

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE
Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y Tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)
Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos



ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara

PAP4G03 Apoyo a Centros de Investigación Externos I
“Encapsulamiento de ácidos hidroxicinámicos en polímeros” en Centro de
Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco,
A.C., Guadalajara Jalisco

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

[Ing. en Nanotecnología. Aída Gabriela Fernández Contreras]

Profesor PAP: Dr. Hugo Esquivel Solís

Tlaquepaque, Jalisco, Mayo, 2020

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	2
1. Introducción.....	3
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Justificación	4
1.3 Antecedentes.....	5
1.3. Contexto	5
2. Desarrollo	8
2.1. Sustento teórico y metodológico	8
2.2. Planeación y seguimiento del proyecto	10
3. Resultados del trabajo profesional.....	23
4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto	28
5. Conclusiones.....	31
6. Bibliografía.....	32

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.

A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

La aplicación de compuestos bioactivos se ve limitada por su baja solubilidad y alto riesgo de deterioro dentro del entorno fisiológico. El objetivo de este proyecto, desarrollado dentro del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), fue crear un protocolo para obtener y estudiar un sistema nanoestructurado a base de biopolímeros como la maltodextrina, para proteger y direccionar un compuesto bioactivo. De igual manera, se propuso comprobar su eficiencia y durabilidad dentro de un modelo tisular in vitro. Al utilizar combinaciones de polímeros como material pared de una emulsión de aceite en agua desecada por aspersión, se logró obtener un lote homogéneo de nanocápsulas con un tamaño promedio de $188.1 \text{ nm} \pm 2.049$, sin aceite libre apreciable y de morfología redonda. Esto se obtuvo a través de la adición del emulsificante Tween 80 a una concentración optimizada del 10%, mas la adición de la mezcla polimérica previamente disuelta y la utilización de Ultra-Turrax y baño ultrasónico de punta para la creación y homogeneización de la emulsión. El producto final de este trabajo sugiere el potencial de la nanoencapsulación polimérica en la vehiculación de compuestos bioactivos,

con potencial de fármacos para usos en el tratamiento de enfermedades posterior al análisis de su eficiencia en modelos tisulares in vitro.-

1. Introducción

1.1. Objetivos

Objetivo General

Evaluar las interacciones entre los polímeros y las moléculas bioactivas para determinar las condiciones apropiadas para sintetizar cápsulas poliméricas a escala nanométrica que mejoren la efectividad en la entrega dirigida de fármacos a órganos blanco.

El objetivo general del grupo a corto plazo es desarrollar sistemas innovadores en el área farmacológica de entrega dirigida de fármacos lábiles o inestables con potencial terapéutico en su forma química original. Además de contribuir al conocimiento científico a través de la publicación de resultados en revistas científicas de alto impacto. A mediano plazo se busca desarrollar productos de bajo costo, eficaces y competitivos en el mercado para tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas (Fibrosis). Finalmente, se busca a largo plazo crear terapias alternativas para la mitigación de enfermedades que actualmente no tienen cura (Cirrosis hepática y artritis).

Objetivos Específicos

1. Evaluar in silico las interacciones moleculares entre los grupos funcionales de los polímeros biocompatibles y los grupos funcionales de las moléculas bioactivas de elección para determinar los mecanismos de unión y los tipos de enlace químico a obtener.
2. Obtener mediante síntesis orgánica cápsulas nanométricas capaces de vehicular a moléculas bioactivas de naturaleza polar y no polar lábiles en el ambiente.
3. Caracterizar fisicoquímicamente la composición de los nanoencapsulados, su morfología y tamaño, además de estabilidad y parámetros de degradabilidad.

4. Evaluar la biodisponibilidad y la farmacodinámica de los fármacos nanoencapsulados en modelos tisulares in vitro.

1.2. Justificación

Para el desarrollo de este proyecto es necesario conocer las diferentes metodologías y materiales usados actualmente en el tema de nanoencapsulación, plasmados en la literatura, para determinar las condiciones más apropiadas de encapsulamiento y el método de administración adecuado. A partir de esta información, se definirá un protocolo acorde al tipo de polímero, con la metodología de síntesis de la encapsulación y las pruebas necesarias para revisar las principales propiedades.

Después de optimizar el proceso de fabricación de las nanocápsulas, se les añadirá un ligando que se una al receptor de un tejido u órgano específico. Finalmente, se probará la efectividad del fármaco encapsulado como terapéutico para enfermedades crónicas.

Las moléculas bioactivas son estudiadas actualmente como candidatas para el tratamiento de diversas enfermedades por sus propiedades farmacológicas y biológicas, bajo costo y toxicidad. Desafortunadamente, su aplicación a escala macrométrica se ve limitada por ciertas desventajas como baja estabilidad, pobre solubilidad y poca absorción y biodisponibilidad en el cuerpo, así como fallas en su especificación.

La incorporación de estas moléculas en estructuras nanométricas es un factor determinante para evitar la liberación prematura causada por la interacción con enzimas, cambios de temperatura y diferencias de pH en el medio fisiológico y a su vez facilitar el paso al torrente sanguíneo y la protección de factores ambientales. Además, su tamaño nanométrico facilita el paso por los tejidos y la absorción celular (1). Las principales estructuras nanométricas para entrega de fármacos son: liposomas, nanopartículas (biopoliméricas, cerámicas y metálicas), micelas y dendrímeros (2).

El desarrollo de estas nanopartículas poliméricas resulta ventajoso, pues son más fáciles de producir y de escalar a comparación de otras como aquellas a base de liposomas, además de tener alto nivel de estabilidad (3). Además, al utilizar polímeros biocompatibles y biodegradables específicamente seleccionados, como la maltodextrina, se evita el riesgo que representa la variabilidad en niveles de toxicidad según el tamaño de partícula,

presente en algunos de los polímeros más usados para nanoencapsulación como el ácido poliláctico (4).~~ee~~

1.3 Antecedentes

La línea de investigación de la que forma parte este proyecto es medicina regenerativa, en el desarrollo de fármacos de origen natural y efectivos para la protección de órganos, tejidos y células. Dentro de la unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica en CIATEJ Guadalajara, se encuentra el grupo de investigación dirigido por el Dr. Hugo Esquivel Solís, que tiene bajo su dirección a dos alumnos de Doctorado, una alumna de Maestría y estudiantes de diferentes disciplinas realizando estancias profesionales.

El objetivo de este PAP (Proyecto de Aplicación Profesional) complementa el trabajo realizado previamente por el Dr. y los estudiantes en la identificación de reactivos de bajo costo con alto impacto terapéutico y la creación de modelos de tejido in vitro (organoides) para probarlos. Aunque estos fármacos y sus concentraciones óptimas han sido tema estudiado a lo largo del proceso de formación de los estudiantes; esta es la primera vez que se intenta la creación de un medio de transporte direccionable y no viral que además los proteja dentro del entorno fisiológico humano.

1.3. Contexto

Las enfermedades crónicas representan actualmente uno de los mayores retos para el sistema de salud debido a su complejidad y alta mortalidad, así como el alto costo a los sistemas de salud. Los padecimientos cardiovasculares y respiratorios, la diabetes, el cáncer y la insuficiencia renal crónica representan alrededor del 71% de las muertes a nivel global (5).

En México, durante el periodo 2007-2017 y hasta la fecha, ocupan las primeras posiciones en el listado de causas de muerte (Figura 1).

¿Qué causa la mayoría de las muertes?

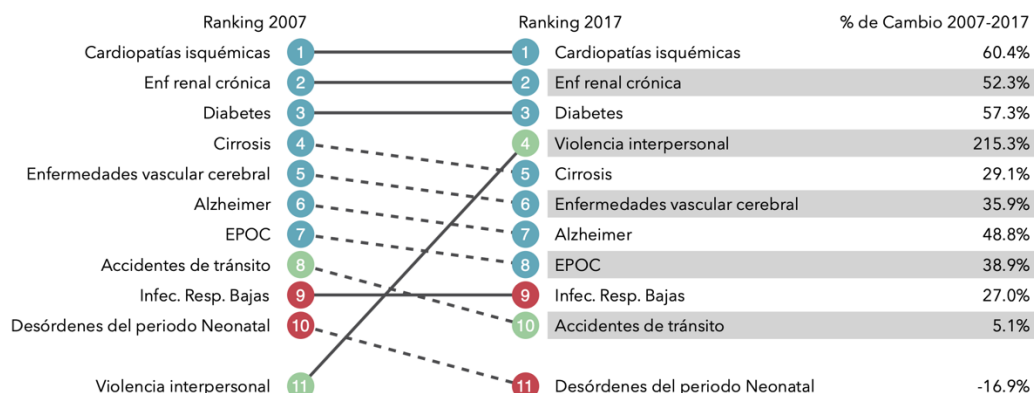


Figura 1 Causas principales de muerte 2007-2017 y porcentaje de cambio (6)

Estas enfermedades van en aumento, resultando en un incremento en la demanda de sus tratamientos, que son costosos y requieren constante aplicación. Durante el 2019, la inflación de medicamentos subió 4.8% en México, resultando afectados principalmente los usados para diabetes, cardiovasculares y los antibióticos (7). En 2019, en el Hospital Civil de Guadalajara, el 80% de las pacientes con enfermedad renal crónica abandonaron tratamiento por los altos costos que involucra su padecimiento (8).

Debido a esta situación, además del establecimiento de reformas que fomenten el acceso equitativo a los medicamentos y servicios de salud, es necesaria la creación de nuevos modelos de tratamiento que sean efectivos y accesibles. Es aquí donde la innovación tecnológica resulta indispensable.

El sector farmacéutico en México se basa principalmente en la manufactura, pero no en la innovación. La Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica reporta que México es el segundo mercado más grande de América Latina para esta industria. Tiene un valor promedio de 14,500 millones de dólares anuales, ya que 14 de las 15 principales empresas del sector a nivel internacional se encuentran ubicadas en el país (9)

Estos ingresos no se han visto reflejados en la innovación, especialmente a nivel estatal. De acuerdo con el Plan Estatal de Desarrollo Jalisco (2013-2033), el estado tiene uno de los

índices de gasto en materia de ciencia, tecnología e innovación más bajos a nivel nacional con 0.43% del PIB estatal; cuando la media nacional es de 1.0% del PIB (Producto Interno Bruto) (10)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2018 destacó que los países más pobres del mundo pueden ganar 350 000 millones de dólares hasta el 2030 al invertir en la prevención y tratamiento de las enfermedades crónicas. Esto supone un gasto adicional de 1.27 dólares por persona al año, pero colaboraría a la salvación de más de 8 millones de vidas en el mismo tiempo, lo cual ayuda a aumentar la productividad y esperanza de vida de los países de bajos y medianos ingresos (11).

Los productos naturales destacan por sus propiedades biológicas y químicas, además que cerca del 25% de los principales compuestos farmacéuticos actuales y sus derivados provienen de fuentes naturales. Esto los convierte en un camino favorable para el desarrollo de fármacos innovadores (1).

En este contexto, la medicina regenerativa representa un nicho de oportunidad para la inversión en materia de salud a través de la implementación de la nanotecnología para mejorar la eficiencia de tratamientos a base de productos naturales. Cabe destacar que el mercado a nivel mundial de la nanomedicina para el periodo 2016-2017 fue de 140 mil millones de dólares y se espera que alcance los 350 mil millones para el año 2025 con una tasa de crecimiento anual aproximada del 10% (12).

En el caso de no adoptar nuevas medidas, se calcula una pérdida de productividad total de 7000 billones de dólares entre 2011 y 2025 entre los países en desarrollo (13).

En términos de innovación, la aplicación de esta investigación representa un cambio de paradigma en cuanto al tratamiento de enfermedades crónicas, al usar compuestos naturales con un abordaje farmacológico y uno biotecnológico, para mejorar su eficiencia. Además, el trabajo en este proyecto tiene gran impacto como estudiante de último año de la carrera, pues es un mayor acercamiento al panorama real de la investigación en el país y una oportunidad para aprender de personas con gran experiencia en el área farmacológica.

Trae consigo varios retos, como diseñar protocolos, realizar cultivo celular, análisis químico de la interacción entre compuestos, entre otros; los cuales ayudan a complementar el conocimiento previamente adquirido. Además, fomenta la inclusión de más jóvenes en el campo de la investigación.

2. Desarrollo

2.1. Sustento teórico y metodológico

Existen diferentes compuestos bioactivos como los ácidos hidroxicinámicos, probióticos y aceites esenciales, que poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, entre otras. Desafortunadamente, su aplicación se ve limitada en formulaciones de alimentos y medicamentos porque son químicamente inestables, poco solubles y susceptibles a la degeneración oxidativa. Por esta razón, en los últimos años se ha prestado mucha atención a la creación de sistemas de transporte nanoestructurados para estos compuestos, que ayuden a controlar su interacción con el ambiente fisiológico, favoreciendo la liberación controlada dentro del cuerpo y enmascarando sabores u olores indeseados (14). La selección del material encapsulante, su concentración y la técnica de encapsulación son factores determinantes en la creación de un sistema estable que permita al compuesto activo llegar a su destino y tener mayor eficiencia.

Algunas técnicas populares para encapsular compuestos bioactivos son: emulsificación, secado por aspersión, liofilización, electrospinning y coacervación. Las nanoemulsiones se basan en gotas de entre 50-200 nm formadas a partir de una fase acuosa, una de aceite y la adición de un surfactante como el polisorbato 80 (Tween 80) (Figura 2.1). Este tipo de sistema se destaca por tener la capacidad de almacenar grandes cantidades de fármacos hidrofóbicos y protegerlos de la degradación química y enzimática (15). De hecho, Chen, H., et al. crearon una microemulsión de aceite en agua con hasta 3.3% p/p de fenetil éster de ácido cafeico con tamaño de partícula menor a los 20 nm y que fue estable hasta por 180 días con alta citotoxicidad en células cancerígenas de colon y mama (16).

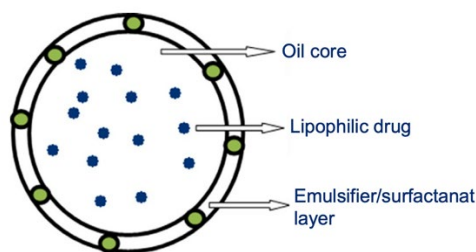


Figura 2.1 Representación de una nanoemulsión -de aceite en agua (15)

La formación final de las nanoestructuras se da a través del secado por aspersión, cuyo principio se explicará posteriormente, pero en general consiste en la extracción casi espontánea del solvente del sistema para obtener cápsulas secas con mayor estabilidad y vida útil. Debido a que en este sistema se usan temperaturas relativamente altas (60 – 180°C), es importante el uso de polímeros termoprotectores.

La maltodextrina es un polímero de bajo peso molecular creado a partir de la hidrólisis de almidón. Es muy usado como material encapsulante debido a su alta solubilidad en agua (70% aproximadamente) y baja viscosidad en solución, lo que evita la aglomeración. Además, es económica y protege a los compuestos de degradación térmica durante el secado y almacenamiento, aunque no tiene mucha capacidad emulsificante. Por este motivo, actualmente existen muchos estudios sobre su combinación con surfactantes, gomas, polisacáridos o proteínas para mejorar la eficiencia de encapsulamiento y control de liberación del material encapsulado (17).

Medina-Torres L. et al., en 2016 ~~(año)~~, encapsularon exitosamente infusiones de laurel, que tiene propiedades antiinflamatoria y antioxidante, usando maltodextrina y secado por aspersión. Así obtuvieron una liberación controlada del 70% del compuesto durante 48 horas en condiciones similares a las del tracto digestivo (18). Por su parte, Silva V. M., Vieira G. S. y Hubinger M. D. estudiaron la influencia de la combinación de almidones, gomas y maltodextrina en la eficiencia de encapsulación de emulsiones de aceite de café verde por medio de secado por aspersión. Estas estructuras mostraron tener alta retención del aceite (83-99%) y estabilidad física y oxidativa, a la vez que se mantuvo el factor de protección de UVB propio del aceite (19).

2.2. Planeación y seguimiento del proyecto

- Descripción del proyecto

Durante este proyecto se creó un protocolo para sintetizar y caracterizar nanocápsulas de compuestos bioactivos hidrofóbicos utilizando biopolímeros. En general, el proceso se basa en la dispersión de la molécula bioactiva hidrofóbica en aceite que después se emulsifica con biopolímeros como la maltodextrina, se analiza el tamaño de partícula, se seca por aspersión y finalmente se caracteriza en cuanto a morfología, actividad antioxidante, tamaño de partícula, etc.

El compuesto hidrofóbico solubilizado en etanol se concentra en aceite utilizando un rotavapor Buchi R-215. Este sistema (Figura 2.2) ayuda a acelerar el proceso de evaporación del solvente (etanol) para dejar solamente el compuesto disperso en aceite. Lo hace al rotar el matraz de bola donde se encuentra la solución, para incrementar el área superficial, mientras se calienta en el baño de agua y se reduce la presión del sistema con vacío para bajar el punto de evaporación del solvente. Después de evaporarse, el solvente pasa por un tubo serpentín llamado condensador, rodeado por agua fría que circula para ayudar a enfriar el solvente para regresarlo a fase líquida y sea depositado en un matraz receptor para poder ser reutilizado o desechado adecuadamente (20).



Figura 2.2 Rotavapor Buchi R-215 (21)

Después de la dispersión de la molécula bioactiva en aceite, se crea la emulsión con la mezcla, un emulsificante (Tween 80) y la maltodextrina previamente disuelta en agua, utilizando dos mecanismos en tándem: primero con un dispersor Ultra-Turrax T 25 digital (Figura 2.3) y después con un ultrasonicador de punta Sonics Materials VCX (Figura 2.4). El Ultra-Turrax, tal como se muestra en la Figura 2.3, es un dispositivo en forma tubular con un rotor en la punta, que se coloca dentro de la solución en el tubo y el rotor es activado por un motor de potencia ajustable que puede llegar hasta 25,000 rpm (22). Primero se utiliza por 2 minutos a 8,000 rpm para homogeneizar la solución de maltodextrina en agua que posteriormente se agregó al aceite y emulsificante para formar la emulsión a 9,000 rpm por 5 minutos.



Figura 2.3 Ultra-Turrax T 25 digital (22)

Posteriormente, se utiliza sonicación debido a que se ha demostrado que este proceso ayuda a reducir el tamaño de partícula de emulsiones previamente hechas y mejorar su estabilidad (23). Un ultrasonicador de punta tiene un generador que crea una señal eléctrica que pasa un transductor con cristales piezoeléctricos que responden directamente a la electricidad y la convierten en vibración mecánica (ultrasonido). El sonicador conserva y amplifica la vibración hasta que pasa a la sonda. La sonda se mueve en el tiempo con la

vibración para transmitirla a la solución y se mueve arriba y abajo rápidamente. Es posible controlar la amplitud de señal según las propiedades de la solución (24). Durante este proceso, se mantienen las soluciones en hielo, pues la energía de las ondas sonoras crea fricción en la solución, que a su vez genera calor. Por el mismo motivo, se utiliza durante 10 minutos al 70% de amplitud-en intervalos de 2 minutos con 1-2 minutos de descanso.



Figura 2.4 Sonicador ultrasónico de punta Sonics Materials VCX (25)

Después se analiza el tamaño de partícula con un Zetasizer Nano ZS90 para asegurarse que esté por debajo de 200 nm, que es el tamaño utilizado para aplicaciones farmacológicas y necesario para que puedan ser esterilizadas con un filtro de 0.2 μm . Para esto, se disuelve la muestra al 1% v/v (~~volumen/volumen~~) en agua destilada y se toma 1 mL, el cual se coloca en la celda transparente del equipo.

El Zetasizer Nano realiza mediciones de tamaño de partícula utilizando un proceso llamado Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), también conocida como Espectroscopía de Correlación de Fotones (SPC). En el sistema necesario para dicho proceso, tal como se puede observar en la Figura 2.5 a), un láser **(1)** con atenuador **(4)** ilumina las partículas de la solución en la celda **(2)** y el detector **(3)** posicionado a 90° mide la intensidad de la luz dispersa para obtener el movimiento browniano y relacionarlo con el tamaño de partícula. El movimiento browniano es el movimiento en reposo de las partículas debido a la colisión aleatoria con las moléculas de agua que rodean a la partícula. Una característica importante del

movimiento browniano para el DLS es que las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las grandes se mueven más lentamente (Figura 2.5 b)) (26).

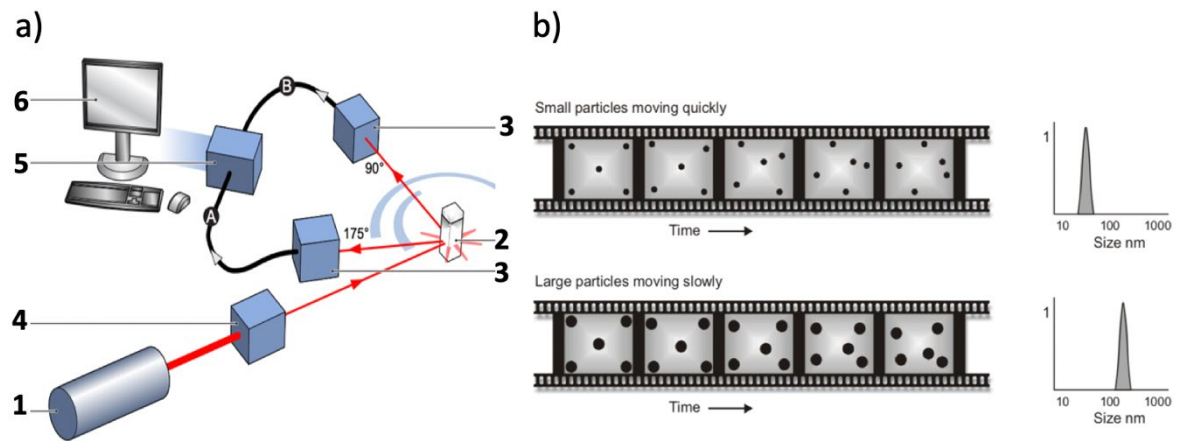


Figura 2.5 a) Mecanismo del Zetasizer, b) relación entre movimiento y tamaño de partícula (26)

La relación entre el tamaño de una partícula y su velocidad debido al movimiento Browniano se define en la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1).

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Ecuación 1 (27)}$$

Donde $d(H)$ es el tamaño de partícula [m], D es el coeficiente de difusión [m^2/s], k es la constante de Boltzmann [$\text{m}^2\text{kg}/\text{s}^2\text{K}$], T es la temperatura absoluta [K] y η es la viscosidad [$\text{Pa}\cdot\text{s}=\text{kg}/\text{m}\cdot\text{s}$].

La señal de intensidad de dispersión pasa del detector a un procesador de señales digitales llamado correlacionador (5), que compara la intensidad de dispersión en intervalos de tiempo sucesivos para derivar la velocidad a la que varía la intensidad. Esta información se pasa desde el equipo (Figura 2.6 a)) a una computadora (6), donde el software programa del Zetasizer analiza los datos y se obtiene la información sobre el tamaño de partícula automáticamente, como se muestra en la Figura 2.6 b) (26).

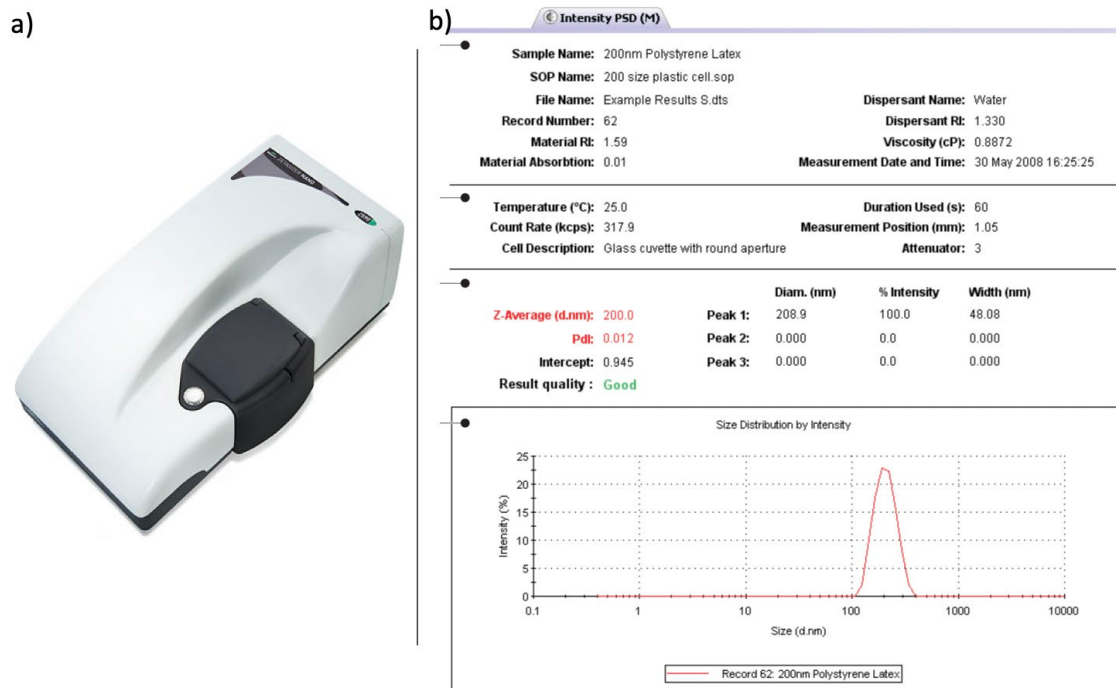


Figura 2.6 a) Zetasizer ZS90 (28), b) Formato de resultados (26)

Después de verificar el tamaño de partícula, se pasa al proceso de secado para materiales termosensibles, utilizando un secador por aspersión Yamato ADL311S (Figura 2.7 a). Este proceso (Figura 2.7 b), permite la formación de partículas con tamaño semi-homogéneo en polvo. La emulsión se diluye con agua destilada para tener una concentración final del 1% p/v ~~(peso/volumen)~~ y se coloca en un matraz sobre una placa de agitación durante todo el proceso para que las partículas no se precipiten. La solución se alimenta con un flujo ajustable a través de una manguera hacia un atomizador, que convierte la solución en pequeñas gotas líquidas. Las gotas son expulsadas a una cámara de gas seco donde se vaporiza el líquido y el sólido pasa a un separador ciclónico que separa las partículas secas del gas secante y las pasa al contenedor de recuperación. La humedad final del polvo se controla ajustando la temperatura del aire caliente (29).

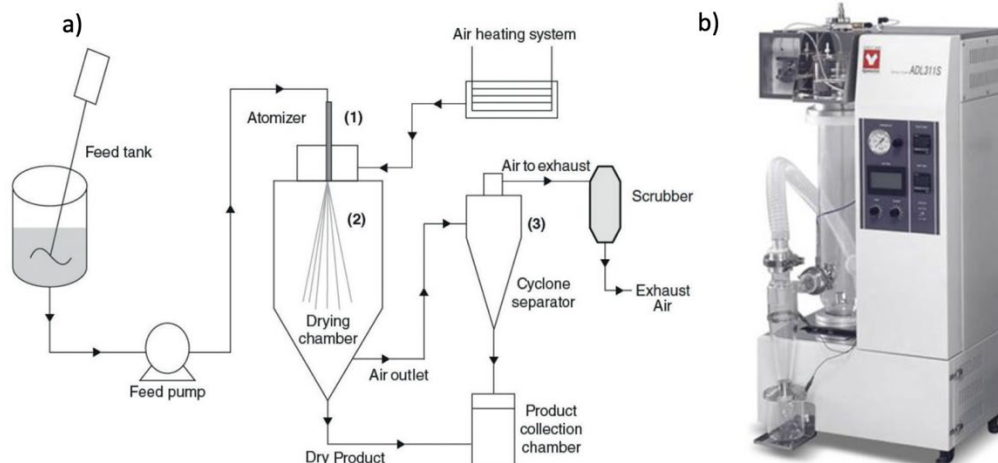


Figura 2.7 a) Representación esquemática del mecanismo de secado por aspersión: 1. Atomización, 2. Conversión de gotas a partículas (Secado) y 3. Recolección de partículas (29). b) Secador por aspersión Yamato ADL311S (30).

Para visualizar las partículas de manera sencilla se utiliza un microscopio óptico Leica con cámara ICC50W, que con luz visible y un sistema de lentes permite crear imágenes magnificadas de objetos pequeños. Primero se prepara la muestra al dispersar 0.01 g del polvo en 1 mL de agua destilada, se pone una gota de la solución sobre un porta muestras de vidrio, se le coloca un cubreobjetos encima y se espera a que se evapore el agua a temperatura ambiente para colocarla sobre la platina del microscopio. Debido a que son partículas en el rango nanoscópico se utiliza una magnificación de 400x y posteriormente, para tomar fotos, magnificación de 1000x. Para esta última magnificación se agrega una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos de la muestra para que se concentre la luz del objetivo y se aumente la resolución. La imagen se visualiza en la computadora usando el software Leica EZ 3.4.0 que además permite la medición de tamaño de partícula.



Figura 2.8 Microscopio Óptico Leica con cámara (31)

- Plan de trabajo

En la Tabla 2.1 se muestra la secuencia de actividades que se siguieron durante las ocho primeras semanas del proyecto de aplicación profesional incluyendo investigación en literatura, actividades técnicas y asesoría por parte de los demás miembros del grupo, el Dr. Hugo Esquivel Solís y otros doctores con experiencia en el tema de encapsulación, como el Dr. Hugo Espinosa Andrews, también de CIATEJ.

Tabla 2.1 Cronograma de actividades realizadas de la semana 1 a 8

		Semana																															
Actividades	Recursos	1				2				3				4				5				6				7				8			
		L	M	M	J	V	L	M	M	J	V	L	M	M	J	V	L	M	M	J	V	L	M	M	J	V	L	M	M	J	V		
Preparación y Aprobación de protocolo de encapsulación																																	
Investigación de posibles polímeros																																	
Investigación de técnicas de encapsulamiento																																	
Investigación de caracterización necesaria																																	
Creación del protocolo completo																																	
Asesoría con el grupo completo en seminario																																	
Encapsulamiento de compuesto activo en matriz biopolimérica																																	
Preparación del equipo																																	
Creación de la emulsión de aceite en agua con material pared	Rotavapor, Ultra-Turrax																																
Secado de cápsulas	Secador por aspersión																																
Investigación de Optimización de proceso																																	
Asesoría con el Dr. Hugo Espinosa y Dr. Hugo Esquivel																																	
Seminario																																	
Encapsulamiento optimizado con Tween 80																																	
Preparación del equipo																																	
Encapsulamiento de compuesto activo con Tween 80																																	
Adición del material pared (polímeros)																																	
Determinación de tamaño de partícula	Zetasizer																																
Seminario																																	
Pruebas de tamaño de partícula con la adición de material pared sólido y previamente disuelto																																	
Junta con el Dr. Hugo Espinosa																																	

El protocolo elaborado pasó por diferentes modificaciones. La primera vez que se encapsuló el compuesto activo, se realizó la emulsión como se describe anteriormente, pero sin usar el emulsificante Tween 80, simplemente se utilizó una combinación de biopolímeros incluyendo maltodextrina y se pasó al secado por aspersión con temperatura de 120°C y 60°C de entrada y salida respectivamente. De este proceso se obtuvo un polvo aceitoso (Figura 2.9).



Figura 2.9 Nanocápsulas obtenidas después del proceso de secado por aspersión

La presencia del aceite en la superficie del polvo es señal de la mala encapsulación de este. Durante la asesoría con el Dr. Hugo Esquivel y el Dr. Hugo Espinosa, se sugirió hacer pruebas con el uso de un emulsificante como Tween 80 previo a la adición de los biopolímeros. Por este motivo se hicieron emulsiones de aceite en agua con Tween 80 en concentración de 5 y 10% v/v (~~volumen/volumen~~) de la solución total, sin la adición de maltodextrina u otro biopolímero. Se utilizó Ultra-Turrax a 9,000 rpm por 1 minuto y medio y el sonicador ultrasónico de punta por 10 minutos en intervalos de 2 minutos después de los cuáles se tomó una muestra para poder definir duración óptima según el tamaño de partícula. Las 10 muestras obtenidas según la variación de tiempo y concentración de emulsificante se analizaron con el Zetasizer y a partir de los resultados se creó el gráfico mostrado en la Figura 2.10.

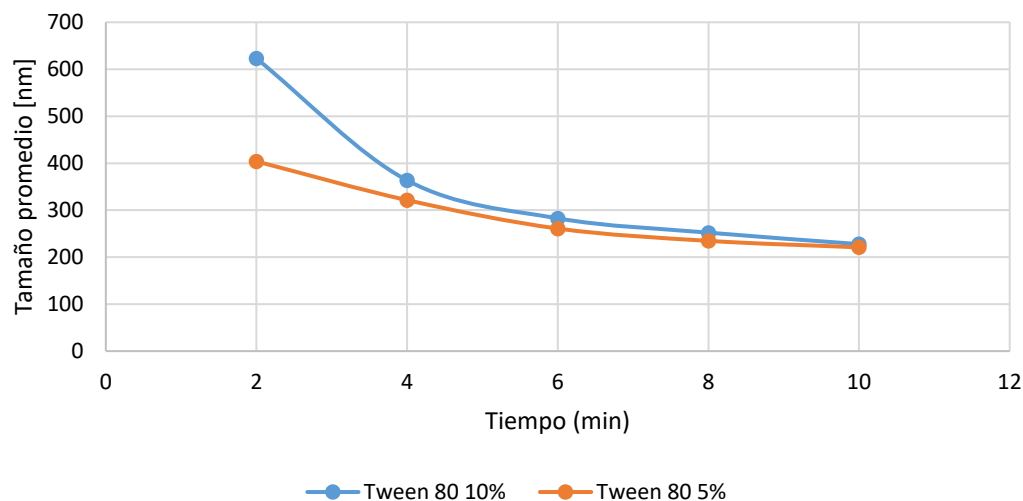


Figura 2.10 Comparación de tamaño de partícula de emulsiones de aceite en agua con Tween 80 a 2 diferentes concentraciones (5 y 10% del volumen total de solución v/v) y diferente tiempo de sonicación ultrasónica.

A partir de estos resultados se decidió utilizar una concentración de Tween 80 al 10% y un tiempo de sonicación de 10 minutos. Una vez definidos estos parámetros se realizó nuevamente el proceso de emulsificación, con la adición de los biopolímeros incluyendo maltodextrina a la solución antes de usar el Ultra-Turrax. Se utilizaron 2 condiciones, bajo la misma concentración, a una muestra se le adicionó la combinación de polímeros directamente en polvo y a otra se le agregó previamente disuelta en agua por 3 horas para que se saturara el polímero. Al analizar las muestras con Zetasizer se obtuvo un tamaño de partícula de 211.6 ± 6.921 y 224.1 ± 7.766 nm con la adición de polímero disuelto y en polvo respectivamente (Figura 2.11 y Figura 2.12). Debido a que los picos observados en la gráfica se concentran en un mismo punto, se puede concluir que tienen poblaciones de partículas con un tamaño mayormente homogéneo.

Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 224,1	Peak 1: 299,4	97,0	144,5
Pdl: 0,228	Peak 2: 49,50	3,0	10,92
Intercept: 0,943	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			

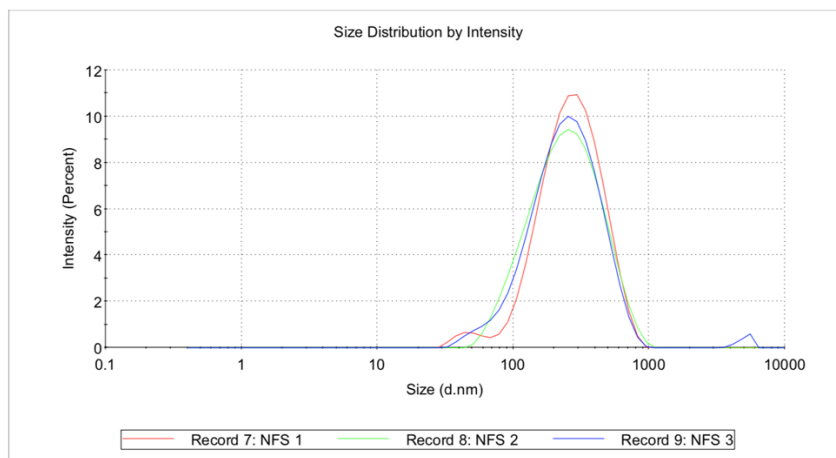


Figura 2.11 Tamaño de partícula medido con Zetasizer de las muestras con la adición de polímero directamente en polvo.

Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 211,6	Peak 1: 280,8	94,5	127,8
Pdl: 0,232	Peak 2: 64,00	5,5	11,15
Intercept: 0,954	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			

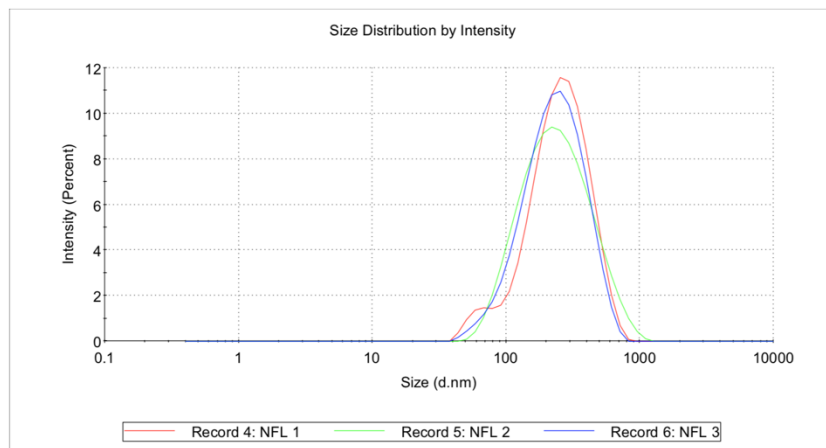


Figura 2.12 Tamaño de partícula medido con Zetasizer de las muestras con la adición de polímero previamente disuelto en agua

A partir de la información obtenida se realizó otra emulsión del compuesto bioactivo, utilizando 2 combinaciones de polímeros previamente disueltos como encapsulantes junto con el Tween 80 de la manera que se explica en “Descripción del proyecto”.

La emulsión final se secó utilizando el secador por aspersión a una temperatura de 175°C y 60°C de entrada y salida, respectivamente (Figura 2.13 a), para que no quedara humedad formándose el polvo mostrado en la Figura 2.13 b.



Figura 2.13 a) Parámetros de secado. b) Formación de nanocápsulas de compuesto bioactivo en polvo durante el proceso de secado por aspersión.

A partir de este polvo se hizo el análisis de las partículas en el microscopio óptico utilizando magnificación de 400x y 1000x para ver su morfología (Figura 2.14).

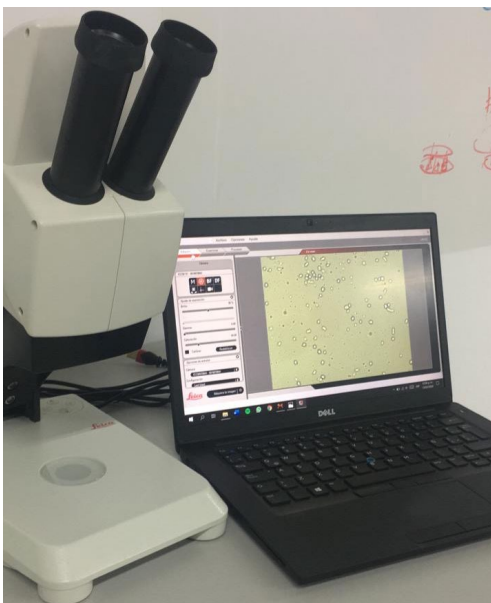


Figura 2.14 Observación de morfología de las nanocápsulas utilizando el microscopio óptico Leica con cámara conectada a una computadora

Posteriormente se busca realizar un análisis más profundo de la morfología de las nanocápsulas utilizando microscopios más potentes como el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). Además, es necesario caracterizar las propiedades de estos sistemas nanoestructurados en cuanto a su biocompatibilidad, eficiencia de encapsulamiento, así como resistencia a variaciones de temperatura y pH similares a las que se enfrentaría dentro del cuerpo utilizando un sistema *in vitro*. Para el compuesto bioactivo, es necesario comprobar que sus propiedades no se hayan visto comprometidas por el proceso de encapsulamiento, desde su capacidad antioxidante utilizando un espectrofotómetro UV, hasta su eficiencia como fármaco con la dosis encapsulada utilizando organoides.

3. Resultados del trabajo profesional

Como se describió en el apartado anterior, durante el proceso de desarrollo de las nanocápsulas poliméricas se hicieron modificaciones en el protocolo en cuanto a la concentración del emulsificante Tween 80, en la condición de los polímeros previo a su adición a la emulsión y en las condiciones de secado por aspersión, según la bibliografía y los datos obtenidos del trabajo experimental y el análisis del tamaño de partícula con el Zetasizer ZS90. Después de definir estos parámetros, se llegó a un protocolo de

FO-DGA-CPAP-0017

encapsulación con el que, utilizando dos combinaciones de polímeros, se obtuvieron las emulsiones mostradas en la Figura 3.1.

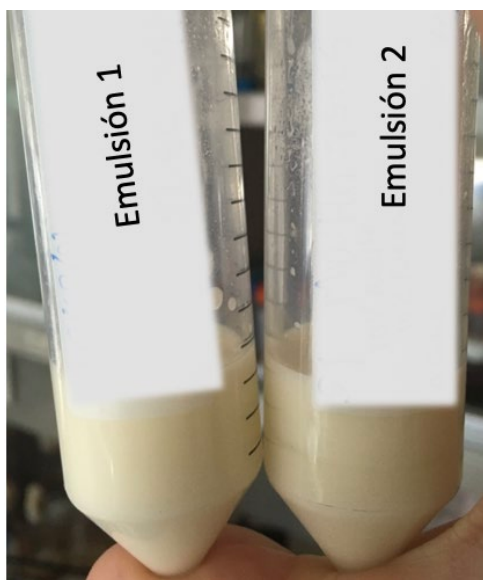


Figura 3.1 Emulsión de aceite en agua del compuesto bioactivo con 2 mezclas poliméricas

Previo al secado por aspersión, se analizó el tamaño de partícula de estas emulsiones con el Zetasizer ZS90, el cuál resultó ser 314.5 ± 8.549 nm para la emulsión 1 y 188.1 ± 2.409 nm para la emulsión 2, como se muestra en las Figuras 3.2 y 3.3 respectivamente. En este caso se observa que, para la primera muestra (Figura 3.2), hay mucha dispersión de picos, lo que indica que hay partículas con tamaños diferentes de entre 100 nm hasta entrar a la escala micrométrica. En la gráfica de la segunda muestra por su parte, (Figura 3.3) los picos de lectura del equipo se concentran en un mismo punto (188.1 nm), por lo que, de acuerdo con este análisis, sus partículas tienen un tamaño más homogéneo.

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 314,5	Peak 1: 253,8	56,7	103,9
Pdl: 0,514	Peak 2: 1676	43,3	701,2
Intercept: 0,889	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			

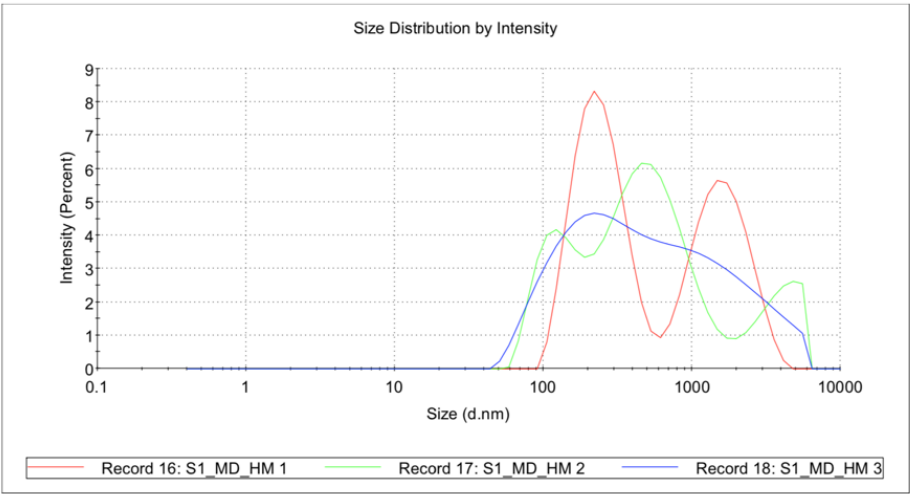


Figura 3.2 Tamaño de partícula medido con Zetasizer de la emulsión 1

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 188,1	Peak 1: 244,3	100,0	127,3
Pdl: 0,211	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,948	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			

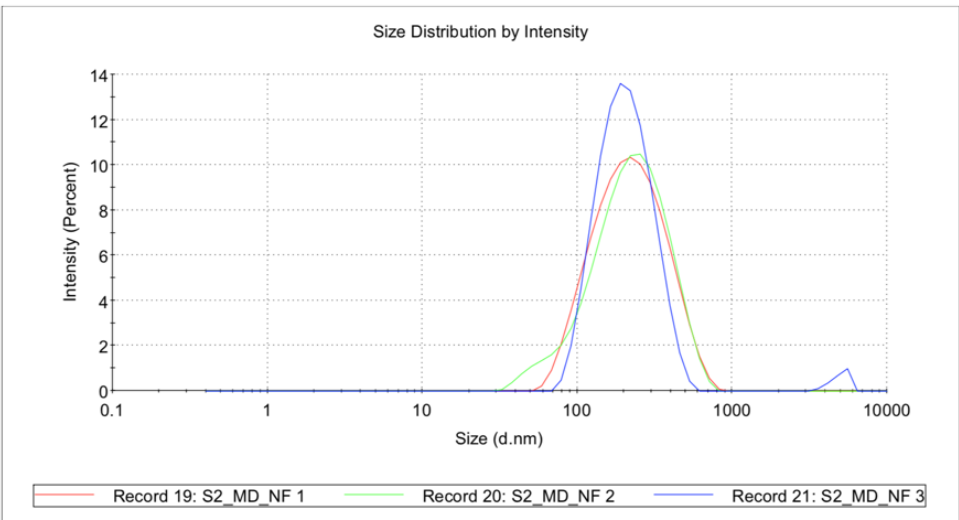


Figura 3.3 Tamaño de partícula medido con Zetasizer de la emulsión 2

Posteriormente, se secó por aspersión utilizando las condiciones optimizadas, con las cuales se obtuvo el polvo mostrado en la Figura 3.4. A pesar de haberse usado el mismo volumen de muestra previo al secado de la encapsulación con mezcla copolimérica uno (Figura 3.4 a), se obtuvo menor polvo que en el caso de la mezcla copolimérica dos, (Figura 3.4 b). Esta diferencia puede ser resultado de diferentes factores dentro de los cuales destaca la eficiencia del proceso de secado por aspersión. Se usaron las mismas condiciones en cuanto a temperatura, presión y flujo para ambas muestras, pero debido a las diferencias en las propiedades de las mezclas poliméricas usadas y de las partículas creadas, como viscosidad y densidad, más partículas de la emulsión 1 se quedaron atrapadas en el secador que en el caso de la emulsión 2. Además, el polvo total de la emulsión 1 tiene un tamaño de grano observable mayor y es más denso que el de la emulsión 2 (32).

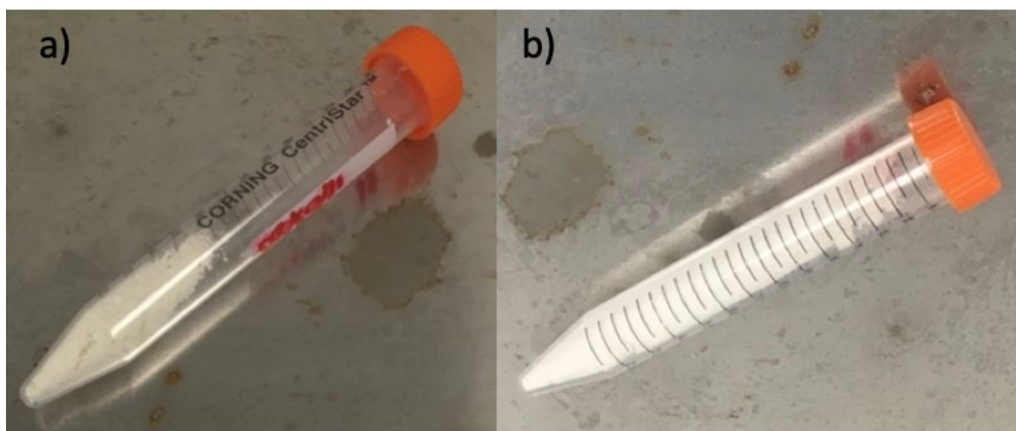


Figura 3.4 Polvo obtenido después del proceso de secado por aspersión de la emulsión a) 1 y b) 2.

Con la visualización de estos polvos con microscopio óptico Leica con cámara ICC50W, utilizando magnificación de 400x y 1000x, fue posible determinar la morfología circular característica de estas cápsulas a escala nanométrica, mostrada en las Figuras 3.5 y 3.6. De igual manera, estas imágenes coinciden con los resultados obtenidos en la medición de tamaño de partícula con el Zetasizer.

Para la primera emulsión se determinó que el tamaño promedio de partícula es de 314.5 ± 8.549 nm, pero hay varias poblaciones de partículas con diferentes tamaños; esto mismo se obtuvo a través de la microscopía óptica mostrada en la Figura 3.5, a 400X aparecen diversas partículas con gran diferencia de tamaño, y a 1000X se aprecian unas pequeñas aglomeraciones de partículas, cada una con un tamaño que tiende a rebasar los 200 nm. Lo mismo ocurre en el caso de la emulsión 2, pues previamente se determinó un tamaño de partícula promedio de 188.1 ± 2.409 nm con la mayor parte de la población de partículas concentrada en esta medida y en la Figura 3.6 se observan partículas en su mayoría debajo de los 200 nm de diámetro con variaciones mucho menos drásticas comparadas con la primera emulsión.

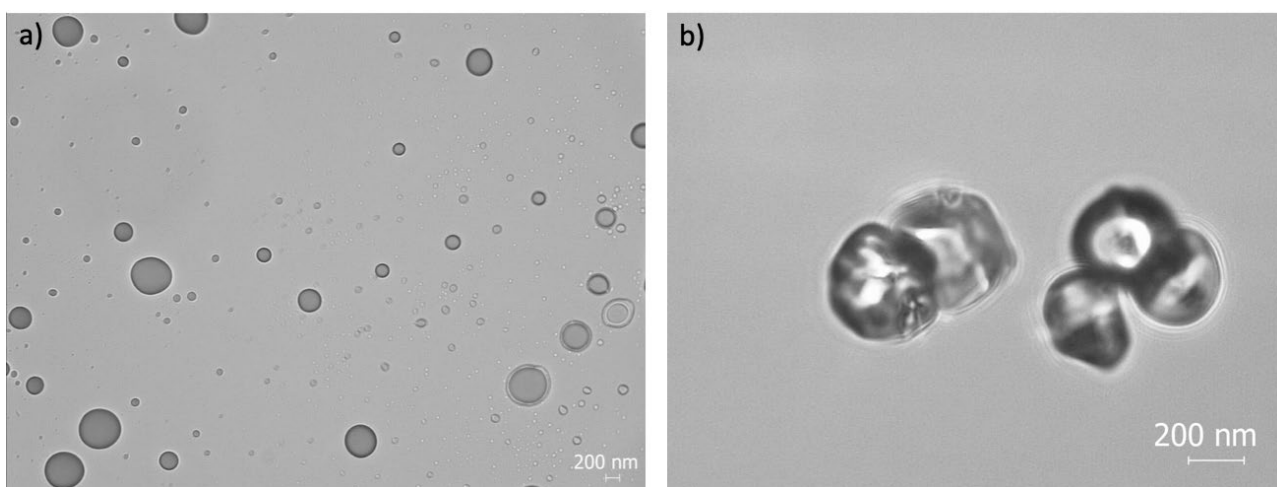


Figura 3.5 Caracterización con microscopio óptico de las cápsulas obtenidas con la emulsión 1 utilizando magnificación de a) 400X y b) 1000X

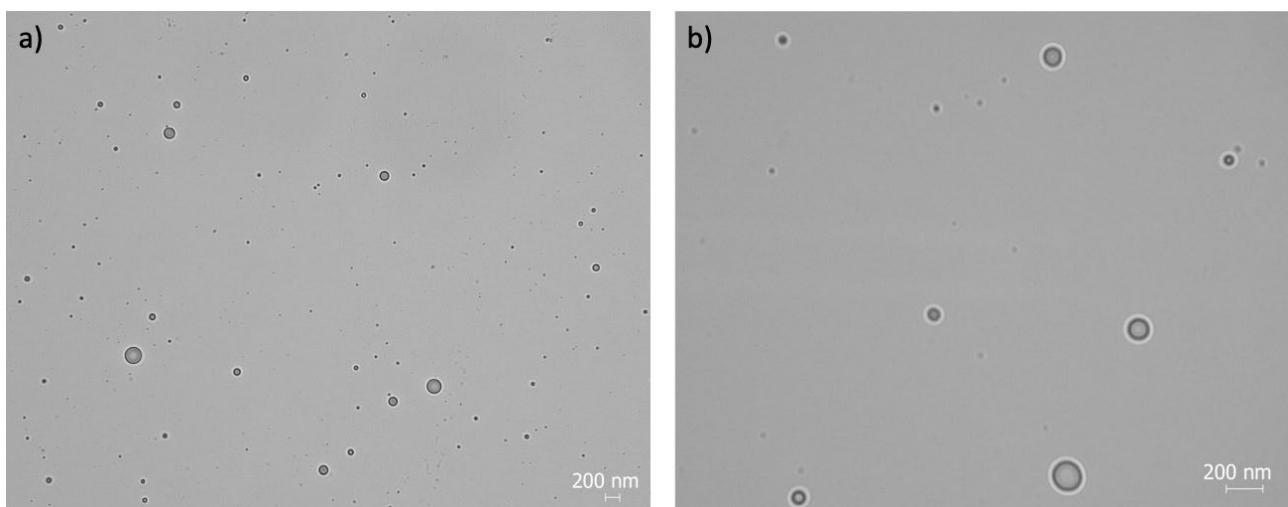


Figura 3.6 Caracterización con microscopio óptico de las cápsulas obtenidas con la emulsión 2 utilizando magnificación de a) 400X y b) 1000X.

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

- Aprendizajes profesionales

Este proyecto significó para mí una gran oportunidad para acercarme al campo de la medicina con un acercamiento nano y biotecnológico, que siempre me ha gustado y que no había tenido mucha oportunidad de apreciar dentro de mi carga curricular.

Debido a que la mayoría de los proyectos en los que he participado durante la carrera han sido utilizando compuestos inorgánicos, fue completamente diferente trabajar con compuestos orgánicos y tener que considerar ciertos parámetros como la esterilización para que el producto final pueda utilizarse de manera segura como fármaco.

En cuanto a conocimientos técnicos, en el área biotecnológica tuve la oportunidad de refrescar mi conocimiento en técnicas de cultivo, aprendí a hacer extracción de material genético, los pasos básicos para la formación de organoides de hígado, junto con las diferentes células que los componen, su morfología, función y cuidado. De mi formación, practiqué el procesamiento de imágenes, la capacidad de análisis de datos, creación de un protocolo, conocimientos básicos de laboratorio, entre otros.

Uno de los mayores retos a los que me enfrenté personalmente fue al desarrollo del protocolo, pues involucró mucha creatividad y cuestionamiento para poder generar propuestas innovadoras en base a mucha investigación sobre lo que ya se está desarrollando, las propiedades de los compuestos a los que se tenía acceso y el equipo para sintetizar y caracterizar los sistemas nanoestructurados. Esto también me hizo admirar mucho más el trabajo del Dr. Hugo Esquivel Solís, sus estudiantes y todos los que están involucrados en el campo farmacológico, pues a pesar de que la inversión en la investigación en México es baja, ellos encuentran la manera de seguir adelante con su trabajo.

En México hay 20 empresas de nanomedicina pero muy pocas de ellas se enfocan en aplicaciones médicas. Además, se enfrentan a problemas como regulación, costos, aseguramiento de calidad, educación, recursos humanos, consideraciones éticas, etc. Por esta razón, para el desarrollo de este sector, es de vital importancia la colaboración de los centros de investigación y universidades con las empresas para generar productos que pasen de la investigación al mercado de manera efectiva (33).

- Aprendizajes sociales

Como ya se mencionó anteriormente, los padecimientos cardiovasculares y respiratorios, el cáncer y enfermedades crónicas son de las principales causas de muerte en México y a nivel mundial, siendo uno de los factores principales el poco acceso a terapias y medicamentos accesibles y efectivos. Otro problema es que muchas terapias actuales tienen elementos tóxicos y al no ser direccionables, tienden a afectar tanto tejido enfermo como sano. El trabajo en general del grupo del Dr. Hugo Esquivel Solís aportan a la solución de estas problemáticas al buscar compuestos bioactivos naturales, que procesados de manera sustentable y escalable, puedan convertirse en fármacos efectivos y económicos para el tratamiento de enfermedades crónicas.

Sin embargo, muchos de los compuestos bioactivos se ven limitados en su aplicación al ser insolubles o vulnerables a las condiciones fisiológicas como temperatura y pH. Por esta razón, resulta de gran importancia la investigación en el desarrollo de un vehículo

nanoestructurado que permita la entrega mínimamente invasiva y direccionada del fármaco, para mejorar su efectividad, durabilidad y seguridad.

En el aspecto económico, esta línea de investigación, al ser un camino hacia la cura de diversas enfermedades para la sociedad en general, representa un aumento de calidad de vida y productividad. Además, representa para el país la oportunidad de formar parte del mercado para la administración de fármacos que en el 2010 fue estimado en más de mil millones de dólares y se espera que para 2021 suba a 136 mil millones de dólares (34).

Los saberes adquiridos al hacer las nanoestructuras para vehiculizar fármacos partiendo de recursos naturales y accesibles es algo que se puede aplicar a cualquier otra industria desde mi punto de vista, pues demuestra que es posible hacer productos innovadores que no requieran de demasiada inversión económica ni por el productor ni por el cliente.

- Aprendizajes éticos

La sociedad se enfrenta a diversos retos y la salud es definitivamente uno de los más importantes. La participación en esta investigación me brindó la oportunidad de ver de cerca la investigación que se está llevando a cabo para encontrar la cura de padecimientos crónicos y me invita a no conformarme con la realidad, a buscar medios para crear productos innovadores pensados desde un punto tanto económico como social.

- Aprendizajes en lo personal

Este proyecto ayudó a reafirmar mi interés por el área médica, conocí diferentes métodos de síntesis como el secado por aspersión, formé parte de investigación real que se lleva a cabo en un centro como CIATEJ colaborando con personas de alto conocimiento académico, aprendí algunas técnicas y bases de biotecnología, etc.

Dentro de la dinámica grupal disfruté mucho del constante apoyo entre todos los miembros y de los seminarios, debido a que tanto el Dr. como los demás integrantes del grupo me pedían fundamentar cada paso que realizaba o explicaba, me enseñó a llegar aún más afondo en la investigación, que es un rasgo que siento que se ha perdido en el sistema de educación normal y es una herramienta muy importante para la vida diaria.

5. Conclusiones

Se creó un sistema nanoestructurado en forma de cápsulas copoliméticas para el transporte de un compuesto bioactivo de baja solubilidad. En primera instancia se hizo directamente la dispersión del compuesto en aceite y se emulsificó con la mezcla polimérica. Después de secar la emulsión por aspersión se obtuvo un polvo aceitoso, por lo que se decidió utilizar el emulsificante Tween 80 junto con los polímeros. Después de hacer variaciones de concentración del emulsificante y analizar el tamaño de partícula correspondiente, se determinó la cantidad óptima. De igual manera, se hicieron variaciones en los tiempos de baño ultrasónico de punta para la homogeneización de la emulsión y en la forma de agregar la mezcla polimérica a la emulsión.

Una vez definidos los parámetros, se llevó a cabo la encapsulación del compuesto bioactivo con 2 mezclas copoliméricas. Del análisis de tamaño de partícula con Zetasizer se obtuvo que la primera mezcla tiene una población de tamaño alrededor predominante de 314.5 nm aunque no homogénea, mientras que en la segunda es de 188.1 nm y es más homogénea. De la observación de ambas muestras después del secado por aspersión con microscopio óptico, se pudo apreciar la morfología redonda característica de este tipo de cápsulas. De esta manera se obtuvo un sistema con gran potencial para la entrega dirigida de fármacos poco solubles que colabore a la creación de productos de bajo costo, naturales y competitivos en el mercado para tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas como la Fibrosis, según el objetivo inicial del proyecto.

Se espera en trabajos futuros evaluar la farmacodinámica del compuesto en modelos tisulares in vitro y el comportamiento del sistema nanoestructurado en condiciones fisiológicas para pasar a direccionar el sistema utilizando ligandos.

Esta investigación marcó un buen punto de inicio de la investigación y creación de este tipo de sistemas dentro del grupo con el que tuve el honor de colaborar y también fue una pieza clave en mi desarrollo profesional y personal.

6. Bibliografía

1. *Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects*. Jayanta Kumar Patra, Gitishree Das, Leonardo Fernandes Fraceto, Estefania Vangelie Ramos Campos, Maria del Pilar Rodriguez-Torres, Laura Susana Acosta-Torres, Luis Armando Diaz-Torres, Renato Grillo, Mallappa Kumara Swamy, Shivesh Sharma, Solomon Habtemar. 71, s.l. : Journal of Nanobiotechnology, 2018.
2. *Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles*. Akhand Pratap Singh, Arpan Biswas, Aparna Shukla & Pralay Maiti. 33, s.l. : Springer Nature, 2019.
3. Nanoparticles for Cardiovascular Disease Treatment. *CD Bioparticles*. [Online] 2020. [Cited: Febrero 21, 2020.] <https://www.cd-bioparticles.net/nanoparticles-for-cardiovascular-disease-treatment>.
4. *Poly(D,L-Lactic Acid) Nanoparticle Size Reduction Increases Its Immunotoxicity*. Da Silva, J., Jesus, S., Bernardi, N., Colaço, M., & Borges, O. Coimbra : frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, Vol. 7.
5. Secretaría de Salud. 315. Enfermedades crónicas no transmisibles ocasionan 71 por ciento de fallecimientos en el mundo. *Gobierno de México*. [Online] Agosto 14, 2018. [Cited: Febrero 21, 2020.] <https://www.gob.mx/salud/prensa/315-enfermedades-cronicas-no-transmisibles-ocasionan-71-por-ciento-de-fallecimientos-en-el-mundo?idiom=es..>
6. (IHME), Institute for Health Metrics and Evaluation. Mexico. *Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME)*. [Online] 2019. [Cited: Febrero 2020, 21.] <http://www.healthdata.org/mexico>.
7. Rodríguez, Alejandra. Medicamentos aumentarán hasta 25% su precio en 2020, advierten farmacéuticas. *El Financiero*. 2020.
8. Villalobos, Isaura López. En Jalisco, el 80% de los pacientes abandonan su tratamiento por los altos costos que representa una enfermedad renal crónica. *UDG TV*. 2019.
9. CANIFARMA. Economía. *CANIFARMA*. [Online] [Cited: Febrero 2020, 21.] <https://www.canifarma.org.mx/Noticias/Econom%C3%ADa/Notas/inversiones.php>.
10. Gobierno de Jalisco. Plan Estatal de Desarrollo Jalisco 2013-2033. *Sepaf (Secretaría de Planeación, Administración y Finanzas)*. [Online] 2013. [Cited: Abril 26, 2020.] https://sepaf.jalisco.gob.mx/sites/sepaf.jalisco.gob.mx/files/ped-2013-2033_0.pdf.
11. La inversión en el control de las enfermedades no transmisibles genera importantes beneficios financieros y sanitarios. *Organización Mundial de la Salud*. [Online] Mayo 16, 2018. [Cited: Abril 26, 2020.] <https://www.who.int/es/news-room/detail/16-05-2018-investing-in-noncommunicable-disease-control-generates-major-financial-and-health-gains>.
12. Arenas, Vanessa. El Despegue de la investigación en Nanomedicina . *DF Salud (Diario Financiero)*. [Online] Agosto 23, 2018. [Cited: Abril 26, 2020.] https://www.df.cl/noticias/site/artic/20180823/asocfile/20180823134339/el_despegue_de_1_a_nanomedicina.pdf.
13. Organización Mundial de la Salud. Medicamentos esenciales y tecnologías sanitarias básicas en la esfera de las enfermedades no transmisibles: propuesta de medidas para mejorar el acceso equitativo en los Estados Miembros. *World Health Organization*. [Online] Julio 2, 2015. [Cited: Abril 26, 2020.] https://www.who.int/nmh/events/essential_medicines_2jul15_spanish.pdf?ua=1.

14. *Nanoparticles and Controlled Delivery for Bioactive Compounds: Outlining Challenges for New “Smart-Foods” for Health*. MCarment Martínez-Ballesta, Ángel Gil-Izquierdo, Cristina García-Viguera y Raúl Domínguez-Perles. Espinardio, Murcia, España : Foods, 2018, Vols. 7(5), 72.
15. *Application of Nanoemulsions in Drug Delivery*. Kamla Pathak, Satyanarayan Pattnaik and Kalpana Swain. 415-433, Warangal, India : Elsevier, 2018.
16. *Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded in Microemulsions: Enhanced In Vitro Activity against Colon and Breast Cancer Cells and Possible Cellular Mechanisms*. Huaiqiong Chen, Yongguang Guan, Seung Joon Bae y Qixin Zhong. s.l. : Springer, 2018.
17. *Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters*. Mohammad Rezaul Islam Shishir, Lianghua Xie, Chongde Sun, Xiaodong Zheng, Wei Chen. China : Trends in Food Science & Technology, 2018, Vols. 78, 34-60.
18. *Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (Litsea glaucescens) with maltodextrin*. Medina-Torres, L., Santiago-Adame, R., Calderas, F., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., ... Manero, O. 90, 1–8, México : Elsevier, 2016.
19. *Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying*. Silva, V. M., Vieira, G. S., & Hubinger, M. D. 61, 132-143, Brasil : Elsevier, 2014.
20. University of Calgary. ORGANIC LABORATORY TECHNIQUES 8. *University of Calgary*. [Online] [Cited: Marzo 26, 2020.]
<http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/laboratory/rotavap.pdf>.
21. ROTAVAPOR® R-215 – BUCHI. *Cimatec*. [Online] 2019. [Cited: Mayo 1, 2020.]
<https://website.cimatec.pe/producto/rotavapor-r-215-buchi/>.
22. IKA. Dispersores. *IKA*. [Online] [Cited: Marzo 27, 2020.]
http://www.laboquimia.es/pdf_catalogo/IKA_Homogeneizadores_dispersores_de_varilla_Ultra_turrax.pdf.
23. *NANOSCALED DISPERSED SYSTEMS USED IN DRUGDELIVERY APPLICATIONS*. Catalina Natalia Cheaburu-Yilmaz, Hatice Yesim Karasulu y Onur Yilmaz. 437-468, s.l. : Polymeric Nanomaterials in Nanotherapeutics. Elsevier., 2019.
24. Gillespie, Claire. How Does Sonication Work? *Sciencing*. [Online] 2018. [Cited: Marzo 27, 2020.] <https://sciencing.com/sonication-work-5171302.html>.
25. Fisher Scientific. Sonics Materials VCX-130PB Ultrasonic Processor. *Fisher Scientific*. [Online] 2020. [Cited: Marzo 27, 2020.] <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/vcx-130pb-ultrasonic-processor/11763729>.
26. Malvern Instruments. *ZETASIZER NANO SERIES USER MANUAL*. [Documento] Reino Unido : s.n., 2013.
27. —. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. *Malvern Instruments*. [Online] [Cited: Marzo 27, 2020.]
https://warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/intro_to_dls.pdf.
28. Zetasizer Nano ZS90. *Malvern Panalytical*. [Online] 2020. [Cited: Mayo 1, 2020.]
<https://www.malvernpanalytical.com/es/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs90>.

29. *Spray Drying: An Overview*. Daniel Santos, Ana Colette Maurício, Vitor Sencadas, José Domingos Santos, Maria H. Fernandes and Pedro S. Gomes. s.l. : IntechOpen, 2018.
30. QuimiNet. La nueva línea YAMATO de Neocitec. *QuimiNet*. [Online] Junio 01, 2015. [Cited: Marzo 27, 2020.] <https://www.quiminet.com/articulos/la-nueva-linea-yamato-de-neocitec-4125451.htm>.
31. Leica. Cámaras de microscopía. *Leica Microsystems*. [Online] 2020. [Cited: Marzo 27, 2020.] <https://www.leica-microsystems.com/es/productos/camaras-de-microscopia/detalles/product/show/Products/leica-mc170-hd/>.
32. *NFLUENCE OF SPRAY DRYING PROCESS ON THE QUALITY OF AVOCADO POWDER: A FUNCTIONAL FOOD WITH GREAT INDUSTRIAL POTENTIAL*. MARULANDA, Alejandra, RUIZ-RUIZ, Marilza, & CORTES-RODRÍGUEZ, Misael. Medellín : Vitae, 2018, Vol. 25.
33. Dolores, Mariana. Los desafíos de la nanomedicina en México. *Foro consultivo científico y tecnológico AC*. [Online] Septiembre 04, 2019. [Cited: Mayo 4, 2020.] <https://www.foroconsultivo.org.mx/FCCyT/boletines-de-prensa/los-desaf%C3%ADos-de-la-nanomedicina-en-m%C3%A9xico>.
34. Nanomedicina. *Oficina de Información Científica y Tecnológica para el Congreso de la Unión*. [Online] Junio 2019. [Cited: Mayo 4, 2020.] https://foroconsultivo.org.mx/INCyTU/documentos/Completa/INCYTU_19-032.pdf.