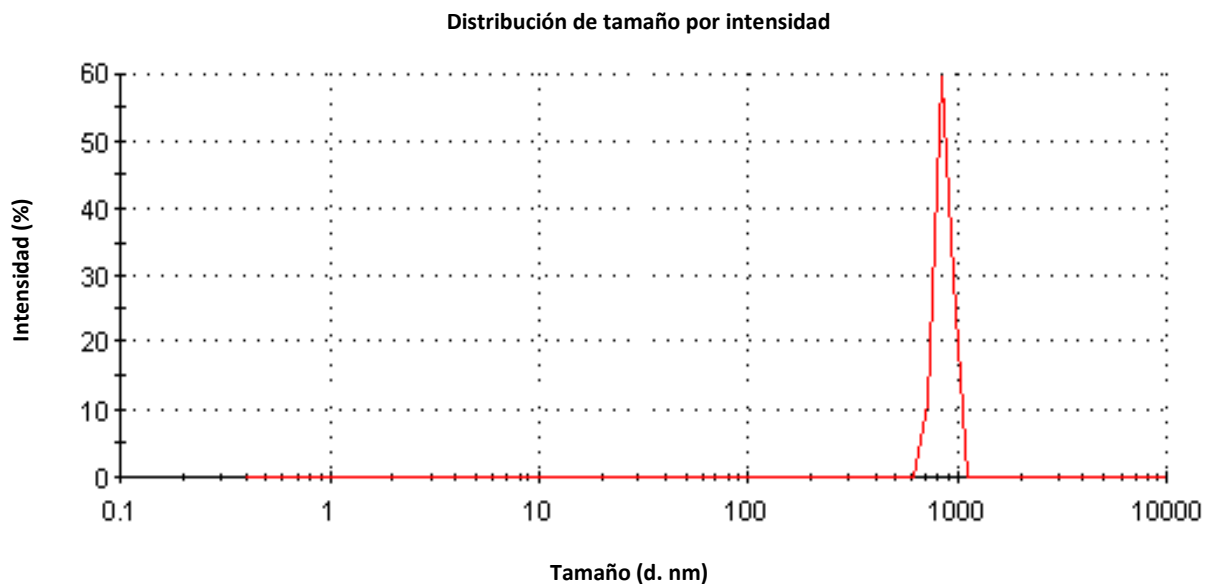
Gráfica 2. Caracterización por DLS de QMM2.



TRATAMIENTO PH 1.9 QUITOSANO PESO MOLECULAR BAJO.

Como se verá a continuación en la Gráfica 3. Trabajamos con quitosano de peso molecular bajo, en condiciones de pH de 1.9 (QMB 3) donde obtuvimos resultados de Z-Average de 3440, tamaño de población de 850.9nm y un PDI de 0.781

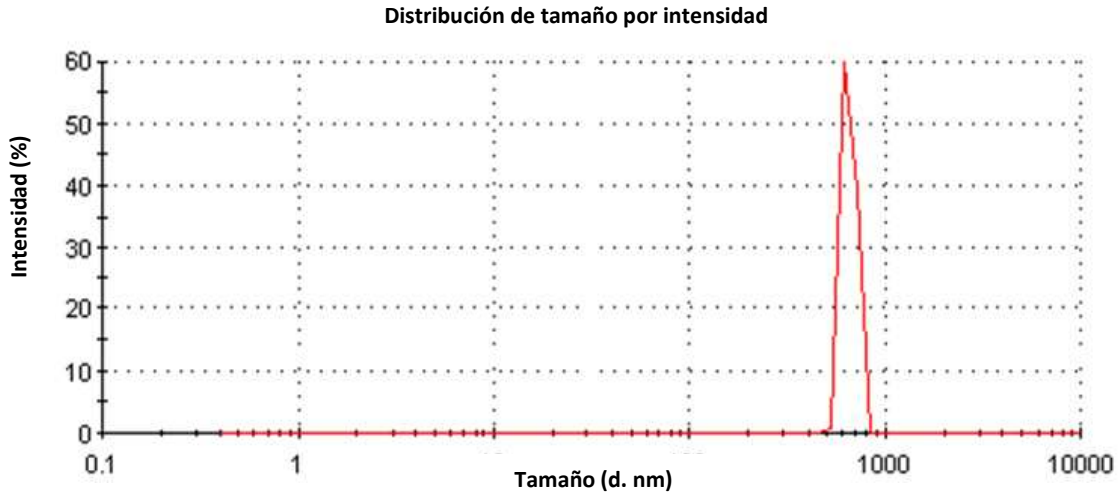
Gráfica 3. Caracterización por DLS de QMB 3.



TRATAMIENTO PH 2.5 QUITOSANO PESO MOLECULAR BAJO.

Este tratamiento estuvo bajo condiciones de un pH de 2.5, trabajando con quitosano de peso molecular bajo al cual llamamos QMB4, obtuvimos un Z-Average de 2405, un tamaño de población de 652.7nm y un PDI de 0.619

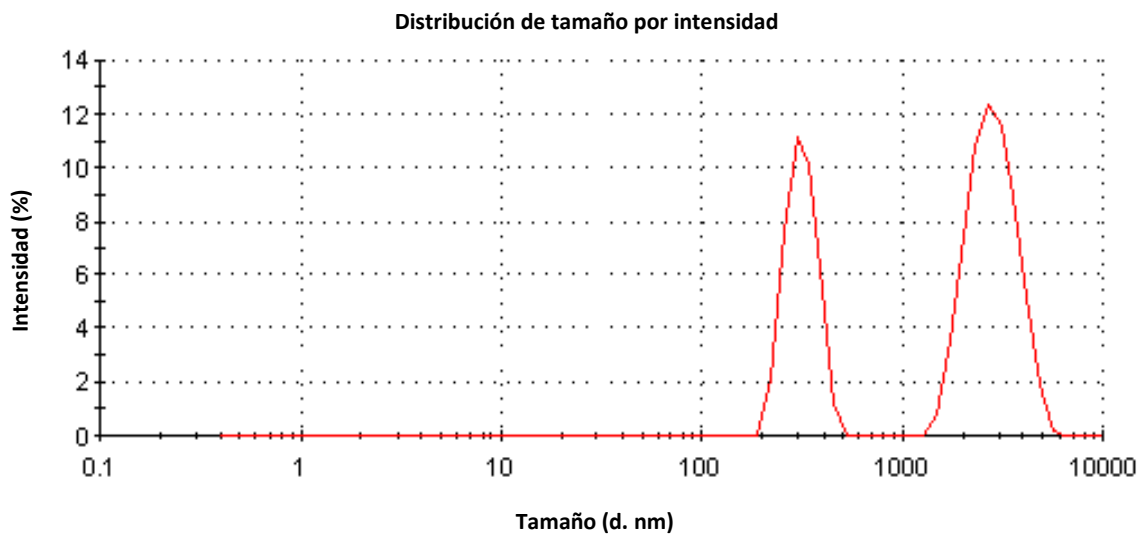
Gráfica 4. Caracterización por DLS de QMB 4.



TRATAMIENTO PH 1.5 QUITOSANO PESO MOLECULAR BAJO.

El tratamiento llamado QMB 5 (Gráfica 5), se trabajó bajo condiciones de pH de 1.5 y con quitosano de bajo peso molecular, observada la caracterización realizada por medio del DLS Zetasizer DTS 1060; Malvem instruments, obtenemos un Z-Average de 724.1, se obtuvieron dos tamaños de población el primero de 2863nm y un segundo de 315.2nm, con un PDI de 1.000

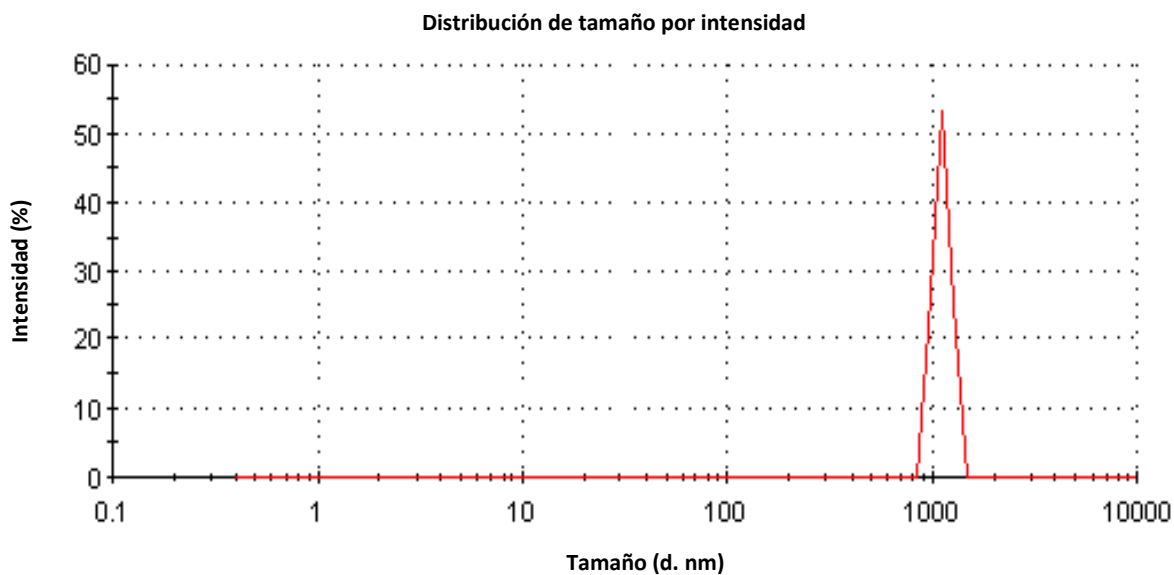
Gráfica 5. Caracterización por DLS de QMB 5.



TRATAMIENTO PH 2 QUITOSANO PESO MOLECULAR BAJO.

En la Gráfica 6 se muestra la caracterización de las NP's QMB6 sintetizadas con quitosano de peso molecular bajo y con un pH de 2, los resultados obtenidos son: Un Z-Average de 2987, una población de 1117nm y un PDI DE 0.671

Gráfica 6. Caracterización por DLS de QMB 6.



En la Tabla 2 se muestra la caracterización de tamaño de las nanopartículas de CS 2 a diferentes pH's, pero con el mismo tipo de quitosano (peso molecular bajo) que fueron sintetizadas bajo la metodología del Dr. Calvo y asociados³² con las modificaciones que se leen en la página 23 sección 10.2.3.

Tabla 2. Caracterización por DLS de Nanopartículas de CS 2 sin cargar.

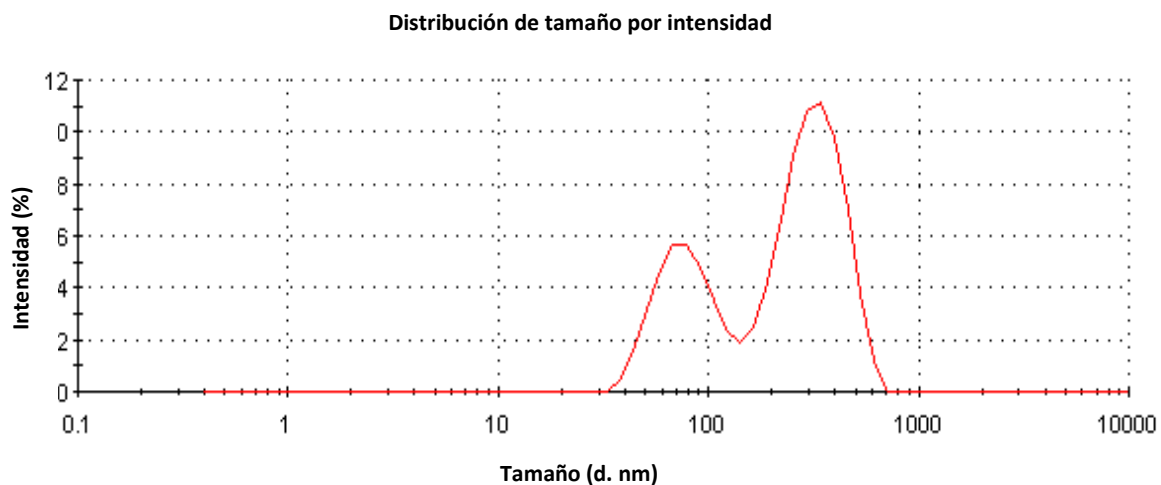
<i>pH</i>	<i>Z- Average</i>	<i>PDI</i>	<i>Tamaño 1 (nm)</i>	<i>Tamaño 2 (nm)</i>
2.5	279.5	0.402	324.7	-
2.7	276.3	0.570	112.9	742.1
4	146.3	0.205	123.5	7353
5	114.8	0.341	144.7	4658
5*	93.17	0.225	109.4	-

*Esta solución en especial fue sometida a un tratamiento por sonicador antes de su lectura por DLS con el fin de obtener una mejor agrupación de población de las nanopartículas en la solución.

Por consiguiente, a continuación, observaremos las Gráficas con las lecturas obtenidas por medio del DLS Zetasizer DTS 1060; Malvem instruments de las 5 NP's sintetizadas con esta metodología:

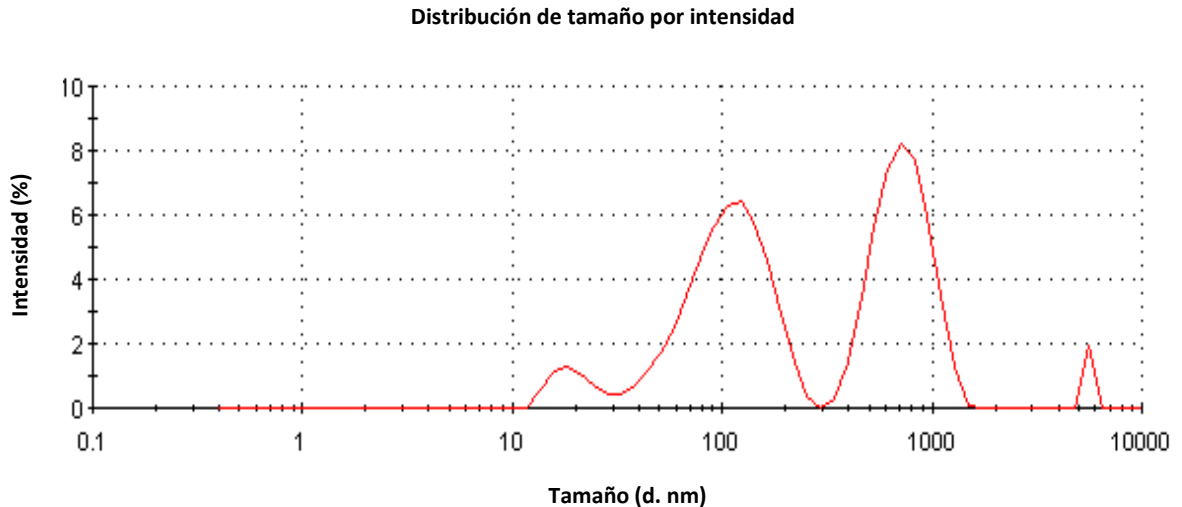
En la Gráfica 7 podemos observar las NP's sintetizadas con quitosano de peso molecular bajo y pH 2.5, que, leídas en el DLS, obtenemos resultados de Z-Average de 279.5, un tamaño de población de 324.7nm y un PDI DE 0.402.

Gráfica 7. Nanopartículas de quitosano a pH 2.5



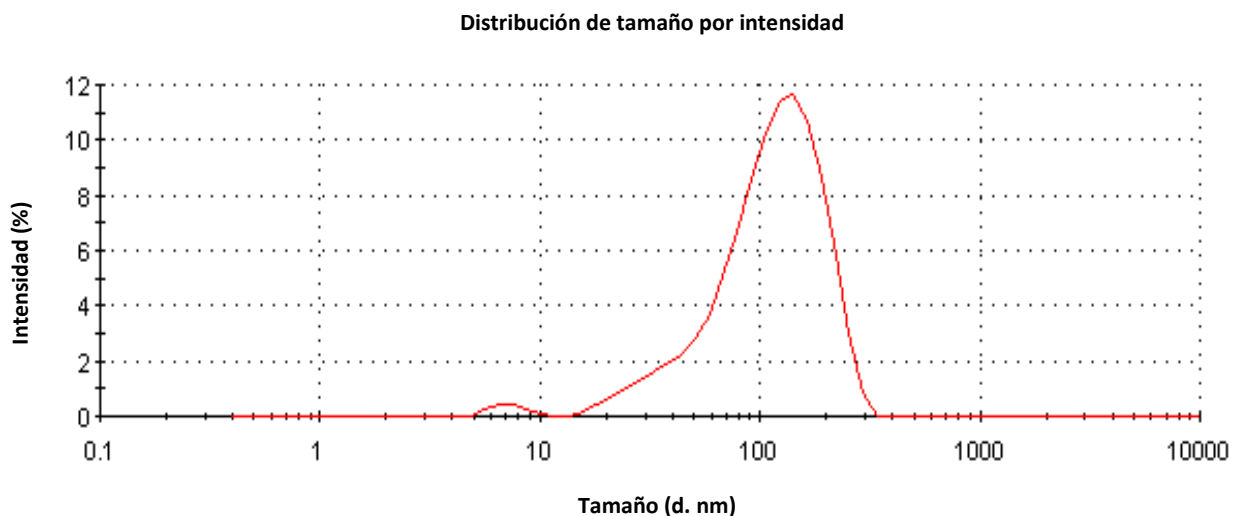
En la Gráfica 8 tenemos las lecturas en DLS de NP's de pH 2.7, que nos dan como resultado un Z-Average de 276.3, obtenemos dos tamaños de población en estas NP's, siendo el primer pico de 112.9nm y el segundo de 742.1 nm

Gráfica 8. Nanopartículas de quitosano a pH 2.7



La Gráfica 9 muestra un Z-Average de 146.3, PDI de 0.205 y al igual que las NP's de la Gráfica 8, obtuvimos dos muestras de población, la primera con un tamaño de 123.5 nm y la segunda de 7353 nm, esto bajo condiciones de un pH de 4.

Gráfica 9. Nanopartículas de quitosano a pH 4

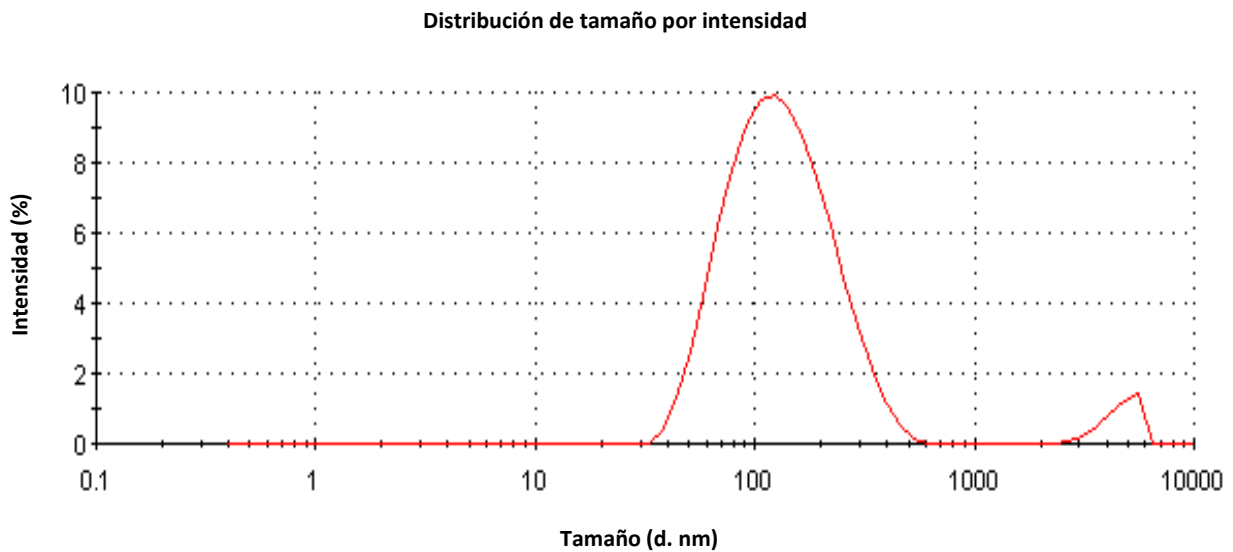


dos poblaciones de 144.7 nm y 4658 nm respectivamente, caracterizados por DLS (Zetasizer DTS 1060; Malvem instruments), se tomó la iniciativa de someter las

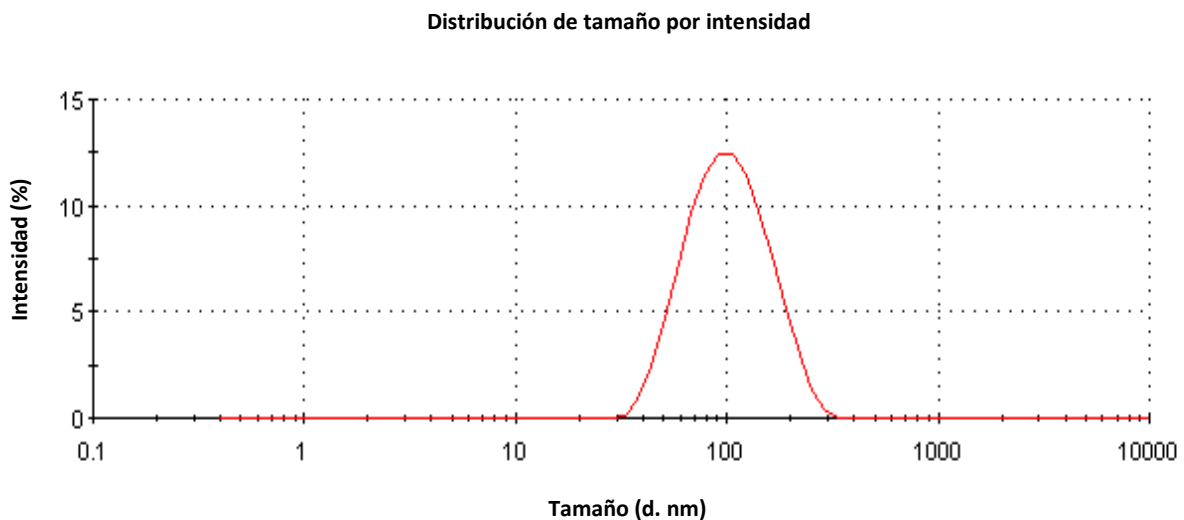
misma NP's a un tratamiento por sonicador antes de su lectura por DLS con el fin de obtener una mejor agrupación de población de las nanopartículas en la solución con las siguientes condiciones: sónicar la solución por 10-20 min con una temperatura entre los 25°-35° C, y se cambió el gotero que se utilizaba para agregar la solución de TPP, por el equipo Razel syringe pump.

Como se puede observar en la Gráfica 11 los resultados mejoraron, siendo estos: Z-Average de 93.17, PDI de 0.225 y un solo pico de tamaño de población de 109.4 nm

Gráfica 10. Nanopartículas de quitosano a pH 5



Gráfica 11. Nanopartículas de quitosano a pH 5*.



Subsecuentemente se presenta la Tabla 3 donde se pueden observar las caracterizaciones realizadas por medio del DLS de las nanopartículas ya cargadas con nuestra molécula bioactiva a pH 5.

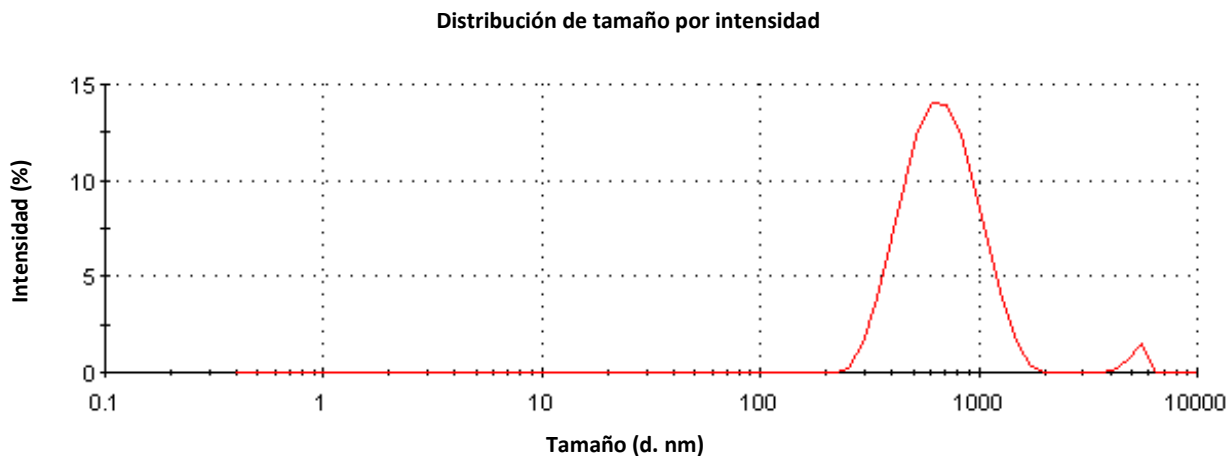
Tabla 3. Caracterización por DLS de nanopartículas de CS cargadas con quercetina 1.2

<i>pH</i>	<i>Z- Average</i>	<i>PDI</i>	<i>Tamaño 1 (nm)</i>	<i>Tamaño 2 (nm)</i>
5(diluida1:10)	631.5	0.304	708.6	531.8
5(Sin diluir)	1405	0.524	1850	4886
5(sonicada)	708.5	0.463	535.5	50.22
5 (50:50 etanol/H₂O)	1106	0.688	361.2	41.00

Posteriormente se muestran las gráficas obtenidas por el equipo de DLS:

La Gráfica 12 nos muestra los resultados de las NP's cargadas con quercetina a pH 5, diluidas 1:10 con agua tipo Mili Q, donde los resultados obtenidos nos dan un valor de Z-Average de 631.5, PDI de 0.304 y dos muestras poblacionales de 708.6 nm y 531.8 nm respectivamente.

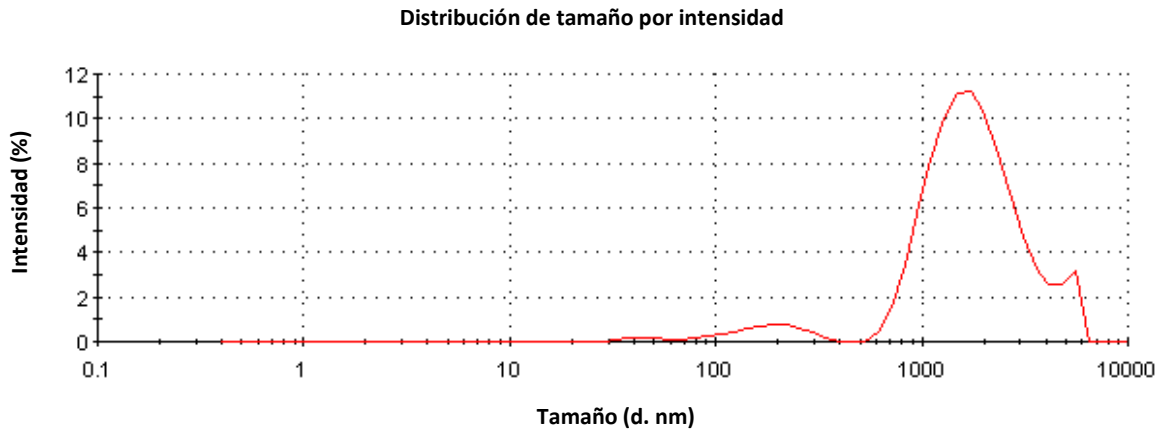
Gráfica12. Nanopartículas de CS cargada con quercetina.



La Gráfica 13 presenta las mismas NP's, sin embargo, estas no fueron diluidas antes de su posterior lectura por DLS.

Obtuvimos resultados DE Z-Average de 1405, 0.524 de PDI y dos muestras poblacionales de 1850 nm y 4886 nm.

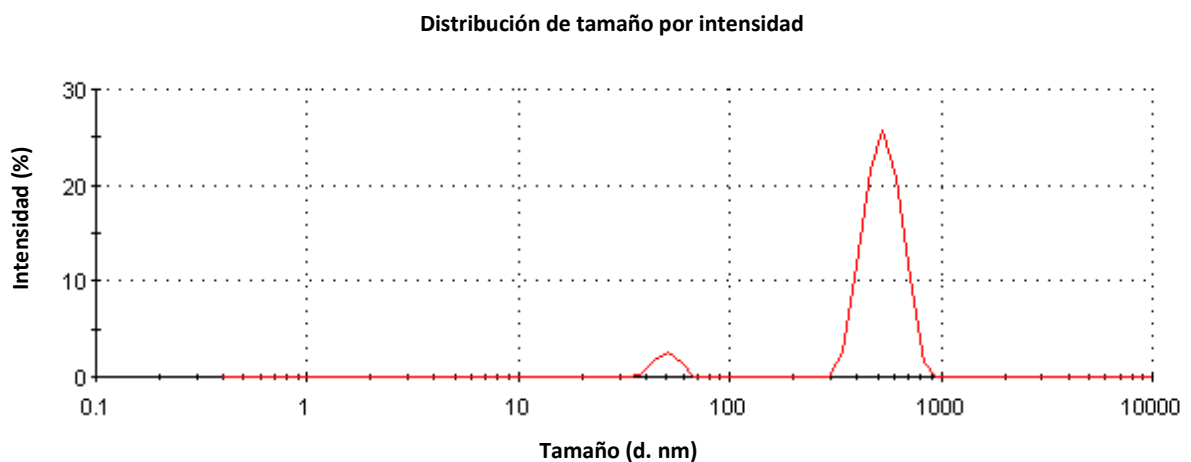
Gráfica 13. Nanopartículas de quitosano cargadas con quercetina.



Las siguientes NP's (Gráfica 14) se sometieron a dilución 1:10 con agua tipo Mili Q y puestas por 20 min en el *Sonicador Bran Sonic 2510R-MTH*.

Obtuvimos un Z-Average de 708.5, un PDI de 0.463 y dos poblaciones de 535.5nm y 50.22 nm respectivamente; Estos resultados pueden ser observados a continuación.

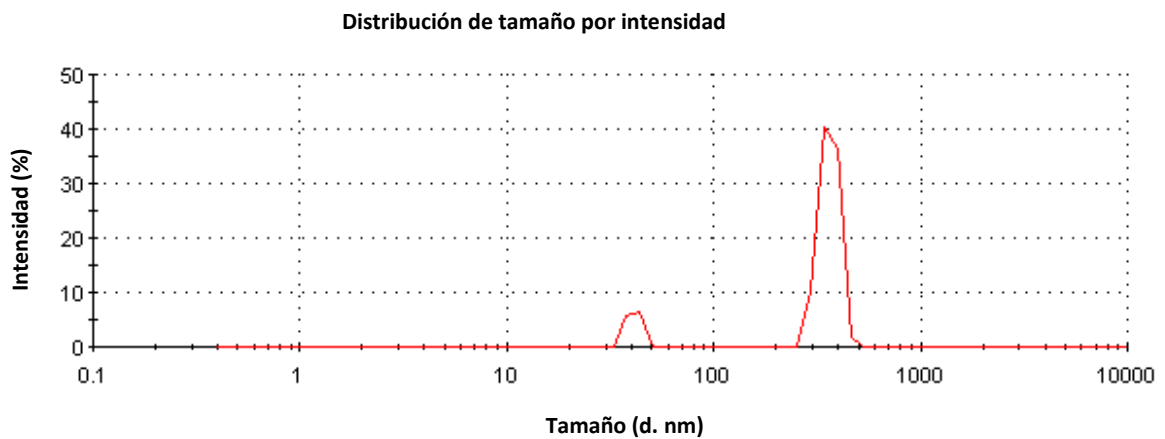
Gráfica 14. Nanopartículas de quitosano cargadas con quercetina.



Las NP's de la Gráfica 15, antes de su caracterización por DLS, se les aplicó una dilución 50:50 con etanol y agua tipo Mili Q.

Los resultados fueron: Z-Average de 1106, PDI 0.688 y al igual que los tratamientos pasados, obtuvimos dos tamaños de población, el primero de 361.2 nm y el segundo de 41 nm, como se observan a continuación:

Gráfica 15. Nanopartículas de quitosano cargadas de quercetina.



En la Tabla 4 se muestra la caracterización de tamaño de las nanopartículas de ácido hialurónico que fueron sintetizadas por el método de secado por aspersión en el equipo *Yamato ADL311S*.

Tabla 4. Caracterización por DLS de Nanopartículas de ácido hialurónico cargadas.

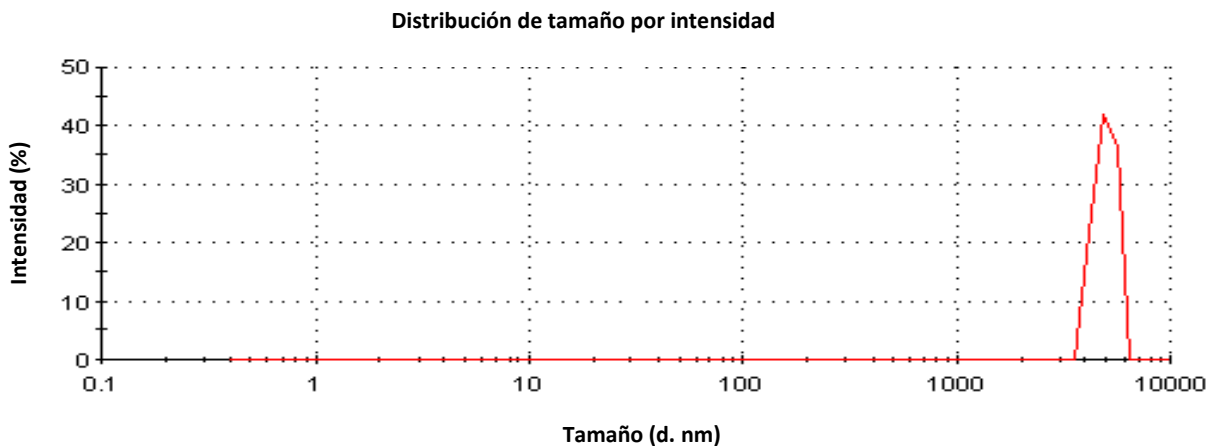
Tratamiento	Z-Average	Tamaño (nm)	PDI	Rendimiento	
B	7370	4935	-	1.000	35.6%
C	9030	4409	-	1.000	26.4%
D	431.0	443.5	-	0.152	35.6%
E	9284	4935	-	1.000	30%

A continuación, se exponen las gráficas realizadas por el equipo DLS:

Las NP's de AH, llamadas Tratamiento B, son presentadas en la Gráfica 16, su metodología puede ser observada en la página 26, punto 10.2.6.1.

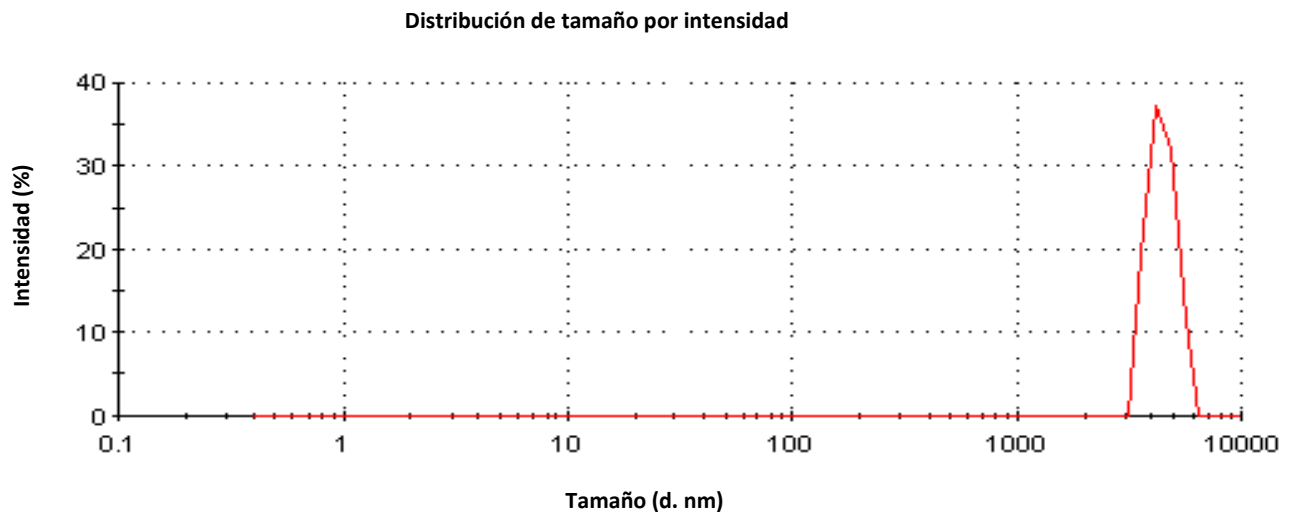
Este tratamiento mostró resultados de Z-Average de 7370, un tamaño de población de 4935 nm y un PDI de 1.000.

Gráfica 16. Nanopartículas de AH cargadas con quercetina tratamiento B.



La Gráfica 17 presenta los resultados de las NP's del tratamiento C (pág. 26) con un Z-Average de 9030, una población de 4409 nm y un PDI de 1.000.

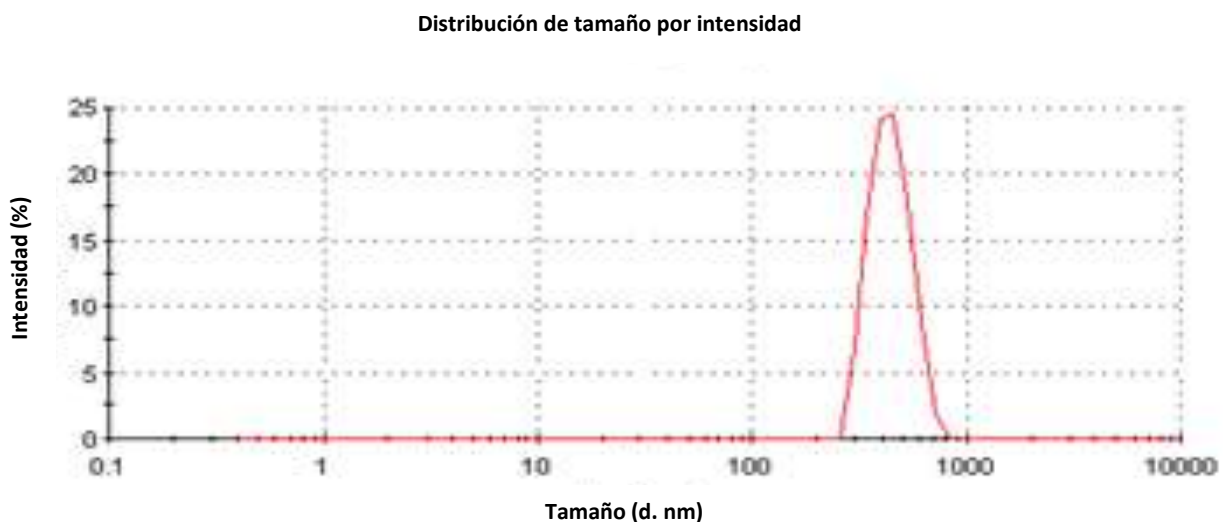
Gráfica 17. Nanopartículas de AH cargadas con quercetina tratamiento C.



Las NP's del tratamiento D, a diferencia de las demás fueron puestas bajo condición de un pH de 2 (Pag 27).

A continuación, se muestran los resultados de su caracterización por DLS en la Gráfica 18, donde se observan resultados de un PDI de 0.152, un Z-Average de 431.0 y un tamaño en su población de 4935 nm.

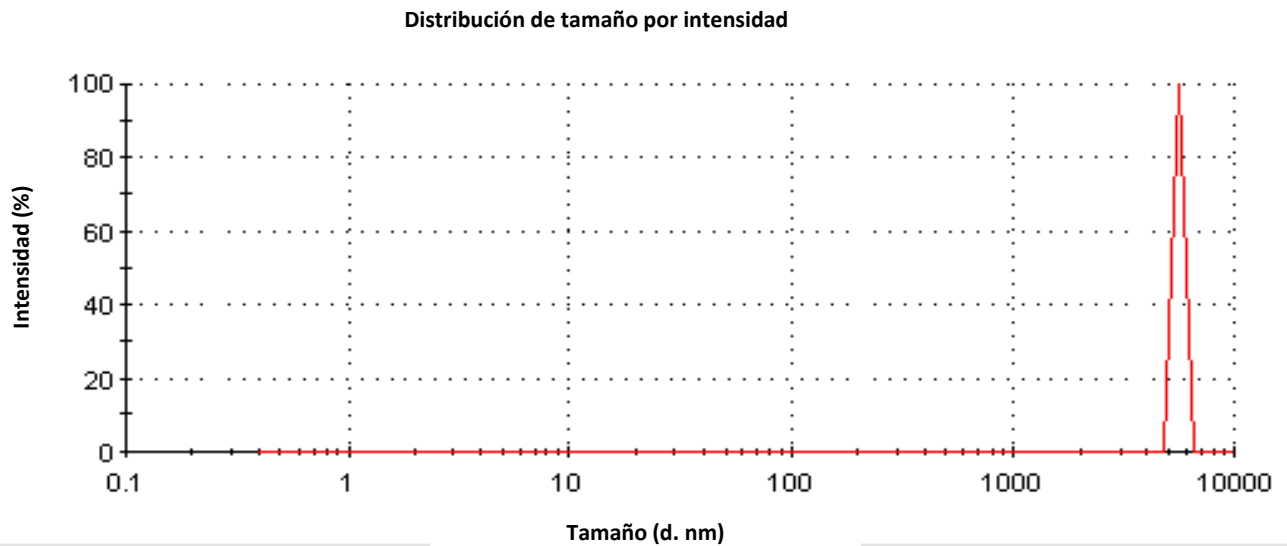
Gráfica 18. Nanopartículas de AH cargadas con quercetina tratamiento D.



Por último, en la Gráfica 19, se muestran las NP's sintetizadas por medio del método de secado por aspersion, llamadas tratamiento E.

Aquí se observan resultados de un Z-Average de 9284, un tamaño de población de 4935 nm y un PDI de 1.000.

Gráfica19. Nanopartículas de AH cargadas con quercetina tratamiento E.



12.1. Resultados obtenidos por medio de AFM.

12.1.1. Resultados de NP's de AH.

Analizados los datos obtenidos por las dos síntesis de nanopartículas (NP's de Quitosano y NP's de AH) se optó por realizar una lectura por medio de AFM de las NP's de AH, con el fin de obtener una imagen topográfica 3D en tiempo real

Los resultados obtenidos, gracias al Microscopio de fuerza atómica, marca Agilent modelo SPM5100, pueden ser observados en la Figura 14.

Las imágenes se adquirieron utilizando cantilevers de silicio marca Budget sensors con frecuencia de vibración entre 150 y 175 KHz en modo intermitente

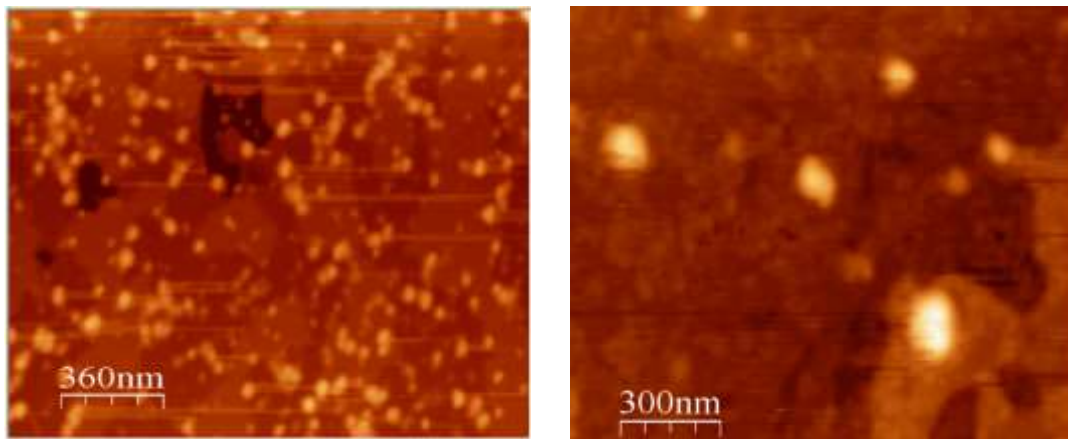


Figura 14. Resultado de la microscopía por fuerza atómica del tratamiento de nanopartículas de ácido hialurónico D.

12.2. Eficiencia de cargado de quercetina .

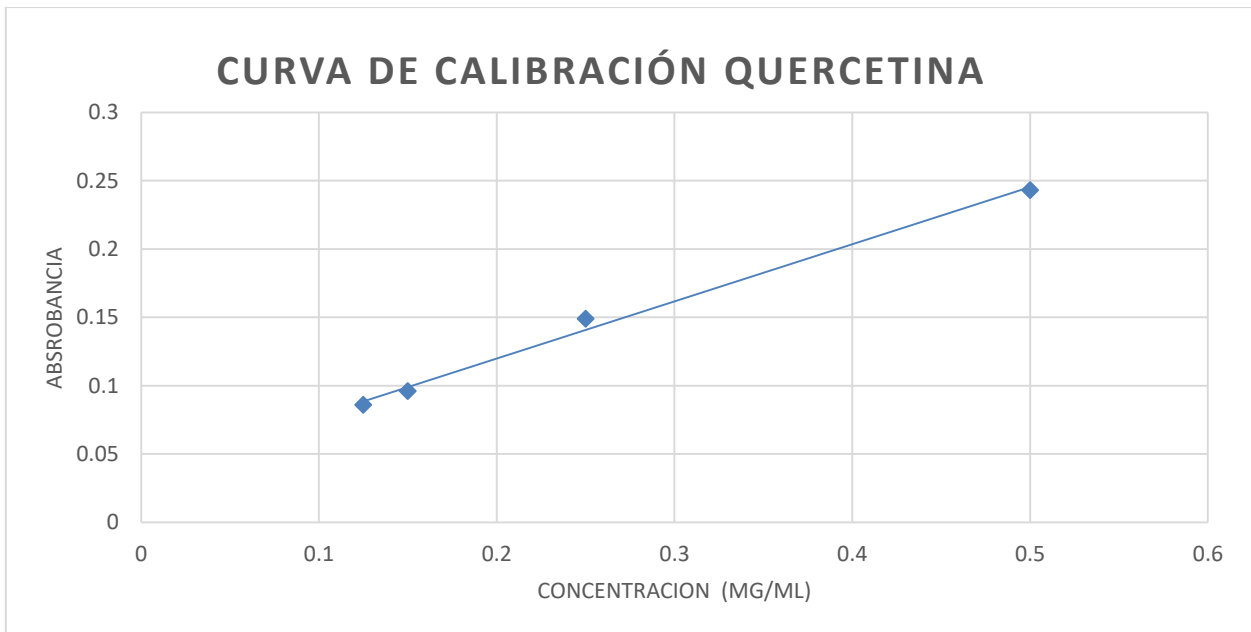
Con el fin de evaluar la eficiencia en el cargado de la quercetina en las nanopartículas se realizó una curva de calibración (Gráfica 20) hecha con 10 mg de quercetina y 10 mL de agua tipo Mili Q a distintas concentraciones, las cuales fueron leídas por medio de un espectrofotómetro (Figura 15) a una absorbancia de 320 n.m obteniendo los siguientes resultados planteados en la Tabla 5:

CONCENTRACIÓN	ABS
0.125	0.086
0.15	0.096
0.25	0.149
0.5	0.243



Tabla 5. Concentraciones de quercetina.

Figura 15. Espectrofotómetro Beckman Coulter DU 520



Gráfica 20. Curva de calibración de quercetina.

12.2.1. Eficiencia de cargado a NP's de CS.

Con esta evaluación obtenemos los siguientes datos:

$$y = mx + b$$

$$y = 0.4185x + 0.0363$$

Se calcula un coeficiente de correlación de:

$$r = 0.9943$$

Posteriormente se colocaron nanopartículas de CS sin cargar para utilizar como blanco esto, con la finalidad de leerlas contra la muestra de nanopartículas de CS cargadas de quercetina a pH 5 disuelta con etanol/H₂O (9:1) con ayuda del espectrofotómetro donde se obtuvieron los siguientes resultados:

$$X=0.381 \text{ nm}$$

A continuación, se procede al despeje de la fórmula $y = mx + b$ con el fin de obtener la concentración final de quercetina que fue captada por las nanopartículas

$$x = \frac{y - b}{m}$$

$$x = \frac{0.381 - 0.0363}{0.4185}$$

$$x = 0.8236 \text{ mg/mL}$$

$$\frac{(\text{Quercetina Final})}{(\text{Quercetina Inicial})} \times 100 =$$

$$\frac{0.8236}{1} \times 100 = 82.36 \%$$

Con este procedimiento se obtiene el porcentaje de cargado total de las nanopartículas de quitosano, este resultado representa poco más de un 80% de cargado de los 10 mg anteriormente agregados a la solución para la síntesis de las nanopartículas.

12.2.2. Eficiencia de cargado en NP's de AH

En lo que respecta a las nanopartículas de ácido hialurónico, estas fueron reconstituidas con 10 mg de la muestra D más 10 mL de etanol obtenemos una concentración inicial de:

$$x = 0.478 \text{ nm En concentración de } 1\text{mg/mL}$$

Sin embargo, se realizó una corrección de absorbancias, restando la contribución del ácido hialurónico en la absorbancia medida a 320 nm que fue de 0.085nm a la misma concentración que se encontraba en las nanopartículas, por lo tanto:

$$0.478 - 0.085 = 0.397\text{nm}$$

Esto nos dice que la absorción total de las nanopartículas de AH es de:

$$x = 0.397 \text{ nm}$$

A continuación, se muestra el porcentaje obtenido mediante el despeje de la formula $y = mx + b$ con el fin de obtener la concentración final de quercetina que fue captada por las nanopartículas de AH.

$$x = \frac{y - b}{m}$$

$$x = \frac{0.393 - 0.0363}{0.4185}$$

$$x = 0.8523 \text{ mg/mL}$$

$$\frac{(\text{Quercetina Final})}{(\text{Quercetina Inicial})} \times 100 =$$

$$\frac{0.8523}{1} \times 100 = 85.23\%$$

CUARTA PARTE: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

13. DISCUSIÓN.

En la última década, los polímeros biodegradables como el quitosano y sus derivados cuaternarios se han estudiado ampliamente por su papel como potenciadores de la permeación multifuncionales para mejorar la penetración de macromoléculas hidrofílicas en la administración por vía oral de fármacos.

Estos cuentan con una porosidad debido a la estructura en red de sus cadenas poliméricas, lo que permite la difusión molecular.

Se realizaron dos diferentes metodologías anteriormente mencionadas en la literatura para la síntesis de las nanopartículas de quitosano, la primera síntesis fue realizada bajo el método de Stefano Barbieri²⁹ y la segunda en la metodología propuesta por Calvo y colaboradores²⁸.

Observadas las gráficas 1 a 6 nos percatamos que los tamaños presentaban variaciones dependiendo de varios factores, uno de ellos fue la utilización de distintos pesos moleculares de quitosano, siendo estas observaciones las que marcarían la pauta para decidir que la mejor opción para nuestros posteriores tratamientos sería la utilización del CS de bajo peso molecular como se refleja en los tratamientos con pH 1.9 y 2.5 (Gráficas 3 y 4).

Sin embargo, podemos decir que gracias al artículo propuesto por Calvo y asociados nos dimos cuenta de que los tamaños de las nanopartículas variaban considerablemente con respecto a las concentraciones que agregábamos de ácido acético; Calvo propone utilizar una concentración de ácido acético 1.75 veces más que la concentración utilizada de quitosano, por ello decidimos cambiar la metodología anteriormente propuesta por este nuevo método, con el fin de obtener mejores resultados en los tamaños de nuestras nanopartículas.

Nuestros resultados confirmaron nuestra teoría y gracias a este método se mejoró el tamaño de las nanopartículas dándonos aproximadamente los mismos tamaños que presenta el artículo de Calvo²⁸.

Con los resultados obtenidos por el DLS, optamos por cargar con quercetina las nanopartículas de quitosano de pH 5 y peso molecular bajo como se puede observar en la gráfica 11. Una vez cargadas con quercetina se obtuvo un tamaño de población de 631.5 nm, donde casi el 100 % de la población total de nanopartículas ronda entre los 708.5 nm y que cuenta con un PDI de 0.304 que nos proporciona nanopartículas con un índice de polidispersidad idóneo en la población y el tamaño obtenido entra dentro del rango óptimo para nuestro propósito (Gráfica 12).

Se realizó por medio de un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 520 una evaluación de la eficiencia del cargado total de quercetina que se encontraba presente en estas NP's, dándonos como resultado final un porcentaje de 82.36%,

esto nos dice que del 100% de quercetina que agregamos a la solución, más del 80% fue captado por las redes poliméricas que presenta el CS en las NP's.

No obstante, las nanopartículas de ácido hialurónico realizadas por el método de secado por aspersión mostradas en la Gráfica 18 presentaron mejores propiedades en lo que respecta a su tamaño, brindándonos una población de 431.0 n.m y un PDI de 0.152.

Estas NP'S también fueron sometidas a una evaluación de eficiencia del cargado total de quercetina, donde primero se hizo una lectura en el espectrofotómetro de las NP's del tratamiento D en etanol, a 320nm, dándonos un resultado de 0.478nm, sin embargo, en este resultado no se hacía presente la lectura del AH total en la solución, así que se optó por leer de forma separada una muestra con AH, más la solución de ácido acético preparada previamente.

Se hicieron 3 lecturas para sacar un promedio, la primera de 0.075, la segunda de 0.084 y una tercera de 0.084, el promedio fue de 0.081; Esta lectura fue restada a los 0.478nm obtenidos por el espectrofotómetro, dándonos un resultado de absorbancia de 0.397 nm.

Gracias a esto, calculamos que se captó, por las NP's de AH, el 85.23% de la quercetina utilizada en el proceso de cargado, que representa un 2.87% más alto en comparación con las NP's de CS.

El rendimiento calculado en el proceso de estas NP's nos proporcionó un total de 35.6%, que, aunque el rendimiento parece bajo, se le atribuye a que gran parte del secado de la muestra quedó en forma de residuo en la manguera de silicón, el compartimiento del secador y el recipiente de recolección del equipo de secado.

Observados estos resultados decidimos utilizar las NP's de AH para posteriores investigaciones, por esta razón se leyeron las NP's por medio de AFM como se observan en la Figura 14, con la finalidad de tener una visión topográfica de las mismas.

14. CONCLUSIONES.

El objetivo principal de la presente tesis fue demostrar que era posible hacer una síntesis de nanopartículas a base de los dos biopolímeros (quitosano y ácido hialurónico) cargados con el flavonoide quercetina, esto debido a tres razones de interés:

1. Porque se sabe que este flavonoide posee propiedades naturales como lo son: anticancerígenas, anti mutagénicas, apoptóticas, anti ateroscleróticas, antidiabéticas, anti- inflamatorias, antibacterianas y antivirales^{19,34}
2. Sin embargo, una de las propiedades que presenta la quercetina es su baja solubilidad en el intestino , llegando a ser biodisponible solo el 5.3% después de la administración oral³⁵
3. A esto se le suma el problema de ser una molécula fotosensible, debido a la deslocalización en los enlaces presentes en sus anillos fenólicos, por lo tanto, es sumamente difícil garantizar una bioactividad por parte de la molécula, sin que llegue a oxidarse.

Siendo, por estos dos motivos de vital importancia, la creación de un vehículo compatible con el organismo para la distribución y absorción de nuestra molécula bioactiva, con el fin de aumentar su potencial y utilizarla como posible tratamiento en enfermedades crónico-degenerativas

De esta forma llegamos a la conclusión que tanto las NP's de CS como de AH presentan un alto potencial de encapsulación y retención del principio activo que en complemento con su capacidad de presentar un comportamiento de hinchamiento al entrar en contacto con un cambio de pH en el ambiente ,las convierte en perfectos acarreadores de fármacos para el suministro por vía gástrica sin comprometer la toxicidad biológicamente hablando, ya que posee dentro de sus propiedades, biocompatibilidad, biodegradación, antibacteriano y, contribuye en la prolongación del tiempo de circulación.

También, las dos nanopartículas cargadas, llegaron a presentar tamaños de población acordes para su movilidad a través de barreras biológicas para su fácil acceso a las células diana.

A pesar de las excelentes propiedades que presentaron ambas NP's, cabe destacar que las NP's de AH sintetizadas por medio del método de secado por aspersión son las elegidas debido a que representa a nivel industrial una mejor opción económicamente hablando y con respecto al tiempo que conlleva realizar su síntesis. El rendimiento calculado en el proceso de estas NP's nos proporciona un total de 35.6%, por lo tanto, basándonos en estos resultados llegamos a la conclusión que las NP's de AH son las elegidas para continuar con posteriores estudios de estabilidad y compatibilidad.

Estos resultados nos proporcionan información importante para el diseño y síntesis de sistemas de suministro de nanopartículas poliméricas acarreadoras de moléculas bioactivas con el fin de mejorar o potenciar las propiedades naturales de estas.

Uno de los objetivos que se tienen para estas nanopartículas, a futuro, es su utilización en alimentos comunes de la dieta mexicana, de esta forma es posible implementar un tratamiento a enfermedades de tipo crónico degenerativas que aquejan a un elevado número de personas en la población.

15. REFERENCIAS

1. Guadalupe MU, Luis R-LJ. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoam.* 2007;186:161-186.
2. Byrne ME, Park K, Peppas NA. Molecular imprinting within hydrogels. *ELSEVIER.* 2002;54:149-161.
3. Brandl F, Sommer F, A AG. Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. *Elsevier.* 2007;28:134-146. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.09.017.
4. Bencherif SA, Siegwart DJ, Srinivasan A, et al. Biomaterials Nanostructured hybrid hydrogels prepared by a combination of atom transfer radical polymerization and free radical polymerization. *Biomaterials.* 2009;30(29):5270-5278. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.011.
5. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Elsevier.* 2004;57:35-52. doi:10.1016/S0939-6411(03)00160-7.
6. Rayo E, Guerrero Q. Nanogeles poliméricos: uan nueva alternativa para la administracion de fáarmacos. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2014;45:17-38.
7. Kawano T, Niidome Y, Mori T, Katayama Y, Niidome T. PNIPAM Gel-Coated Gold Nanorods for Targeted Delivery Responding to a Near-Infrared Laser. *Bioconjugate Chem.* 2009;20:209-212.
8. Marguerite R. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Elsevier.* 2006;31:603-632. doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
9. Molina M, Bergueiro J. Aplicaciones biomédicas de nanogeles dendríticos termosensibles. *Rev Iberoam polímeros.* 2015;16(3):164-172.
10. Arredondo A, Londoño M. Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Rev Ing biomédica.* 2009;3(5):83-94.
11. Khoee S, Asadi H. Nanogels: Chemical Approaches to Preparation. In: *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials.* Taylor end. New York; 2016:5266-5293. doi:10.1081/E-EBPP-120050693.
12. Shang T, Wang C, Ren L, et al. Synthesis and characterization of NIR-responsive Aurod @ pNIPAAm-PEGMA nanogels as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(January):1-8. doi:10.1186/1556-276X-8-4.
13. Mármol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C. Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones. *Rev Tecnocientífica URU.* 2011;1:53-58.
14. Libardo E. Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus níger* y su estudio en la liberación controlada de cefalexina. *Univ*

del Valle, Santiago Cali. 2014;(1). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.

15. Salazar-Leyva J., Lizardi-Mendoza J, Ramirez-Suarez JC, Garcia-Sanchez G, Ezquerra-brauer J. Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización d eproteasa: Efectos en su estabilización y aplicaciones. *Rev Mex Ing Quim*. 2014;13(20):129-150.
16. Alonso Fernandez MJ. La naturaleza como fuente de inspiracion en el diseño de nanomedicamentos. 2014.
17. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan). *Vet Med (Praha)*. 2008;8(8):397-411.
18. Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*. 2002;6:271-278.
19. Reyes Pool H, Mendoza Díaz S, Loarca Piña G. *Desarrollo de Nanopartículas Poliméricas Para La Encapsulación, Protección Y Liberación Dirigida de Quercetina, Un Potente Antioxidante*. Queretaro; 2013.
20. Maalik A, Khan FA, Mumtaz A, et al. Pharmacological Applications of Quercetin and its Derivatives. *Trop J Pharm Res*. 2014;13(September):1561-1566.
21. Rodriguez Pérez E. Diseño de nuevos biomateriales basados en redes poliméricas interpenetradas de ácido hialurónico y polímeros acrílicos. 2017.
22. Yu S, Hu J, Pan X, Yao P, Jiang M. Stable and pH-Sensitive Nanogels Prepared by Self-Assembly of Chitosan and Ovalbumin. 2006;(11):2754-2759. doi:10.1021/la053158b.
23. Expósito Harris R. Quitosano, un biopolimero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. *Rev Gen Inf y Doc*. 2010. doi:10.1016/S0141-0229(03)00220-5.L.
24. Qingrong H, Hailong Y, Qiaomei R. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *J Food Sci*. 2010;75(1):50-57. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01457.x.
25. Ezhilarasi PN, Karthik P, Chhanwal N. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food Bioprocess Technol*. 2013;6:628-647. doi:10.1007/s11947-012-0944-0.
26. Chen BYH, Weiss J, Shahidi F. Nanotechnology in nutraceutical and functional foods. *Food Technol*. 2003;3(6):30-36.
27. Tapal A, Tiku PK. Complexation of curcumin with soy protein isolate and its implications on solubility and stability of curcumin. *Food Chem*. 2012;130(4):960-965. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.025.
28. Karine H, Piazzon M, Luis A, et al. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. *Mater Sci Eng C*. 2009;29(2):387-392. doi:10.1016/j.msec.2008.07.030.

29. Desai KGH, Park HJ. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. 2005;22(March):179-192. doi:10.1080/02652040400026533.
30. Desai KGH, Park HJ. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. 2005;22(June):377-395. doi:10.1080/02652040500100139.
31. Chavez-santoscoy RA, Gutierrez-uribe JA, Granados O, et al. Flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L .) seed coats modulate lipid metabolism and biliary cholesterol secretion in C57BL / 6 mice British Journal of Nutrition. 2018;(2014):886-899. doi:10.1017/S0007114514001536.
32. Alonso MJ, Calvo P, Remun C. Novel Hydrophilic Chitosan – Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *J Appl Polym Sci.* 1997;63:125-132.
33. Barbieri S, Sonvico F, Como C, et al. Lecithin / chitosan controlled release nanopreparations of tamoxifen citrate : Loading , enzyme-trigger release and cell uptake. *J Control Release.* 2013;167(3):276-283. doi:10.1016/j.jconrel.2013.02.009.
34. Cartaya O, Reynaldo I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Rev Cultiv Trop.* 2001;22(2):5-14.
35. Li F, Jin H, Xiao J, et al. *The Simultaneous Loading of Catechin and Quercetin on Chitosan-Based Nanoparticles as Effective Antioxidant and Antibacterial Agent.* Elsevier Ltd; 2018. doi:10.1016/j.foodres.2018.05.038.

